

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO

Ricardo Rubin Balardin

**REAÇÃO DE CULTIVARES DE SOJA E USO DE TRICHODERMA
PARA O MANEJO INTEGRADO DE *Meloidogyne javanica*.**

Santa Maria, RS
2019

Ricardo Rubin Balardin

**REAÇÃO DE CULTIVARES DE SOJA E USO DE TRICHODERMA PARA O
MANEJO INTEGRADO DE *Meloidogyne javanica*.**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Ciência do Solo**.

Orientadora: Dr.^a Zaida Inês Antonioli

Santa Maria, RS
2019

Balardin, Ricardo Rubin
Reação de cultivares de soja e uso de Trichoderma
para o manejo integrado de Meloidogyne javanica. /
Ricardo Rubin Balardin.- 2019.
58 p.; 30 cm

Orientador: Zaida Inês Antonioli
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de
Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa
de Pós-Graduação em Ciência do Solo, RS, 2019

1. Controle Biológico 2. Nematóide-das-galhas
3. Glycine max 4. Manejo Integrado 5. Controle
Genético I. Antonioli, Zaida Inês II. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo
autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca
Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

© 2019

Todos os direitos autorais reservados à Ricardo Rubin Balardin. A reprodução de partes ou
do todo deste trabalho só pode ser feita mediante a citação da fonte.

Endereço: Av. Roraima nº 1000, Cidade Universitária, Santa Maria – RS, CEP: 97105-900,
Prédio 42, sala 3306. Fone (55) 3220-8256; E-mail: ricardorbalardin@gmail.com

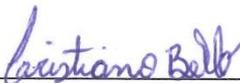
Ricardo Rubin Balardin

**REAÇÃO DE CULTIVARES DE SOJA E USO DE TRICHODERMA PARA O MANEJO
INTEGRADO DE *Meloidogyne javanica***

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Ciência do Solo**.

Aprovado em 20 de dezembro de 2019:


Zaida Inês Antonioli, Dr.^a (UFSM)
(Presidente/Orientador)


Cristiano Bellé, Dr. (Phytus Group)


José Carlos Verle Rodrigues, Dr. (UPR)

*À minha família e amigos,
dedico esse trabalho*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer à Deus, sempre iluminando meu caminho!

Posteriormente, agradeço muito meus pais, Ricardo e Clarice, por todo apoio que me foi dado para superar todos obstáculos em que me deparei, e em todos momentos de dificuldade foram solícitos, me auxiliando a crescer um passo de cada vez para me tornar uma pessoa melhor todos os dias, e por este motivo, lhes agradeço e lhes amo muito!

Em seguida, agradeço à minha irmã, Gabriela, pelo apoio e compreensão em todos momentos de ausência, assim, obrigado, te amo!

Também agradeço a todos os integrantes da minha família, meu avô e minha avó, meus tios e meus primos, pelo apoio e interesse demonstrado ao meu trabalho, com isso, lhes agradeço e lhes amo muito!

Agradeço à minha noiva, Daiane Dalla Nora, não podendo expressar em palavras o quanto me ajudou e auxiliou na minha vida acadêmica e pessoal, sempre me incentivando para dar meu melhor, como estudante e como pessoa, por isso, muito obrigado, te amo!

Em seguida agradeço a meu amigo e coorientador, Cristiano, por sempre ter sido de fácil acesso e muito companheiro em todos os momentos, sempre de forma divertida, porém com muitos ensinamentos, por este motivo e pela amizade, muito obrigado!

Também agradeço a minha orientadora, professora e amiga, professora Zaida, por ter aceitado a encenca de ser minha orientadora, me auxiliando e se importando pela minha educação, sempre me dando boas sugestões e com um sorriso no rosto, lhe agradeço muito!

Assim como gostaria de agradecer meus amigos e meu professor orientador de Porto Rico, Professor José Carlos, pela oportunidade de ir à ilha e aprender muito com todos, fazendo com que eu crescesse como acadêmico e como pessoa, lhes agradeço muito!

Aos meus queridos amigos, desde os amigos do colégio Nossa Senhora de Fátima, até os amigos da Graduação em Agronomia e Pós-Graduação em Ciência do Solo, lhes agradeço pelo apoio, incentivo, amizade, companheirismo, amizade e carinho por toda minha caminhada acadêmica, com isso, lhes agradeço muito!

Aos colegas, amigos e professores do Laboratório de Biologia do Solo, lhes agradeço o companheirismo, amizade e incentivo, que em todo meu período de estadia no laboratório me auxiliaram de inúmeras formas a atingir este objetivo, por isso, lhes agradeço muito!

Novamente, obrigado à todos vocês, sem vocês, teria sido muito mais difícil.

RESUMO

Reação de cultivares de soja e utilização de *Trichoderma* spp. para o manejo integrado de *Meloidogyne javanica*

AUTOR: Ricardo Rubim Balardin
ORIENTADOR: Zaida Inês Antonioli

A soja é considerada a cultura mais importante economicamente no Brasil, porém a sua produtividade pode ser diminuída devido a patógenos e pragas, caso não seja realizado um controle destes. Os fitonematoides são responsáveis por parte dessa diminuição. Dentre os nematoides do gênero *Meloidogyne*, o *Meloidogyne javanica* é o mais preocupante por sua grande quantidade de hospedeiros e sua ampla distribuição geográfica. Para diminuir o uso do controle químico, para mitigar danos ao meio ambiente, têm se optado por controles alternativos. O manejo integrado é o conjunto de controles, em que o controle biológico, controle genético, controle físico e controle cultural auxiliam na redução do uso de controle químico, porém com mesma eficiência. Neste trabalho objetivou-se avaliar diferentes genótipos de soja quanto a sua reação à *M. javanica*, e avaliar se isolados de *Trichoderma*, oriundos de diferentes regiões do Brasil, podem controlar *M. javanica*. A obtenção dos inóculos foi a partir de plantas de soja e re-inoculados em tomate para proliferação. Para o teste de reação, foi testado 37 cultivares de soja, que foram inoculados para cada planta 5.000 ovos + juvenis de segundo estágio (J2), com seis repetições cada, também contendo tratamento controle. O experimento foi avaliado 60 dias após a inoculação, realizando a pesagem das raízes, e contando o número de galhas e número de nematoides por grama de raiz para o cálculo do fator de reprodução. Para os testes *in vitro* de parasitismo e de mortalidade e inibição da eclosão de J2, foi obtido 40 isolados de *Trichoderma* (4 isolados do Centro-Oeste, 7 isolados do Sudeste e 29 isolados do Sul). A seguir, foi realizada uma suspensão de nematoides e individualmente separados 50 ovos + J2 e passados para poços individuais da placa de Elisa, e pipetado em cada poço uma solução de esporos de cada isolado para o teste de parasitismo e uma solução de filtrados fúngicos de cada isolado para o teste de mortalidade e inibição da eclosão de J2. Após 15 dias a aplicação o parasitismo, 48 horas após a aplicação foi avaliada a mortalidade e 21 dias após a aplicação foi avaliada a inibição da eclosão dos J2. Todas cultivares obtiveram fator de reprodução maior que 1, que caracteriza susceptibilidade à *M. javanica*. Os resultados dos testes *in vitro*, obteve-se valores acima de 85,50% de parasitismo, 65,30% de mortalidade de J2 e 66,00% da inibição da eclosão de J2. Conclui-se que o manejo o uso de *Trichoderma* e cultivar menos suscetível, como a FPS ATALANTA com FR=1,2, podem auxiliar no manejo do *M. javanica* à campo.

