

Parasitismo *in vitro* de *Meloidogyne javanica* por fungos nematófagos

***In vitro* parasitismo of *Meloidogyne javanica* by nematophagous fungi**

DOI:10.34117/bjdv6n12-523

Recebimento dos originais: 10/11/2020

Aceitação para publicação: 21/12/2020

Ana Maria Maciel dos Santos

Doutora em Melhoramento Genético de Plantas UFRPE
Pesquisadora no Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste
Av. Professor Luís Freire, 1, Cidade Universitária, Recife/PE, CEP: 50740-545
E-mail: agrom1960@yahoo.com.br

Lindomar Maria de Souza

Doutora em Botânica pela UFRPE
Pesquisadora no Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste
Av. Professor Luís Freire, 1, Cidade Universitária, Recife/PE, CEP: 50740-545
E-mail: lindomarsouza.ufrpe@gmail.com

Joselma Ferreira da Silva

Especialista em Microbiologia pela FAFIRE
Pesquisadora no Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste
Av. Professor Luís Freire, 1, Cidade Universitária, Recife/PE, CEP: 50740-545
E-mail: joselma.fsilva@gmail.com

Cristina dos Santos Ribeiro Costa

Doutoranda em Melhoramento Genético de Plantas pela UFRPE
Rua Dom Manuel de Medeiros, s/n – Dois Irmãos, Recife/PE, CEP: 52171-900
E-mail: cristinasrcosta@gmail.com

Flavia Paiva Coutinho

Doutora em Biologia de Fungos pela UFPE
E-mail: coutinhoflavia@outlook.com

Kleyton Danilo da Silva Costa

Doutor em Melhoramento Genético de Plantas pela UFRPE
Professor no Instituto Federal de Alagoas – Campus Piranhas
Av. Sergipe, 1477, Piranhas - AL, 57460-000
E-mail: kleyton.costa@ifal.edu.br

Bianca Galúcio Pereira Araújo

Doutoranda em Melhoramento Genético de Plantas pela UFRPE
Tecnologista do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste
Av. Professor Luís Freire, 1, Cidade Universitária, Recife/PE, CEP: 50740-545
E-mail: bianca.araujo@cetene.gov.br

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar *in vitro* o parasitismo de ovos e a inibição da eclosão de juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* por diferentes isolados de fungos nematófagos. Os espécimes fúngicos foram isolados de amostras de solo coletadas em áreas agrícolas da região metropolitana do Recife e zona da mata do estado de Pernambuco. O experimento foi conduzido no Laboratório de Bioprocessos do CETENE no delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições. Foram avaliados quatro isolados fúngicos CTFN-37.1, CTFN-18, CTFN-49.2 (*Trichoderma* spp.) e CTFN-41.2 (*Gongronella* spp.), os quais foram comparados com a testemunha (ausência de fungo) quanto ao parasitismo de ovos e redução da eclosão de J2 *in vitro* as 48 e 120 horas após a incubação. Em microtubos de 2 mL foram adicionadas 1 mL da suspensão de ovos e 1 mL da suspensão de esporos (conforme o tratamento – isolados fúngico) ou água destilada esterilizada (testemunha). Os recipientes foram devidamente identificados e colocados em DBO a 25°C em ausência de luminosidade até o momento das avaliações. Os quatro isolados fúngicos avaliados *in vitro* mostraram-se promissores na infestação de ovos e na redução da eclosão de J2 de *M. javanica*, destacando-se os isolados CTFN-37.1 e CTFN-18 como os mais eficientes no processo de parasitismo dos ovos. Além de promoverem reduções na eclosão dos J2, os tratamentos contendo os isolados fúngicos também apresentaram os juvenis mortos, em sua maioria. Logo, os fungos avaliados podem ser promissores para redução de populações de *M. javanica*, sendo necessários estudos em condição de casa-de-vegetação e campo.

Palavras-chave: Nematoides-das-galhas, manejo biológico, fungos biocontroladores.

ABSTRACT

The objective of the present study was to evaluate *in vitro* the parasitism of eggs and the inhibition of the hatching of juveniles of second stage (J2) of *Meloidogyne javanica* by different isolates of nematophagous fungi. Fungal specimens were isolated from soil collected in agricultural areas in the metropolitan region of Recife and in the forest area of the state of Pernambuco. The experiment was conducted at the Bioprocess Laboratory of CETENE in a completely randomized design with four replications. Four fungal isolates CTFN-37.1, CTFN-18, CTFN-49.2 (*Trichoderma* spp.) and CTFN-41.2 (*Gongronella* spp.) were evaluated, which were compared with the control (absence of fungus) for egg parasitism and reduction hatching of J2 *in vitro* at 48 and 120 hours after incubation. In 2 ml microtubes, 1 ml of the egg suspension and 1 ml of the spore suspension (depending on the treatment - fungal isolate) or sterile distilled water (control) were added. The containers were identified and placed in BOD at 25 ° C in the absence of light until the time of the evaluations. The four fungal isolates evaluated *in vitro* showed promise in the infestation of eggs and in the reduction of the hatching of J2 of *M. javanica*, highlighting the isolates CTFN-37.1 and CTFN-18 as the most efficient in the process of parasitism of eggs. In addition to promoting reductions in the hatching of J2, treatments containing fungal isolates also presented mostly juvenile dead. Therefore, the fungi evaluated can be promising for the reduction of *M. javanica* populations, requiring studies in greenhouse and field conditions.