Palavras-chave: Controle biológico; Nematóide-das-galhas; *Glycine max*; Controle genético; fungos nematófagos.

ABSTRACT

Reaction of soybean cultivars and use of *Trichoderma* spp. for integrated management of *Meloidogyne javanica*

AUTHOR: Ricardo Rubin Balardin

ADVISOR: Zaida Inês Antonioli

Soybean is considered the most economically important crop in Brazil, but its yield may be reduced due to pathogens and pests, if not controlled. Plant-parasitic nematodes are responsible for part of this decrease. Among the nematodes of the genus *Meloidogyne*, the *Meloidogyne javanica* is the most worrying due to its large number of hosts and its wide geographical distribution. To reduce the use of chemical control, to mitigate environmental damage, has been opted for alternative controls. Integrated management is the set of controls in which biological control, genetic control, physical control, and cultural control assist in reducing the use of chemical control, but with the same efficiency. The objective of this work was to evaluate different soybean genotypes regarding their reaction to *M. javanica*, and to evaluate if isolates of *Trichoderma* from different regions of Brazil can control *M. javanica*. The inoculum was obtained from soybean plants and reinoculated in tomato for proliferation. For the reaction test, 37 soybean cultivars were tested, which were inoculated for each plant 5,000 eggs + second stage juveniles (J2), with six replications each, also containing control treatment. The experiment was evaluated 60 days after inoculation, weighing the roots, and counting the number of galls and number of nematodes per gram of root to calculate the reproduction factor. For the *in vitro* tests of parasitism, and mortality and egg + J2 hatching inhibition, 40 *Trichoderma* isolates were obtained (4 isolates from the Midwest, 7 isolates from the Southeast and 29 isolates from the South). Next, a suspension of nematodes was made and individually separated 50 eggs + J2 that was passed to individual wells of the Elisa plate, and a spore solution from each isolate was pipetted into each well for parasitism test and a fungal filtrate solution for each isolate for the mortality test and egg + J2 hatching inhibition. After 15 days of application parasitism, 48 hours after application mortality was evaluated and 21 days after application inhibition of egg + J2 hatching was evaluated. All cultivars had reproductive factor greater than 1, which characterizes susceptibility to *M. javanica*. The *in vitro* tests resulted in values above 85.50% parasitism, 65.30% mortality of J2 and 66.00% inhibition of egg + J2 hatching. It can be concluded that the use of *Trichoderma* and less susceptible cultivar, such as FPS ATALANTA with FR = 1.2, can help the management of *M. javanica* in the field.

Key words: Biological control; root-knot nematode; *Glycine max*; Integrated management; Genetic control; nematophagous fungi.

Sumário

1. INTRODUÇÃO GERAL	10
2. REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1 NEMATOIDES DO GÊNERO MELOIDOGYNE	12
2.2. MANEJO INTEGRADO DE NEMATOIDES	15
3. HIPÓTESES	16
4. OBJETIVOS	16
5. ARTIGO 1. Reproduction of <i>Meloidogyne javanica</i> in soybean genotypes	17
6. ARTIGO 2. Prospecção de trichoderma para controle de <i>Meloidogyne javanica</i> NA REGIÃO SUL DO BRASIL	34
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	53
8. REFERÊNCIAS	54

1. INTRODUÇÃO GERAL

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) foi cultivada em cerca de 35,82 milhões de hectares na safra 2018/19 no Brasil, sendo produzidas 115 milhões de toneladas de grãos, (CONAB, 2019). Vários fatores podem fazer com que a produtividade da cultura seja diminuída, como por exemplo, a ocorrência de pragas, doenças e plantas daninhas. Dentre estes fatores que influenciam negativamente a produtividade estão os fitonematoides, cujo relatos indicam que existem aproximadamente 100 espécies que impactam negativamente as culturas agrícolas, distribuídos principalmente entre os gêneros: *Meloidogyne*, *Heterodera*, *Pratylenchus* e *Rotylenchulus* (ALMEIDA, et al., 2005; DIAS, et al., 2010; MATTOS, 2016; KIRSCH, et al., 2016).

Fitonematoides são patógenos com capacidade de reduzir significativamente a produtividade de culturas agrícolas, causando danos superiores a 30%, e em casos mais severos acarretam a perda total da área. Estes prejuízos são de aproximadamente 157 bilhões de dólares anualmente (ABAD, et al., 2008). É importante destacar que a magnitude dos danos irá depender principalmente das espécies infestantes e da densidade populacional de fitonematoides presentes na área (AGRIOS, 2005; ARAUJO, et al., 2012). Além da grande capacidade de causar injúrias, estes nematoides estão amplamente distribuídos no território brasileiro, com grande variedade de hospedeiros (SOARES, 2006), o que inclui plantas daninhas (BELLE, et al., 2017; BELLE, et al., 2019; FERRAZ, et al., 2019; BALARDIN, et al., 2019). Outra consequência é que o dano causado acaba sendo uma porta de entrada para outros patógenos, como vírus, bactérias e fungos (MOENS, et al., 2009; COYNE, et al., 2018).

Fitonematoides do gênero *Meloidogyne* são os de maior relevância na cultura da soja (KIRSCH et al., 2016). As principais espécies, deste gênero, associadas à danos na cultura são: *Meloidogyne incognita* (Kofoid e White, 1919) Chitwood 1949, *Meloidogyne javanica* (Treub, 1985) Chitwood 1949, e *Meloidogyne arenaria* (Neal, 1889) Chitwood 1949 (ALMEIDA, et al., 2005).

Dentre os nematoides do gênero *Meloidogyne*, o *M. javanica* é considerado a espécie predominante, seguido do *M. incognita* (OKA, 2019). Além disso, são consideradas as espécies mais importantes deste gênero na cultura da soja, por serem responsáveis por grandes perdas e por estar amplamente difundido nas áreas agrícolas (MIRANDA, et al., 2011). Para o controle destes patógenos, utiliza-se um conjunto de ferramentas, que compõem o manejo integrado de nematoides.