Keywords: Root-knot nematodes, biological management, biocontrol fungi.

1 INTRODUÇÃO

Nematoides são parasitas de ampla ocorrência em várias culturas agrícolas, causando danos e perdas econômicas expressivas. Dentre os nematoides que estão descritos na literatura, o gênero *Meloidogyne*, também conhecido como nematoides-das-galhas, é citado como o mais importante, devido ao grande impacto que causa na agricultura em escala global (Tazi et al., 2020). Esses nematoides causam doenças que resultam em grandes perdas na produção agrícola da cana-de-açúcar,

algodão, banana, tomate, tubérculos, entre outras culturas de interesse econômico (Perry et al., 2009; Gharabadiyan et al., 2013; Rosa et al., 2015; Silva et al., 2016).

Estudos realizados por Janati et al. (2020) mostraram que a espécie *M. javanica* apresentou alta ocorrência de infestação, sendo encontrada em mais de 86% das espécies agrícolas avaliadas. O nematoide *M. javanica* está associado ao sistema radicular das plantas, sendo responsável pela formação de galhas, o que dificulta a absorção de água e nutrientes e, portanto, afeta de forma negativa o crescimento e o desenvolvimento da parte aérea das plantas (Tazi et al., 2020). Além da formação das galhas, outros sintomas são observados nas plantas (não resistentes) cultivadas em solos contaminados por *M. javanica*, como o amarelecimento das folhas, a diminuição do perfilhamento, o retardo na maturação, de modo a causar prejuízos consideráveis na produção agrícola (Yang et al., 2020).

A espécie *M. javanica* geralmente pode ser encontrada em qualquer tipo de solo, especialmente em regiões com solos arenosos e com temperaturas acima de 25°C. A temperatura é um dos principais fatores para a reprodução, podendo acelerar a reprodução e diminuir o ciclo de vida dos nematoides (Pinheiro et al., 2011; Fernandez et al., 2013; Wolfgang et al., 2019).

Devido ao grande impacto que os nematoides podem causar na produção agrícola, o manejo adequado para o controle desses parasitas nos sistemas produtivos representa um importante passo para minimizar os prejuízos e manter a produção de alimentos em áreas inicialmente contaminadas (Khan et al., 2015). Entretanto, controlar a infestação por nematoides não é um trabalho fácil, uma vez que estes micro-organismos habitam nos solos e, sob condições favoráveis de temperatura e umidade, multiplicam-se rapidamente e se protegem da ação de substâncias tóxicas por estarem no interior das raízes das plantas (Pinheiro et al., 2011).

Por isso, visando à conservação ambiental, tem se pesquisado o desenvolvimento de alternativas para o controle da população de nematoides de maneira sustentável e integrativa, através do uso de produtos à base de micro-organismos (Rao et al., 2016). Na última década houve um notório crescimento no reconhecimento da eficiência dos produtos microbianos para uso no manejo integrado de nematoides, sendo estes uma boa opção ecológica, econômica e sustentável (Benami et al., 2020).

Fungos nematófagos são inimigos naturais de várias espécies de nematoides, incluindo nematoides parasitas de plantas que já foram descritos mundialmente (Yang et al., 2020). Atualmente, produtos à base de fungos para o controle de nematoides-das-galhas já estão disponíveis no mercado (Ahmad et al., 2018; Baron et al., 2019). Entretanto, a disponibilidade de novos isolados com alta capacidade de controlar os nematoides em regiões com características edafoclimáticas peculiares, ainda se faz necessária no Brasil (Santos et al., 2020). Os fungos nematófagos podem agir inibindo o crescimento embrionário do nematoide, desintegrando a camada superficial dos ovos, tornando-os

vulneráveis e facilitando a passagem de micotoxinas que impedem a eclosão dos juvenis (Manzanilla-López et al., 2013).

Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar *in vitro* o parasitismo de ovos e a inibição da eclosão de juvenis (J2) de *Meloidogyne javanica* por diferentes espécimes de fungos nematófagos isolados de solos agrícolas da região metropolitana do Recife e da zona da mata do estado de Pernambuco.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Obtenção e Identificação dos isolados fúngicos

Os isolados fúngicos foram obtidos de amostras de solo coletadas em áreas agrícolas (Tabela 1). Para a coleta do solo utilizou-se trado holandês, sendo a amostra composta por dez subamostras que foram coletadas até 20 cm de profundidade em pontos aleatórios dentro da lavoura. As amostras coletadas foram acondicionadas em sacos plásticos devidamente identificados e levados ao Laboratório de Bioprocessos (LABIO)/Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE).

Tabela 1. Locais e características das áreas de coleta das amostras de solo para obtenção dos isolados fúngicos. Recife-PE, 2020.

Isolado fúngico	Coordenadas		Informações da área
	Latitude	Longitude	
CTFN-18	-8,018668	-34,945773	Recife/PE. Horta da Universidade Federal Rural de Pernambuco/UFRPE.
CTFN-37.1	-8,1102401	-35,31568822	Vitória de Santo Antão/PE. Área de produção de olerícolas (alface, coentro, couve). Irrigação por microaspersão.
CTFN-49.2	-8,0595884	-35,26005819	Glória de Goitá/PE. Área de agricultura familiar (roçado de feijão, milho, quiabo, couve). Sem sistema de irrigação.
CTFN-41.2	-8,1102401	-35,31568822	Vitória de Santo Antão/PE. Área de produção de olerícolas (alface, coentro, couve). Irrigação por microaspersão.

Para a obtenção dos fungos nematófagos, foi adaptado o método do espalhamento de solo descrito por Barron (1977) e modificado por Santos (1991). Em placa de Petri contendo meio de cultivo Batata-Dextrose-Ágar/BDA (ágar-água 2% + 350µL/L de solução de Cloranfenicol - 100 mg/L de cloranfenicol para 25 ml de álcool etílico) foi adicionado 1 g da amostra de solo homogeneizada, em seguida adicionou-se 1 mL da suspensão concentrada de 5.000 ovos/mL de *M. javanica* sobre o solo, visando estimular a esporulação dos fungos nematófagos. Foram preparadas quatro placas para cada amostra de solo. Após a aplicação da suspensão de nematoides, as placas foram mantidas em estufa

DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio) a 25°C em ausência de luminosidade, sendo observadas a partir do segundo dia após o plaqueamento para repicagem dos fungos em crescimento. Os fungos foram isolados e cultivados em placas de Petri no meio BDA a 2% para posterior identificação com base nas características macro e microscópicas de acordo com a taxonomia morfológica (Hesseltine & Ellis, 1964; Kubicek & Harman, 1998).

Obtenção de ovos de *M. javanica*

A suspensão de ovos foi obtida de fonte de inóculo mantida em tomateiro (*Solanum lycopersicum* cv. Santa Cruz). As raízes parasitadas pelo nematoide, apresentando galhas e massas de ovos, foram imersas em água para remoção do substrato. Após a retirada do substrato, as raízes foram imersas em álcool 70% por um minuto, depois imersas em hipoclorito de sódio a 0,05% por dois minutos e em seguida foram lavadas três vezes em água destilada esterilizada. Posteriormente, procedeu-se à extração dos ovos pela metodologia proposta por Hussey & Barker (1973) e modificada por Boneti & Ferraz (1981). A contagem do número de ovos foi realizada em lâmina de Peters em microscópio óptico (LEICA CM E) com aumento de 40x. Após a contagem, a solução foi ajustada para a concentração de 5.000 ovos/mL.

Avaliação *in vitro* dos isolados fúngicos quanto ao parasitismo de ovos e redução da eclosão de juvenis de segundo estágio (J2) de *M. javanica*

Os isolados fúngicos (CTFN-18, CTFN-37.1, CTFN-41.2 e CTFN-49.2) foram avaliados *in vitro* quanto ao parasitismo de ovos e redução da eclosão de juvenis de segundo estágio (J2) de *M. javanica*. O experimento foi conduzido no LABIO/CETENE sob delineamento experimental inteiramente casualizado, contendo cinco tratamentos (quatro isolados fúngicos e testemunha/ausência de fungo) e quatro repetições. A parcela experimental foi um microtubo de 2 mL.

Em cabine biológica (ESCO Class II BSC), foi adicionada 20 mL de água destilada esterilizada a placa de Petri contendo o isolado fúngico e com o auxílio da alça de Drigalski foi realizada a raspagem da colônia. Posteriormente, a suspensão fúngica foi filtrada em gaze esterilizada, sendo obtida a suspensão de esporos. Estes foram quantificados com auxílio da câmara de Neubauer e microscópio óptico (40x). As suspensões foram ajustadas para a concentração de $2,0 \times 10^7$ esporos/mL.

As raízes das fontes de inóculo parasitadas pelo nematoide foram imersas em água para remoção do substrato. Após a retirada do substrato, com auxílio de bisturi, foram removidas as massas de ovos e colocadas em almofariz contendo 20 mL de água destilada, sendo posteriormente retirada a água e as massas de ovos imersas em álcool 70% por um minuto, depois imersas em hipoclorito de sódio a 0,05% por dois minutos e em seguida lavadas três vezes com água destilada esterilizada. Posteriormente,

procedeu-se a extração dos ovos, adicionando 30 mL de solução de hipoclorito de sódio a 0,5% e com o pistilo foram maceradas as massas de ovos visando à liberação dos mesmos. Em seguida, a suspensão foi vertida em conjunto de peneira de 200 e 500 mesh, sendo realizada a lavagem com água destilada esterilizada, e os ovos retidos na peneira de 500 mesh foram armazenados em recipiente e aferida a concentração de ovos, segundo metodologia já descrita anteriormente. Posteriormente, suspensão de ovos foi ajustada para uma concentração média de 200 ovos/mL e 03 juvenis J2/mL.

Em microtubos de 2 mL foram adicionadas 1 mL da suspensão de ovos e 1 mL da suspensão de esporos (conforme o tratamento - CTFN-18; CTFN-37.1; CTFN-41.2 e CTFN-49.2). Na testemunha (ausência de esporos) foi adicionada 1 mL de água destilada esterilizada ao invés da suspensão de esporos. Os recipientes foram devidamente identificados e colocados em DBO a 25°C em ausência de luminosidade.