Dentro do manejo integrado de nematoides pode-se citar o controle químico, o controle genético, o controle biológico, o controle físico e o controle cultural. O controle químico é amplamente utilizado, via o tratamento de sementes ou a aplicação em sulco. Ambas práticas têm a capacidade de diminuir significativamente a população de nematoides da área (INOMOTO; ASMUS, 2006). Entretanto, Kubo et al. (2012) relatam que a aplicação via sulco pode causar problemas ambientais, por isso é recomendado a utilização de tratamentos químicos via semente, levando a uma diminuição na quantidade de produto utilizado, resultando na diminuição dos problemas ambientais.

O controle físico, bastante utilizado em cultivos de menor escala, utiliza principalmente a técnica de solarização. Santos et al. (2006) concluíram que para a produção de mudas, uma das principais fontes de inóculo de nematoides-das-galhas em áreas de produção de hortaliças, a técnica de solarização é eficiente para a erradicação desta praga, entretanto, inviável para grandes áreas. O controle cultural, baseado na utilização de plantas não hospedeiras em um programa de rotação de culturas, diminui a proliferação do patógeno (PEDROSA, et al., 1994). Associado às plantas não hospedeiras, também deve ser considerada a utilização de plantas resistentes que auxiliam igualmente na rotação cultural.

O manejo genético consiste na utilização de plantas, que foram descobertas e/ou modificadas com auxílio de diferentes técnicas moleculares, cujos genes inseridos tornam a planta resistente ou tolerante ao patógeno alvo (IBRAHIM et al., 2011; TIAN, et al., 2019). Esta técnica é altamente recomendada quando todas variedades da cultura de interesse são consideradas suscetíveis, ou seja, o fator de reprodução é maior que 1. Pedrosa et al. (1994), Starr et al. (2002) e Teixeira (2013) salientam que o manejo genético é um dos métodos mais eficientes, porém com restrita disponibilidade no Brasil. Neste sentido, o controle biológico torna-se uma ferramenta bastante explorada no Manejo Integrado de Nematoides, na medida que apresenta um efeito mais duradouro e eficiente quando comparado com outros tipos de controle.

No controle biológico são buscados agentes antagonistas para combater o patógeno, possibilitando uma diminuição no uso de produtos químicos. Existem mais de 200 microrganismos nematófagos, onde os fungos, bactérias, e nematoides predadores, são os que representam a maior parcela (POINAR e JAHNSSON, 1988a, 1988b; STIRLING, 1991; PIMENTEL, 2009; SOARES, et al., 2018). Dentre estes agentes antagonistas, 75% são fungos que podem funcionar como parasitas, através da produção de metabólitos secundários que interferem na reprodução, postura e eclosão de ovos, e na sobrevivência dos estádios

iniciais de desenvolvimento dos nematoides e/ou mortalidade (STIRLING, 1991; SHARON, et al., 2001; MASCARIN, 2018).

O gênero *Trichoderma* é o mais usado no controle biológico de nematoides representando 70% dos fungos utilizados, considerado por Sikora et al. (2007) como um dos mais promissores no controle biológico, por produzir metabólitos e parasitar os nematoides. Este fungo apresenta potencial de ação simbiótica com a planta, estimulando o crescimento e auxiliando nos mecanismos de defesa da planta (RICHARDSON, 2001; VESSEY, 2003).

Contudo os fungos do gênero *Trichoderma* podem ter seu potencial de ação variado dependendo do isolado e de sua adaptação às condições bióticas e abióticas específicas, dentro e entre espécies de *Trichoderma*, que podem ser diferencialmente seletivas e adaptadas ao alvo, clima e ambiente, com seu crescimento e patogenicidade diretamente influenciados por temperatura e pH (DENNIS; WEBSTER, 1971a, 1971b; SHAH; AFIYA, 2019). Neste sentido, Louzada et al. (2009) salientam a importância de estabelecer coleções de culturas de *Trichoderma* spp. que sejam de diferentes áreas geográficas, pois existem bons antagonistas em diferentes regiões do país.

Portanto, com o crescimento anual do número de áreas infestadas por nematoides do gênero *Meloidogyne* em todo país, juntamente com a dificuldade de implementação de estratégias de manejo, o presente trabalho teve como objetivo testar a resposta genética dos novos genótipos de soja à reprodução de *Meloidogyne*, e avaliar se isolados fúngicos de *Trichoderma*, oriundos de diferentes locais do Brasil controlam *Meloidogyne javanica* na cultura da soja.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 NEMATOIDES DO GÊNERO MELOIDOGYNE

Nematoides são organismos invertebrados da fauna do solo, pertencentes ao filo Nematoda. Estes possuem diferentes hábitos alimentares e funções ecológicas (YEATES, et al., 1993). Relatado por Antônio (1992), os fitonematoides mais frequentes e agressivos causadores de injúrias na soja são: *Heterodera glycines* (Ichinohe 1952), *Meloidogyne incognita* (Kofoid e White, 1919) Chitwood 1949, *M. javanica* (Treub, 1985) Chitwood 1949, e *M. arenaria* (Neal, 1889) Chitwood 1949, *Pratylenchus brachyurus* (Godfrey, 1929) Filipjev & Shuurmans Stekhoven, 1941 e *Rotylenchulus reniformis* (Linford e Oliveira, 1940). No Brasil Central, Huang & Cares (1995) avaliaram a composição de comunidades de fitonematoides, que eram compostas pelos gêneros *Meloidogyne*, *Helicotylenchus*,

Ecphyadophora, Discocriconemella, Trophotylenchulus e Tylenchulus, e relatavam em 90 % das amostras ao menos quatro gêneros de fitonematoides. Entretanto, a comunidade de fitonematoides no Estado do Rio Grande do Sul, era dominada pelos gêneros: Meloidogyne e Helicotylenchu para Kirsch (2016).

A presença dos nematoides do gênero Meloidogyne nos dois principais polos agrícolas do país, associado com a grande quantidade de hospedeiros desta praga, faz com que seja um dos principais fitonematoides no Brasil (MOENS, et al., 2009; COYNE, et al., 2018). As principais espécies que causam avarias na soja são *Meloidogyne javanica*, *M. incognita*, e *M. arenaria* (ALMEIDA, et al., 2005). O *M. javanica* é a espécie mais abundantemente encontrada no Rio Grande do Sul (KIRSCH, et al., 2016), com uma ampla gama de hospedeiros (DIAS, et al., 2010), onde a soja é cultura hospedeira de maior expressão econômica e territorial, com 35,82 milhões de hectares plantadas na safra 2018/19 (CONAB, 2019). Salienta-se que a maioria das cultivares apresentam fator de reprodução considerados altos, maiores que 1, categorizando-os como suscetíveis à esta praga por Oostembrink (1966).

O ciclo de vida de nematoides do gênero Meloidogyne (Figura 1) é composto por quatro estádios juvenis, antes da fase adulta. A primeira ecdise ou troca de cutícula ocorre no interior do ovo. Em seguida o juvenil de 2º estágio eclode do ovo e vai ao solo em busca de uma raiz para penetrar. Os juvenis de 2º estágio são vermiformes e medem cerca de 0,3 a 0,5 mm podendo variar de acordo com cada espécie de Meloidogyne. Apenas o juvenil de 2º estágio é a forma infectante do nematoide-das-galhas que se movimenta por entre as partículas de solo e vão para as raízes das plantas hospedeiras por receber estímulos enviados pelos exsudatos das plantas. Os J2 penetram na raiz geralmente pela coifa em crescimento e migram entre as células até estabelecer um local de alimentação nas células. Neste momento torna-se um endoparasito sedentário (AGRIOS, 2005). Secreções produzidas pelas glândulas esofagianas do nematoide estimulam a formação de várias células gigantes nas raízes parasitadas, que fornecem nutrientes para os nematoides. Os nematoides aumentam rapidamente de tamanho e passam pelas ecdises transformando em 3º e 4º estágio juvenil e finalmente em adultos (AGRIOS, 2005).

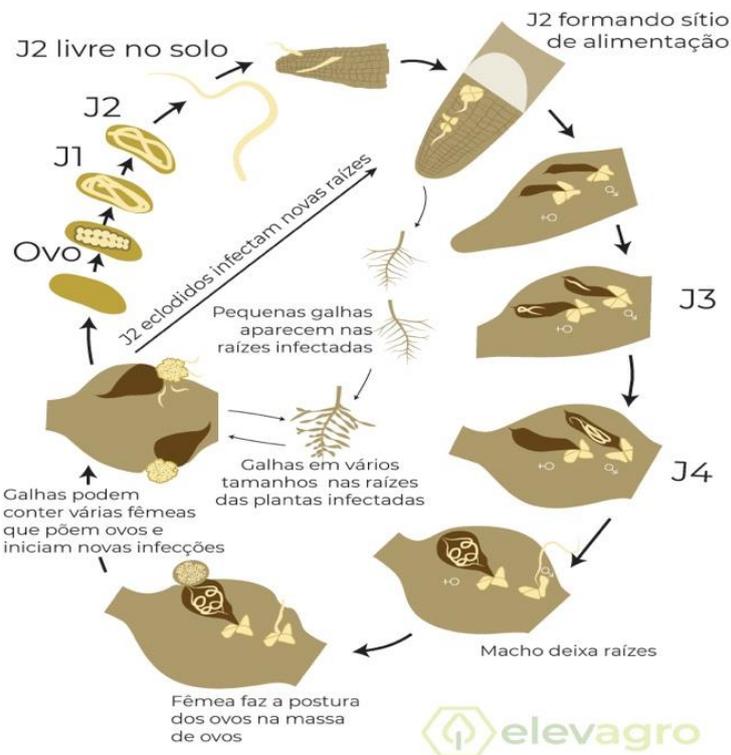
Os machos migram para fora da raiz e não se alimentam. Os machos participam menos no ciclo de vida em relação às fêmeas. O desenvolvimento de machos é aparentemente irrelevante, uma vez que a maioria das espécies se reproduz por partenogênese, ou seja, não há necessidade de copulação (AGRIOS, 2005).

Uma fêmea produz, durante o ciclo, centenas de ovos podendo chegar a valores superiores a 2000 ovos. Estes ovos são depositados em uma massa de ovos externamente as

raízes na superfície das galhas onde ficam presos e protegidos por uma mucilagem que os protege condições adversas como por exemplo a dessecação (AGRIOS, 2005).

O ciclo de vida do *Meloidogyne* spp., de ovo a ovo, tem uma duração aproximada de 21 a 30 dias no verão, sendo que no inverno este tempo pode ser estendido até 51 dias. Assim a duração do ciclo de vida é extremamente dependente da temperatura (AGRIOS, 2005).

Figura 1 - Ciclo de vida de nematoides do gênero *Meloidogyne*, modificado e adaptado de AGRIOS (2005). (J: juvenil)



Fonte: Elevagro, 2019.

Por ser considerado um endoparasita sedentário, a sua principal forma de disseminação é passiva, através da água, implementos agrícolas contaminados, homem e animais nas áreas de cultivo, já que naturalmente se movem poucos centímetros no solo (PERRY, et al., 2009). O nome comum de nematoide-das-galhas se dá pelo engrossamento no sistema radicular na cultura da soja, que limita a absorção de nutrientes e água, e conseqüentemente, seu crescimento e produtividade.

2.2. MANEJO INTEGRADO DE NEMATOIDES

O manejo integrado de nematoides é composto por uma série de controles que, em conjunto podem integrar o controle químico, controle biológico, controle físico, controle cultural, controle comportamental e controle genético. A combinação de controle biológico, controle cultural e genético, é uma estratégia eficiente no controle de nematoides na cultura da soja (SIKORA, et al., 2007; SAHEBANI;HADAVI, 2008; ROSA, 2018).

Controle biológico é conceituado por Eilenberg, Hajek e Lomer (2001) como o uso de organismos vivos para diminuir a densidade populacional ou suprimir o impacto de uma praga específica, fazendo com que seja menos abundante e, conseqüentemente, causando menos danos às plantas. Para os fitopatologistas, controle biológico é a manipulação direta ou indireta de microrganismos com o intuito de diminuir a densidade de inóculo ou potencial de inóculo de uma doença de plantas (NELSON, et al., 2004).O controle biológico de nematoides consiste em reduzir a densidade populacional através da utilização de organismos vivos, que ocorrem naturalmente ou são introduzidos antagonistas ao sistema (STIRLING, 1991).

Para o controle biológico de nematoides, é relatado mais de 200 microrganismos nematófagos, onde fungos, bactérias, nematoides predadores, podem ser encontrados na natureza predando ou parasitando nematoides (POINAR; JAHNSSON, 1988a, 1988b; KERRY, 1990; STIRLING, 1991; SIDDIQUI; MAHMOOD, 1996; PIMENTEL, 2009; SOARES, et al., 2018), onde 75% destes antagonistas identificados são fungos.

Estes fungos antagonistas possuem modos de ação distintos, podendo causar antibiose via armadilhas de fungos ou por parasitar e/ou produzir metabólitos que interferem na reprodução, postura e eclosão de ovos, na sobrevivência dos estádios iniciais de desenvolvimento dos nematoides e/ou mortalidade (JATALA, 1986; VAN GUNDY, 1985; STIRLING, 1991; SHARON, et al., 2001; NIBLACK; CHEN, 2004; MASCARIN, 2018; STIRLING, 2018). Ou também podem ser considerados antagonistas por competirem por sítios de alimentação em busca de nutrientes, ou por induzirem resistência ao hospedeiro do alvo do controle biológico (KLOEPPER, et al., 1992).