Após 48 horas da incubação, foi realizada a primeira avaliação quantificando o número de ovos parasitados, o número de ovos total e a quantidade de juvenis total. Transcorridas 72 horas da primeira avaliação, realizou-se a segunda. Com o auxílio de câmera fotográfica foram capturadas imagens dos ovos e juvenis, tanto na testemunha quanto nos tratamentos contendo esporos fúngicos, visando observar possíveis processos de parasitismo causados pelos fungos sobre os ovos e juvenis J2 de *M. javanica*. De acordo com a metodologia de Tazi et al (2020) são considerados como mortos os juvenis imóveis a partir do dia da incubação.

Visando atender as pressuposições da análise de variância, os dados obtidos foram transformados por \sqrt{x} para as variáveis número total de ovos e ovos parasitados. A variável número total de juvenis foi transformada para $\log x$. As médias obtidas foram comparadas pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade, visando comparar a testemunha com os diferentes isolados fúngicos quanto às variáveis analisadas. Para avaliar a diferença entre os isolados fúngicos foi aplicado o teste de Duncan a 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas no programa estatístico GENES (Cruz, 2013) e o gráfico foi elaborado no programa Origin 8.0.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As avaliações foram realizadas após 48 horas de inoculação, sendo observada diferença significativa para o número de ovos parasitados. Entretanto, para o número total de ovos e de juvenis não houve diferença significativa. O fato do número total de ovos entre os tratamentos não diferir é importante por indicar que embora todos os tratamentos não tivessem o mesmo número exato de ovos, a variância existente não foi significativa. Cinco dias após a incubação, observou-se diferença significativa tanto para o número de ovos parasitados quanto para o número total de juvenis, nos contrastes entre os isolados e a testemunha (Tabela 2).

Tabela 2. Resumo da análise de variância do parasitismo de ovos e redução da eclosão de juvenis (J2) de *Meloidogyne javanica* por isolados fúngicos. Recife-PE, 2020.

Fontes de Variação	de GL	Quadrados Médios				
		48 horas após inoculação			120 horas após inoculação	
		TO	OP	TJ	OP	TJ
Tratamentos	4	10,96 ^{ns}	86,99**	0,40 ^{ns}	102,62**	0,61 ^{ns}
Isolados	3	6,92 ^{ns}	14,58 ^{ns}	0,17 ^{ns}	12,52 ^{ns}	0,06 ^{ns}
Isolados vs Testemunha	1	23,08 ^{ns}	304,2**	1,08 ^{ns}	372,90**	2,29**
Resíduo	15	2,50	1,60	0,07	1,88	0,09
CV(%)		14,34	16,23	71,24	15,86	47,02

GL: grau de liberdade; CV: coeficiente de variação; **significativo a 1% de probabilidade pelo teste de F; ^{ns}: não significativo a 5% de probabilidade pelo teste de F. TO: número total de ovos; OP: número de ovos parasitados; TJ: número total de juvenis.

Transcorridas 48 horas da instalação do experimento, foi verificado o parasitismo dos ovos do *M. javanica* por todos os isolados, os quais diferiram da testemunha. Para o número total de juvenis, os isolados CTFN-18 e CTFN-49.2 diferiram da testemunha, indicando que nas 48 horas após a incubação, tais isolados fúngicos foram capazes de reduzir a eclosão de juvenis J2 (Tabela 3).

Tabela 3. Parasitismo de ovos e redução da eclosão de juvenis (J2) de *Meloidogyne javanica* por isolados fúngicos. Recife-PE, 2020.

Tratamentos	Espécie fúngica	48 horas após inoculação		120 horas após inoculação	
		OP	TJ	OP	TJ
Testemunha	-	0	7,75	0	21,00
CTFN-18	<i>Trichoderma</i> spp.1	95,84*	1,75*	123,43 *	3,00*
CTFN-37.1	<i>Trichoderma</i> spp.2	147,44*	4,00	165,12*	4,75*
CTFN-49.2	<i>Trichoderma</i> spp.3	92,06*	1,00*	114,06*	2,25*
CTFN-41.2	<i>Gongronella</i> sp.	55,84*	3,25	72,93*	4,50*

Médias apresentando asteriscos (*) diferem significativamente do controle na mesma coluna pelo teste de Dunnett (p>0,05). OP: número de ovos parasitados; TJ: número total de juvenis.

Dentre os isolados avaliados, os tratamentos contendo os fungos CTFN-18 e CTFN-37.1 apresentaram maiores quantidades de ovos parasitados, embora não tenham diferido estatisticamente dos demais tratamentos (CTFN-41.2 e CTFN-49.2) em relação ao número de J2 (Tabela 4).

Tabela 4. Diferença no parasitismo de ovos e redução da eclosão de juvenis (J2) de *Meloidogyne javanica* por isolados fúngicos após 120 horas de incubação. Recife-PE, 2020.