Dentre os fungos considerados eficientes agentes no controle biológico, os do gênero *Trichoderma* estão entre os mais associados com potencial antagonista (SIKORA, et al., 2007). Além disso, estes fungos também possuem funções bioestimulantes (RICHARDSON, 2001), além de causar alterações benéficas no crescimento, morfologia e no metabolismo das plantas (VESSEY, 2003).

Xiang, Lawrence e Donald (2018) destacam que o mercado de biopesticidas tem crescido significativamente, e o número de produtos disponíveis a base de microrganismos para o controle de fitonematoides está em aumento. Entretanto, também relatam que os agentes de controle biológico não vão substituir os nematicidas químicos, mas sim atuar em conjunto no manejo integrado desta praga como ferramentas, juntamente com o manejo genético, físico e cultural, o que diminui a dependência de produtos químicos.

Pedrosa et al. (1994) destacam que o uso de variedades resistentes no controle de nematoides do gênero *Meloidogyne* é muito eficiente, além de econômico e seguro, entretanto, a sua contribuição para o mercado é pouco expressiva devido à sua disponibilidade de variedades resistentes no mercado ser pequena.

Tian et al. (2019) relata que em trabalhos com soja para a obtenção de resistência à *Heterodera glycines*, foi utilizado o RNAi como silenciador de expressão gênica, onde obteve-se resultados como redução de 73 % na ovoposição do nematoide em transgênicos SCN HgY25 e SCN HgPrp17. Contudo, Ibrahim (2011), também utilizando RNAi, buscou genes eficientes para o controle de *M. incognita*, onde os genes TP e MSP reduziram, respectivamente, 92 % e 94.7 % o número de galhas, e também diminuíram o diâmetro dos nematoides em, respectivamente, 5.4 e 6.5 vezes o tamanho normal, comparado ao controle, concluindo que estes dois genes são promissores em cultivares resistentes.

3. HIPÓTESES

Os genótipos de soja reagem diferentemente a *Meloidogyne javanica*.

Diferentes isolados de *Trichoderma*, e oriundos de diferentes regiões do Brasil, podem controlar *Meloidogyne javanica*

4. OBJETIVOS

Obter informações sobre o potencial de genótipos de soja quanto à reação à *Meloidogyne javanica*.

Avaliar se diferentes isolados de *Trichoderma*, e oriundos de diferentes regiões do Brasil, podem controlar *Meloidogyne javanica*.

Artigo 1 nas normas da revista submetida, Anais da Academia de Ciência Brasileira.

5. ARTIGO 1. REPRODUCTION OF *Meloidogyne javanica* IN SOYBEAN GENOTYPES

Ricardo Rubin Balardin.^{1*}; Cristiano Bellé^{1,2}; Bruno Cherobini Piovesan¹;
Daiane Dalla Nora¹; Rodrigo Ferraz Ramos¹; Andrezza Nascimento Lopes²;
Paulo Sergio dos Santos^{1,2}; Zaida Inês Antonioli¹

¹ Universidade Federal de Santa Maria, Avenida Roraima, 1000, 97105-900, Rio Grande do Sul, Santa Maria, Brasil.

² Instituto Phytus, Rua Duque de Caxias, 2319, 1º andar, 97060-210, Rio Grande do Sul, Santa Maria, Brasil.

Keywords: Root-knot nematode; *Glycine max*; Genetic control; Integrated management; Resistance.

Running title: Reaction of soybean cultivars to *Meloidogyne javanica*

Academy Section: Agrarian Sciences

*Author for correspondence, ricardorbalardin@gmail.com.

ABSTRACT

Meloidogyne javanica is among the most important nematodes that damage soybean, and although genetic resistance is the ideal control measure, there are few cultivars described as resistant among those recommended for southern Brazil. The objective was to evaluate the reaction of soybean cultivars to *M. javanica*. The inoculum of *M. javanica* (Est. J3) was obtained from soybean plants and inoculated into tomato plants. Thirty-seven soybean cultivars widely used in the South, Southeast and Midwest of Brazil were used in the experiment. For each plant a suspension of 5,000 eggs + juveniles of second stage of *M. javanica* was inoculated into a sterile soil hole in 2-liter pots with six replications. The evaluation of root weight, number of galls, number of nematodes was 60 days after *M. javanica* inoculation. The results were subjected to analysis of variance, and the averages of each treatment were compared to each other by the Scott-Knott cluster test at 5% probability. Even though *M. javanica* presented $RF > 1.00$ in all soybean genotypes tested, different levels of susceptibility were observed. Thus, it was observed, among the lowest root-knot nematode reproduction, the M5947 IPRO, HO AMAMBAY IPRO, BMX GARRA IPRO and the lower was FPS ATALANTA IPRO.

Keywords: Root-knot nematode; *Glycine max*; Genetic control; Integrated management; Resistance.

INTRODUCTION

Soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) had about 35.82 million hectares cultivated in the 2018/19 crop in Brazil, producing 115 million tons (CONAB 2019). Soybean crop yield can be decreased with pests, diseases, weeds and other factors. Among the biotic factors, plant-parasitic nematode can generate losses above 30% in soybean crop (Agrios 2005; Araujo et al. 2012). There are approximately 100 species of nematodes that can parasitize soybean in Brazil and worldwide (Dias et al. 2010).

The plant-parasitic nematode genera reported as the most frequent in soybean are *Meloidogyne* Göldi 1887, *Heterodera* Ichinohe 1952, *Pratylenchus* Filipjev 1936 and, *Rotylenchus* Linford; Oliveira, 1940, being the root-knot nematode the most harmful to the culture (Antonio 1992, Gomes et al. 2003, Kirsch et al. 2016). In the genus *Meloidogyne*, the species *Meloidogyne javanica* (Treub, 1885) Chitwood 1949 for presenting a wide geographical distribution and wide host range (Soares, 2006), which includes weeds (Balardin et al. 2019, Ferraz et al. 2019), may lead to losses of 10 to 40% in soybean crop (Almeida et al. 2005, Miranda et al. 2011). Symptoms in soybean-parasitized crops are generally observed in patches, where plants are stunted and yellowish, and in roots there are galls of varying number and size, depending on cultivar susceptibility and nematode population density in the soil (Dias et al., 2010).

To minimize losses caused by nematodes, it is necessary to use a set of strategies to control this pest. Soares et al. (2016) explain that there are many ways to control nematodes, but most effective modes of management have limiting factors caused by nematode-like abilities, such as the ability to penetrate host plant roots that have thin cuticles (or absent) that are not resistant to the penetration of these

pests. Therefore, host plants that do not have basic plant-parasitic nematode defense characteristics should not be used in the integrated management of this pest.