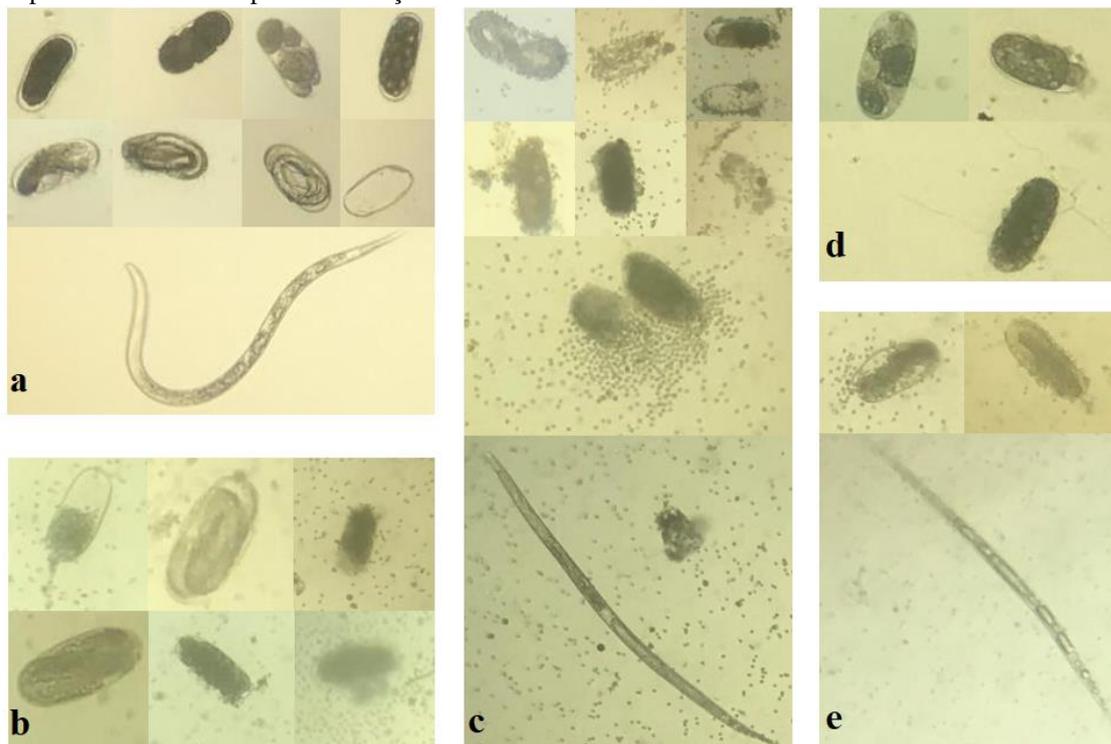
Tratamentos	Espécie fúngica	120 horas após incubação	
		OP	TJ
Testemunha	-	0 d	21,00 a
CTFN-18	<i>Trichoderma</i> spp.1	123,43 ab	3,00 b
CTFN-37.1	<i>Trichoderma</i> spp.2	165,12 a	4,75 b
CTFN-49.2	<i>Trichoderma</i> spp.3	114,06 b	2,25 b
CTFN-41.2	<i>Gongronella</i> sp.	72,93 c	4,50 b

Médias seguidas por letras minúsculas na coluna diferem significativamente entre si pelo teste de Duncan ($p > 0,05$). OP: número de ovos parasitados; TJ: número total de juvenis.

Fungos ovicidas ao entrarem em contato com os ovos desenvolvem as hifas que se fixam externamente na parede do ovo e produzem quitinases, enzimas envolvidas na quebra de ligações β -1 \rightarrow 4 nas moléculas de quitina que estão presentes na casca do ovo, possibilitando dessa forma a penetração mecânica, e posteriormente a ocorrência da colonização e consumo do conteúdo interno dos ovos (Seidl, 2008). A quitina é um dos biopolímeros mais abundantes na natureza e é um importante componente estrutural presente na casca de ovos de nematoides. Alguns estudos avaliam a capacidade microbiana na produção de quitinase, utilizando como critério principal, a capacidade que o micro-organismo apresenta em utilizar a quitina como única ou principal fonte de carbono (Sharma et al. 2020; Soares et al., 2014; Tikhonov et al., 2002).

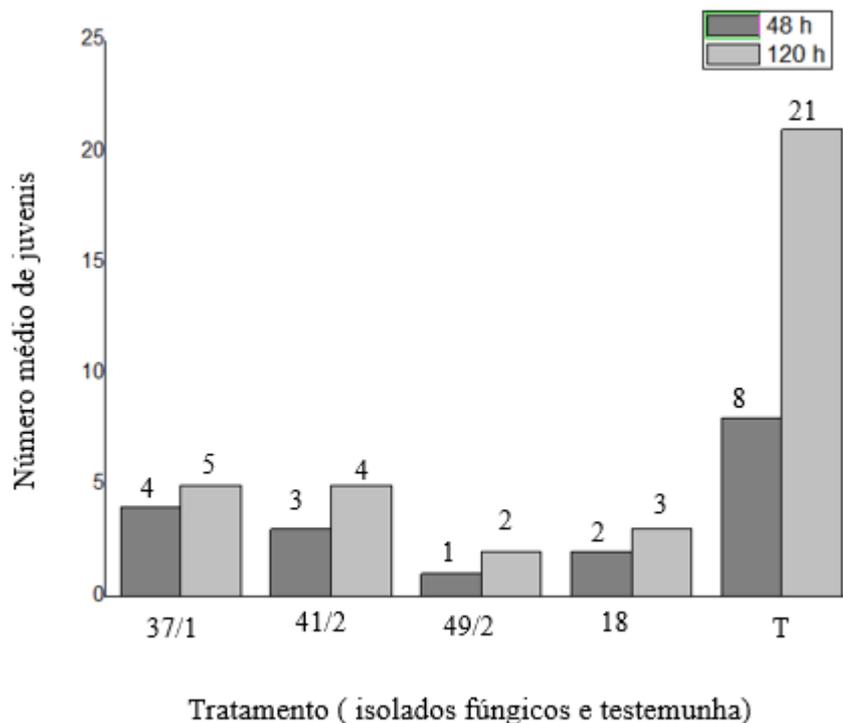
Tais fungos geralmente possuem um crescimento rápido e parasitam os ovos ao seu redor (Barron, 1977; Galbieri & Belot, 2016). No presente estudo, observou-se a aglomeração de esporos fúngicos em torno dos ovos e das cascas de ovos de *M. javanica* em todos os tratamentos que continham a suspensão de esporos, podendo-se visualizar a desintegração dos ovos pelos isolados CTFN-18 e CTFN-49.2 e o crescimento das hifas dos isolados CTFN-37.1 e CTFN-41.2 (Figura 1).

Figura 1. a) Diferentes fases dos ovos, casca do ovo e juvenil de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* sem a presença de esporos fúngicos (testemunha); b) Parasitismo causado pelo isolado CTFN-37.1; c) Parasitismo causado pelo isolado CTFN-18; d) Parasitismo causado pelo isolado CTFN-41.2; e) Parasitismo causado pelo isolado CTFN-49.2. Imagens capturadas 120 horas após a inoculação.



Após 120 horas da incubação, todos os isolados fúngicos se apresentaram promissores na redução da eclosão dos juvenis, havendo uma diferença significativa entre a testemunha e os isolados utilizados. É perceptível o aumento no número de juvenis quando se compara a média às 48 horas e às 120 horas na testemunha, indicando o aumento no número de eclosões de J2 com o decorrer do tempo, fato que não foi observado nos tratamentos que continham os isolados fúngicos (Figura 2).

Figura 2. Número médio de juvenis (J2) de *Meloidogyne javanica* em função dos tratamentos fúngicos em 48 e 120 horas após a incubação.



Apenas no tratamento contendo o isolado CTFN-41.2 foi observado dois juvenis móveis, nos demais tratamentos contendo fungos, todos os juvenis estavam imóveis (mortos). Na testemunha, dos 84 juvenis observados, 76 estavam móveis, o que corresponde a 90,47%.

Pesquisa recente realizada por Banna et al., (2020) aponta resultados promissores no controle da infestação de culturas agrícolas por *M. javanica* através do uso de nanopartículas de enxofre. Entretanto, ressalta a importância de disponibilizar para os pequenos, médios e grandes produtores rurais mais de uma opção viável e efetiva para o controle de nematoides, que podem ser acessadas em virtude da sua disponibilidade e custo de mercado. Sendo assim, o manejo integrado de nematoides deve ser levado em consideração nos diversos aspectos que regem uma agricultura sustentável: o social, o econômico e principalmente o ambiental.

Outros autores têm avaliado a eficiência de isolados fúngicos no controle da infestação por nematoides e os resultados têm se mostrado bastante promissores. Tazi et al (2020) avaliando diferentes espécies de fungos nematófagos verificaram o número de J2 após 24, 48 e 72 horas a partir da incubação, sendo as maiores taxas de mortalidade registradas após 72 horas com *Purpureocillium lilacinum* e *Arthrobotrys oligospora*. No presente estudo verificou-se diferença significativa entre os tratamentos com isolados e a testemunha quanto ao número de juvenis na avaliação de 120 horas após

incubação. Logo, avaliações antes das 48 horas de incubação possivelmente não serão eficientes na diferenciação dos tratamentos.

Em trabalho realizado com isolados de *Pochonia chlamydosporia*, *Fusarium solani* e *Trichoderma* sp., verificou-se a eficiência de três dos quatro isolados avaliados, tanto no parasitismo dos ovos quanto na redução da eclosão de J2 de *M. javanica* quando comparados com a testemunha (Costa, 2015). Ferreira et al. (2008) também verificaram em estudo preliminar, que isolados de *Trichoderma* sp. e *P. chlamydosporia* foram eficientes em parasitar ovos de *M. exigua*. Fato semelhante foi observado no presente estudo, onde todos os isolados diferiram estatisticamente da testemunha quanto ao número de ovos parasitados e número de J2 eclodidos após 120 horas da incubação, sendo as suspensões de esporos eficientes na redução de eclosão de juvenis (J2) *in vitro*.

Embora não se tenha registro da utilização de fungos do gênero *Gongronella* como agentes de controle de nematoides, no presente estudo observou-se o potencial de isolamento desse gênero no controle do *M. javanica*. Espécies do gênero *Gongronella* são conhecidas pelo alto potencial produtor de quitosana (Maw et al., 2002), um polímero constituído por moléculas de *N*-acetil-*D*-glicosamina e *D*-glicosamina, com predominância desta última. Industrialmente, a quitosana pode ser obtida a partir da quitina através de um processo de desacetilação com álcalis, mas também pode ser encontrada em alguns fungos (Ghormade et al., 2017; Silva et al., 2006). Devido ao alto grau de desacetilação encontrado em espécie de *Gongronella* (Ghormade et al., 2017) é possível que o potencial quanto ao parasitismo de ovos do *M. javanica* esteja associado a capacidade do fungo em converter quitina (composto predominante em casca de ovos de nematoides) para quitosana que será incorporada na biomassa fúngica.