Integrated management brings a combination of strategies to overcome or reduce the parasitic capacity of nematodes to plants. This type of management integrates biological control, crop rotation, chemical nematicides and resistant cultivars (Almeida et al. 2005, Lima et al. 2017). Thus, genetic management is one of the best ways to control nematodes, as it does not increase the cost of production for farmers and also helps to reduce the use of chemical nematicides, which benefits the environment (Teixeira 2013).

However, several soybean cultivars have been described as resistant or moderately resistant to *M. javanica*, although presenting low levels of resistance to *M. javanica*, under conditions of high soil nematode populations, this resistance may be overcome (Dias et al. 2010). Another reason for overcoming resistance is that most resistant cultivars are descended from the same source of resistance, the North American cultivar 'Bragg'. In addition to Bragg there are other cultivars that are used in breeding programs, such as the Cordell, Hartwig, Kirby and Leflore cultivars, but these cultivars are used less than 'Bragg' because of their difficulty in transmitting the resistance gene (Silva 2001; Dias et al. 2010; Schmitt and Belle 2016).

For Mazzetti et al. (2019), there is not enough information on the reaction of currently used commercial soybean cultivars, which makes it difficult to choose cultivars for infested areas. Therefore, this study aimed to evaluate the reaction of soybean cultivars to *M. javanica*.

MATERIALS AND METHODS

Thirty-seven soybean genotypes were used (Table 1). In these genotypes the reaction to *M. javanica* was evaluated in greenhouse under controlled temperature of 25°C ± 2°C.

Table 1. Description of commercial soybean genotypes with their respective agronomic characteristics.

Cultivars	Company	Growth habit	Maturation group
98Y52	Pioneer	Undetermined	8.5
BMX Raio IPRO	Brasmax	Undetermined	5.0
BMX Alvo RR	Brasmax	Undetermined	5.9
BMX Ativa RR	Brasmax	Determined	5.6
BMX Desafio RR	Brasmax	Undetermined	7.4
BMX Elite IPRO	Brasmax	Undetermined	5.5
BMX Foco IPRO	Brasmax	Undetermined	7.2
BMX Garra IPRO	Brasmax	Undetermined	6.3
BMX Lança IPRO	Brasmax	Undetermined	5.8
BMX Vanguarda IPRO	Brasmax	Undetermined	6.0
BMX Veloz RR	Brasmax	Undetermined	5.0
BMX Zeus IPRO	Brasmax	Undetermined	5.5
BRS 7380 RR	Embrapa	Undetermined	7.3
CD 2728 IPRO	Coodetec	Undetermined	7.2
DM 4309 IPRO	Dom Mario	Undetermined	6.1
DM 53154 IPRO	Dom Mario	Undetermined	5.4
FPS Atalanta IPRO	Fundação Pró-Sementes	Undetermined	5.8
FPS Urano RR	Fundação Pró-Sementes	Determined	6.2
FTR 2155 RR	FT Sementes	Undetermined	5.8
GMX Cancheiro RR	Gmax Genética Gaúcha	Undetermined	6.2
HO Amambay IPRO	HO Genética	Undetermined	5.8
HO Arinos RR	HO Genética	Undetermined	7.1
M 5947 IPRO	Monsoy	Undetermined	5.9
M 8210 IPRO	Monsoy	Determined	8.2
NS 4823 RR	Nidera Sementes	Undetermined	4.8
NS 5000 IPRO	Nidera Sementes	Undetermined	5.0
NS 5106 IPRO	Nidera Sementes	Undetermined	5.2
NS 5160 IPRO	Nidera Sementes	Undetermined	5.3
NS 5258 RR	Nidera Sementes	Unknown	-
NS 5445 IPRO	Nidera Sementes	Undetermined	5.4
P95R51	Pioneer	Undetermined	5.7
P95Y72	Pioneer	Undetermined	5.5
Produza IPRO	FAPA	Semi-determined	6.0
Rota 54 IPRO	Sementes Roos	Undetermined	5.4

SYN 13671 IPRO	Syngenta	Undetermined	7.3
AMS Tibagi RR	Melhoramento Agropastoril Ltda	Semi-determined	5.0
TMG 1180 RR	TMG	Semi-determined	8.0

FAPA - Agricultural Foundation for Agricultural Research; TMG - Tropical Breeding & Genetics

The population of *M. javanica* (Est.J3) used was obtained from Julio de Castilhos municipality, Rio Grande do Sul, Brazil, and multiplied in tomato 'Santa Cruz' (*Solanum lycopersicum*). The identification of root-knot nematode species was performed by electrophoresis using isoenzyme esterase (Est) in 7% polyacrylamide gel, according to Carneiro and Almeida (2001).

Individual soybean plants of different genotypes (Table 1) were kept in 2,000 dm³ pots with sterilized soil and inoculated with a suspension of 5,000 eggs + second stage (J2) of *M. javanica*, obtained according to Hussey and Barker method (1973) modified by Bonetti and Ferraz (1981). The method consists of grinding in a blender with the addition of 0.5% sodium hypochlorite followed by sieving and centrifugation with sucrose solution. Inoculation was performed in three 4 cm deep holes around each soybean plant. As a positive control of the treatments, and to confirm the viability of the inoculum, tomato plants "Santa Cruz" were used, which were inoculated with the same amount of inoculum *M. javanica* inoculated at the same time as soybean seedlings.

After 60 days of the inoculation of *M. javanica*, the roots of each soybean plant were separated from the shoot to evaluate the number of galls. Next, eggs + J2 were extracted from the roots of each plant, from each genotype, according to the methodology of Hussey and Barker (1973), modified by Bonetti and Ferraz (1981), to quantify and determine the reproduction factor (RF = final population / initial population) of *M. javanica* (Oostenbrink 1966). The RF was determined in each of the repetitions.

First, the roots of each plant were cleaned and weighed to obtain the weight of the root system, then processed to extract the nematodes, according to the methodology cited specifically for *Meloidogyne*. Subsequently, we counted the number of nematodes / roots to determine the reproduction factor (RF), using the methodology described above. Additionally, the number of nematodes per gram of root was estimated, defined by the ratio between the total number of nematodes and the total root mass, in grams, for each repetition.

The experimental design used in the experiment was completely randomized with six replications. Treatments with values of the different variables obtained in each repetition were subjected to analysis of variance, and the averages of each treatment were compared with each other by the Scott-Knott clustering test (1974) at 5% probability, using the software SISVAR (Ferreira 2011). In addition, the reaction of soybean genotypes was classified according to the RF values of each treatment, considering as resistant those whose nematode had $RF < 1.00$ and susceptible those with $RF > 1.00$.