4 CONCLUSÕES

Os isolados fúngicos mostraram-se promissores na infestação *in vitro* de ovos e na redução da eclosão de juvenis (J2) da espécie *Meloidogyne javanica*, sendo os isolados CTFN-18 e CTFN-37.1 (*Trichoderma* spp.1 e *Trichoderma* spp.2) mais eficientes no processo de parasitismo dos ovos. O isolado pertencente ao gênero *Gongronella* (CTFN-41.2) foi promissor no presente estudo e apresenta alto potencial biotecnológico.

Novos estudos são necessários para verificar a capacidade de parasitismo de massa de ovos (*in vitro*) e redução do número de galhas e do número de ovos em plantas de importância agrícola inoculadas com *M. javanica* em condições de casa de vegetação e campo (naturalmente infestado pelos nematoides-das-galhas).

AGRADECIMENTOS

Agradecimento ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), através do Programa de Capacitação Institucional (PCI) e ao Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE) por disponibilizar a infraestrutura para realização deste trabalho. Também agradecemos a doação da fonte de inóculo do nematoide ao Professor Dr. José Luiz Sandes de Carvalho Filho -Universidade Federal Rural de Pernambuco- UFRPE.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, M., PATAECZEK, L., HILGER, T.H., ZAHIR, Z.A., HUSSAIN, A., RASCHE, F., SCHAFLEITNER, R., SOLBERG, S.O. Perspectives of microbial inoculation for sustainable development and environmental management. *Front. Microbiol.*, v. 9, n. 1, p. 2992, 2018.
- BANNA, L. S. A., SALEM, N. M., JALLE, G. A., AWWAD, A. M. Green synthesis of sulfur nanoparticles using *Rosmarinus officinalis* leaves extract and nematicidal activity against *Meloidogyne javanica*. *Chemistry International*, v. 6, n. 3, p. 137 - 143, 2020.
- BARON, N.C., RIGOBELLO, E.C., ZIED, D.C. Filamentous fungi in biological control: current status and future perspectives. *Chilean journal of agricultural research*, v.79, n. 2, p. 307–315, 2019.
- BARRON, G. L. The nematode-destroying fungi. Ontario: Canadian Biological Publications, 1977. 140p.
- BENAMI, M., ISACK, Y., GROTSKY, D., LEVY, D., KOFMAN, Y. The economic potential of arbuscular mycorrhizal fungi in agriculture. *Grand Challenges Fungal Biotechnol.*, p. 239–279, 2020.
- BONETTI, J. I. S., FERRAZ, S. Modificações do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* em raízes de cafeeiro. *Fitopatologia Brasileira*, v. 6, p. 553, 1981.
- COSTA, M. A. Biocontrole de nematoides com fungos. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp (Dissertação). 2015. 35p.
- CRUZ, C. D. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. *Acta Scientiarum*, v. 35, n.3, p. 271-276, 2013.
- FERNANDEZ, L., CABASAN, M. T. N., DE WAELE, D. Life cycle of the rice root-knot nematode *Meloidogyne graminicola* at different temperatures under non-flooded and flooded conditions. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, v. 47, n. 9, p. 1042-1049, 2013.
- FERREIRA, P. A., LOPES, E. A., FREITAS, L. G. Parasitismo de ovos de *Meloidogyne exigua* por fungos nematófagos e estudo da compatibilidade entre os isolados fúngicos. *Revista Trópica - Ciências Agrárias e Biológicas*, v. 2, n.3, p. 15, 2008.
- GALBIERI, R., BELOT, J. L. Nematoides fitoparasitas do algodoeiro nos cerrados brasileiros: biologia e medidas de controle. Instituto Mato-grossense do Algodão - IMAmt. 2016. 344p.
- GHARABADIYAN, F., JAMALI, S. and KOMEILI, R.H. Determining of root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*) damage function for tomato cultivars. *Journal of Agricultural Sciences*, v. 58, n. 2, p. 147-157, 2013.
- GHORMADE, V., PATHAN, E. K., DESHPANDE, M. V. Can fungi compete with marine sources for chitosan production? *International journal of biological macromolecules*, v.104, p. 1415-1421, 2017.
- HESSELTINE, C.W., ELLIS.J.J. The genus *Absidia*: *Gongronella* and cylindrical-spored species of *Absidia*. *Mycologia*, v.56, p. 568-601, 1964.
- HUSSEY, R. S., BARKER, K. R. A comparasion of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. *Plant Disease Reporter*, v. 57, p. 1025-1028, 1973.

JANATI S., HOUARI A., WIFAYA A., ESSARIOUI A., MIMOUNI A., HORMATALLAH A., SBAGHI M., DABABAT AA., MOKRINI F. Occurrence of the Root-Knot Nematode species in Vegetable Crops in Souss Region of Morocco. *The Plant Pathology Journal*, v. 64, n. 4, p. 308-315, 2018.

KHAN, Z., GAWADE, B.H., KANDAN, A. Resistant Cultivars: An option for Environment-friendly Management of Plant Parasitic Nematodes. ICAR-National Bur. Plant Genet. Resour. New Dellh. 2015.

KUBICEK, C.P; HARMAN, G.E. *Trichoderma* and *Gliocladium*. Volume 1: Basic Biology, Taxonomy and Genetics. London: Taylor & Francis. 1998. 293p.

MANZANILLA-LÓPEZ R.H., ESTEVES, I., FINETTI-SIALER, M.M., HIRSCH, P.R., WARD, E., DEVONSHIRE, J., HIDALGO-DÍAZ, L. *Pochonia chlamydosporia*: advances and challenges to improve its performance as a biological control agent of sedentary endo-parasitic nematodes. *Journal of Nematology*, v. 45, p.1–7, 2013.

MAW, T., TAN, T. K., KHOR, E. WONG, S. M. Selection of *Gongronella butleri* strains for enhanced chitosan yield with UV mutagenesis. *Journal of Biotechnology*, v. 95, p. 189-193, 2002.

PERRY, R.N., MOENS, M., STARR, F.J. *Root-knot nematodes*. Wallingford: CAB International. 2009.

PERRY, R.N., MOENS, M. *Plant nematology*. 2. ed. CABI International, Cambridge, MA, USA: 1-17, 2013.

PINHEIRO, J. B. *Nematoides na cultura da beterraba*. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, Circular Técnica, 85. 2011. 10p.

RAO, M.S., UMAMAHESWARI, R., PRITI, K., RAJINIKANTH, R., GRACE, G.N., KAMALNATH, M., et al. Role of Biopesticides in the Management of Nematodes and Associated Diseases in Horticultural Crops, In: *Plant, Soil Microbes*, Springer International Publishing, Cham, p. 117–148, 2016.

ROSA, J. M. O., WESTERICH, J. N., WILCKEN, S. R. S. Reprodução de *Meloidogyne enterolobii* em olerícolas e plantas utilizadas na adubação verde. *Revista Ciência Agronômica*, v. 46, p. 826-835. 2015.

SANTOS, A. M. M., SOUZA, L.M., ARAUJO, B. G. P., COSTA, K. D. S.; COSTA, C. S. R., SANTOS, L. V. Fungos nematófagos: uma opção no manejo integrado dos nematoides-das-galhas. In: Edilson Antonio Catapan. (Org.). *As ciências agrárias e seus impactos na sociedade*. 01 ed. São José dos Pinhais: Editora Brazilian Journals, 2020, v. 02, p. 348-374.

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

SEIDL, V. Chitinases of filamentous fungi: a large group of diverse proteins with multiple physiological functions. *Fungal Biology Reviews*, v. 22, n. 1, p. 36-42. 2008.

- SHARMA, S., KUMAR, S., KHAJURIA, A., OHRI, P., KAUR, R., KAUR, R. Biocontrol potential of chitinases produced by newly isolated Chitinophaga sp. S167. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 90, p. 89-104, 2020.
- SILVA, H. S. R. C., SANTOS, K. S. C. R., FERREIRA, E. I. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. *Química Nova*, v.29, p. 776-785, 2006.
- SILVA, M. C. L., SANTOS, C. D. G., E SILVA, G. S. Espécies de *Meloidogyne* associadas a vegetais em microrregiões do estado do Ceará. *Revista Ciência Agronômica*, v. 47, p. 710-719. 2016.
- SOARES, F. E. F., QUEIROZ, J. H., ARAÚJO, J. V., QUEIROZ, P. V., GOUVEIA, A. S., HIURAC, E., BRAGA, F. R. Nematicidal action of chitinases produced by the fungus *Monacrosporium thaumasium* under laboratory conditions. *Biocontrol Science and Technology*, v. 25, n.3, p. 337-344, 2014.
- TAZI, H., HAMZA, M. A., HALLOUTI, A., BENJLIL, H., IDHMIDA, A., FURZE, J. N., PAULITZ, T. C., MAYAD, E. H., BOUBAKER, H., MOUSADIK, A. E. Biocontrol potential of nematophagous fungi against *Meloidogyne* spp. infecting tomato. *Organic Agriculture*, 2020.
- TIKHONOV, V. E., LOPEZ-LLORCA, L. V., SALINAS, J. S., JANSSON, H. Purification and Characterization of Chitinases from the Nematophagous Fungi *Verticillium chlamydosporium* and *V. suchlasporium*. *Fungal Genetics and Biology*, v. 35, p. 67-78, 2002.
- WOLFGANG, A., TAFFNER, J., GUIMARÃES, R. A., COYNE, D., BERG, G. Novel strategies for soil-borne diseases: exploiting the microbiome and volatile-based mechanisms toward controlling *Meloidogyne*-based disease complexes. *Frontiers in Microbiology*, v. 10, p. 1296, 2019.
- YANG, J., STADLER, M., CHUANG, W. SHIPHER W. HIRAN A. ARIYAWANSA In vitro inferred interactions of selected entomopathogenic fungi from Taiwan and eggs of *Meloidogyne Graminicola*. *Mycological Progress*, v. 19, p. 97-109, 2020.