RESULTS

All soybean cultivars tested were susceptible ($RF > 1.0$) to *M. javanica* (Table 2). However, different levels of susceptibility were observed among soybean cultivars. In tomato plants used to evaluate the viability of the inoculum of *M. javanica* the highest $FR = 53.3$ values were obtained, thus confirming the viability of the inoculum of the assay.

Table 2. Root system weight (RST), gall number (GN), number of nematodes per root gram (NNRG), reproduction factor (RF) and reaction of *Meloidogyne javanica* in soybean cultivars.

CULTIVARS	RST	GN	NNRG ¹	RF ²	Reaction ³
98Y52	19,0	396 c ⁴	2531 c	9,9 d	S
BMX RAI0 IPRO	23,0	546 a	1318 d	5,8 e	S
BMX ALVO RR	20,2	356 c	1587 d	6,2 e	S
BMX ATIVA RR	20,6	376 c	3546 c	9,2 d	S
BMX DESAFIO RR	18,7	303 c	1994 c	6,1 e	S
BMX ELITE IPRO	11,2	193 d	4513 b	8,3 d	S
BMX FOCO IPRO	24,5	346 c	1831 d	8,0 d	S
BMX GARRA IPRO	28,9	291 d	694 d	3,6 f	S
BMX LANÇA IPRO	20,7	275 d	1958 c	7,7 d	S
BMX VANGUARDA IPRO	15,6	600 a	9745 a	29,0 a	S
BMX VELOZ RR	26,9	311 c	1075 d	5,4 e	S
BMX ZEUS IPRO	27,3	311 c	1766 d	8,7 d	S
BRS 7380 RR	27,1	460 b	1045 d	5,3 e	S
CD 2728 IPRO	14,3	188 d	7804 a	22,2 b	S
DM 4309 IPRO	14,3	348 c	2368 c	6,2 e	S
DM 53I54 IPRO	7,0	531 a	9451 a	14,4 c	S
FPS ATALANTA IPRO	20,7	203 d	293 d	1,2 g	S
FPS URANO RR	22,6	438 b	2195 c	8,8 d	S
FT 2155 RR	20,9	308 c	1695 d	6,9 d	S
GMX CANCHEIRO RR	17,8	408 c	6494 b	11,1 d	S
HO AMAMBAY IPRO	27,7	319 c	925 d	4,4 f	S
HO ARINOS RR	21,6	533 a	1652 d	6,9 d	S
M 5947 IPRO	13,7	225 d	2158 c	4,9 f	S
M 8210 IPRO	26,8	351 c	1217 d	6,3 d	S
NS 4823 RR	14,9	243 d	5375 b	14,2 c	S
NS 5000 IPRO	23,6	650 a	2495 c	9,2 d	S
NS 5106 RR	25,0	575 a	3789 c	14,9 c	S
NS 5160 IPRO	26,0	460 b	1539 d	7,3 d	S
NS 5258 RR	25,5	555 a	2716 c	12,0 d	S
NS 5445 IPRO	19,9	286 d	2536 c	9,5 d	S
P95R51	19,5	268 d	3301 c	10,3 d	S
P95Y72	23,2	275 d	1622 d	7,6 d	S
PRODUZA IPRO	26,0	541 a	3625 c	18,1 c	S
ROTA 54 IPRO	10,1	293 d	3582 c	5,8 e	S
SYN 13671 IPRO	21,8	281 d	1979 c	7,5 d	S
AMS TIBAGI RR	20,7	591 a	4414 b	15,0 c	S
TMG 1180 RR	22,1	380 c	1305 d	5,4 e	S
Tomato	-	720	6667	53,3	S
CV (%)	-	23	33,4	18,7	

¹ Number of nematodes per gram of root: Ratio between the total number of nematodes and the total root mass.

² Reproduction factor (RF) = Final Population / Initial Population

³ Oostenbrink-based reaction (1966): Resistant (R) (RF < 1.0) and susceptible (S) (RF ≥ 1.0)

⁴ Means followed by the same letter in the column do not differ significantly by the Scott-Knott test at 5% probability of error;

Regarding the damage to the root system caused by *M. javanica*, the cultivars with the highest gall numbers, ranging from 531 to 650 galls were BMX RAI0 IPRO, BMX VANGUARDA IPRO, DM 53I54 IPRO, HO ARINOS RR, NS 5000 IPRO, NS 5106

I PRO, NS 5258 RR, PRODUZA I PRO and, AMS TIBAGI RR, not differing statistically from each other. The cultivars that presented the lowest gall number values, ranging from 188 to 293 galls were BMX Elite I PRO, BMX Garra I PRO, BMX Lança I PRO, CD 2728 I PRO, FPS Atalanta I PRO, M 5947 I PRO, NS 4823 RR, NS 5445 I PRO, P95Y51, P95Y72, ROTA 54 I PRO and SYN 13671 I PRO, not statistically different (Table 2)

Regarding the number of eggs and *M. javanica* J2 per gram of soybean roots, the cultivars with the lowest values were BMX Raio I PRO, BMX Alvo RR, BMX Foco I PRO, BMX Garra I PRO, BMX Veloz RR, BMX Zeus I PRO, BRS 7380 RR, FPS Atalanta I PRO, FT 2155 RR, HO Amambay I PRO, HO Arinos RR, M 8210 I PRO, NS 5160 I PRO, P95Y72 and TMG 1180 RR, ranging from 293 to 1831 eggs or J2 per gram of roots and differing statistically from the others. The highest values were observed in the cultivars BMX Vanguarda I PRO, CD 2728 I PRO and, DM 53154 I PRO, ranging from 7804 to 9745 eggs and J2 per gram of roots and statistically differing from the others (Table 2).

Regarding the reproductive capacity of *M. javanica* in the tested cultivars, it was observed that the cultivar FPS Atalanta I PRO presented the lowest RF = 1.2, statistically differing from the other cultivars, followed by BMX GARRA I PRO, HO Amambay I PRO and M 5947 I PRO, with RF of, 3.6, 4.4 and 4.9, respectively. For the highest RF value, it was observed in the cultivar BMX Vanguarda, with RF = 29.0, differing statistically from the other cultivars. Following the cultivar with the highest RF value is CD 2728, with RF = 22.2, also differing statistically from other cultivars (Table 2).

DISCUSSION

The use of resistant soybean cultivars can be effective for reducing plant-parasitic nematode populations in the soil (Soares and Santos 2009, Araújo et al. 2012). However, according to Carneiro et al. (2019), few cultivars were reported as resistant. Thus, it is decided to use cultivars in which the reproduction factor is the closest to 1, which allows the population to be reduced when combined with other integrated nematode management techniques.

Tihohod et al. (1988) and Mendes et al. (2001) evaluated in a greenhouse study the behavior of 24 cultivars and 73 soybean genotypes, all of which were classified as susceptible. Corroborating these data, Bruinsma and Antonioli (2015) evaluated 14 cultivars where all were classified as susceptible to *M. javanica*. As well as Kirsch (2016), who evaluated six soybean cultivars and all presented RF higher than 1, classifying them as susceptible to *M. javanica*.

However, Soares and Santos (2009) explain in a study that even considered susceptible to a cultivar, if the evaluated RF is close to 1, it can be considered less susceptible compared to high RF values. Thus, it is suggested that when there are no cultivars considered resistant to gall nematode available, it is preferred to cultivate with the lowest RF values. Sharma (1993) evaluated the reaction of 60 soybean genotypes to root-knot nematodes, where 12 were considered resistant. Corroborating this, Mazzetti et al. (2019) concluded in a reaction assay of 27 cultivars that 15 were classified as resistant with RF lower than 1.

Thus, the cultivars that were classified by Mazzetti et al. (2019) as resistant and contrary to the results obtained in the present work were the cultivars BMX Elite IPRO, GMX Cancheiro RR and M5947 IPRO. This may be linked to a number of factors, such as the aggressiveness of the pathogen used in the study, as Mattos (2016) considers that aggressiveness, virulence and host ability as factors that

interfere with plant-pathogen interaction, as well as climatic conditions that the plant was submitted. However, corroborating the results found in the present work, the cultivars BMX Ativa RR, BMX Lança IPRO, BMX Vanguarda IPRO, NS 5445 IPRO and, AMS Tibagi RR were classified as susceptible to *M. javanica* in both studies.

Alves et al. (2011) reports that cultivars with high reproductive factor, ie, RF greater than 1, should be avoided in areas with nematode presence, especially *M. javanica*. In addition, caution should be taken in the use of susceptible cultivars, as the degree of susceptibility may differ according to the species and population present in the soil and the climatic conditions of the crop (Li and Chen, 2005).

As *M. javanica* is an aggressive species with wide territorial distribution, the monoculture of susceptible hosts favors its multiplication (Bruinsma and Antonioli, 2015). Thus, a strategy for soil nematode control is rotation / succession with low potential host crops and the use of resistant soybean cultivars when commercially available (Dias-Arieira and Chiamolera, 2011), or the use of cultivars with low susceptibility that were presented in this study, being the cultivar FPS Atalanta IPRO the only evaluated cultivar that presented low levels of susceptibility with RF = 1,2. Thus, being the only cultivar suitable for use in crops with high populations of *M. javanica*.

The data obtained with the present work showed that all evaluated cultivars presented susceptibility reaction to *M. javanica*, but at different levels. In this sense, the susceptibility of soybean to root-knot nematode is an important indicator of the need for other control measures, since this species is widespread in cultivated areas. Although several management strategies are used to increase soybean crop productivity, none of them in isolation have been fully effective in keeping populations below the level of economic damage. This condition reflects the need to adopt other

control measures jointly in order to enable faster and, to a greater degree, the reduction of the initial nematode population in soybean cultivation areas, thus minimizing the problems caused by such pathogens.

Although the data obtained with the present work demonstrate that all evaluated genotypes have *M. javanica* susceptibility, the use of less susceptible genetic materials, associated with other management strategies, as previously discussed, may contribute to the increase of grain yield in areas contaminated with such a nematode. These measures include the incorporation of organic matter into the system, the use of antagonistic plants, crop rotation with non-host plants (Ferraz 2006; Santana-Gomes et al. 2014) and the use of systemic nematicides in culture (Agrofit, 2019), resistance inducers and use of biological nematicides. Thus, the use of these techniques together can contribute decisively to the reduction of plant-parasitic nematode populations in soybean areas in order to minimize the problems caused by such pathogens and, consequently, increase crop productivity.

However, it is very important that work of this nature continues, as many more soybean cultivars are released every year, and knowledge of their reaction to all plant-parasitic nematodes is extremely important to help increase productivity.

CONCLUSION

All soybean cultivars presented reproduction factor > 1.00 , being classified as susceptible, however, the soybean cultivars with the lowest susceptibility levels to *Meloidogyne javanica* are the M 5947 IPRO, HO Amambay IPRO, BMX Garra IPRO and FPS Atalanta IPRO cultivars.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was carried out with the support of CNPq, National Council for Scientific and Technological Development - Brazil (nº 131703/2019-6)

REFERENCES

AGRIOS GN. 2005. **Plant pathology**. Academic press.

AGROFIT. **Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários**. Available at:

http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons Accessed in: 24 out. 2019.

ALMEIDA AMR, FERREIRA LP, YORINORI JT, SILVA JFV, HENNING AA, GODOY CV, COSTAMILAN LM, MEYER MC. 2005. Doenças da soja. In: KIMATI H, AMORIM L & REZENDE JAM. (Eds.) Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. 4ª ed. São Paulo, **Agronômica Ceres**, p. 570-588.

ALVES TCU, SILVA RA, BORGES DC, MOTTA LCC, KOBAYASTI L. 2011. Reação de cultivares de soja ao nematoide das lesões radiculares *Pratylenchus brachyurus*. **Revista Biodiversidade**, 10:73-79.

ANTONIO H. 1992. Fitonematoides na cultura da soja. **Informe Agropecuário**, 16(172):60-65.

ARAUJO F, BRAGANTE R, BRAGANTE C. 2012. Controle genético, químico e biológico de meloidoginose na cultura da soja. **Pesquisa Agropecuária Tropical** 44(2): 220-224

BALARDIN RR, BELLE C, RAMOS RF, SOBUCKI L, NORA DD, ANTONIOLLI ZI . 2019. Reação de plantas daninhas a *Meloidogyne javanica*. **Ciências Agrárias: Campo promissor em Pesquisa** 5:149-157.

- BELLÉ C, KULCZYNSKI SM, KASPARY TE, KUHN PR. 2017. Plantas daninhas como hospedeiras alternativas para *Meloidogyne incognita*. *Nematropica*, 47(1):26-33.
- BELLÉ C, RAMOS RF, BALARDIN RR, KASPARY TE, ANTONIOLLI ZI. 2019. Reproduction of *Meloidogyne enterolobii* on weeds found in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, 44(4):380-384.
- BONETTI JIS, FERRAZ S. 1981. Modificações do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* em raízes de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, 6:553.
- BRUINSMA JSS, ANTONIOLLI ZI .2015. Resistance of *Meloidogyne javanica* in soybean genotypes. **Nematoda**, 2: e032015
- CARNEIRO RMDG, MOREIRA WA, ALMEIDA MRA, GOMES ACMM. 2001. Primeiro registro de *Meloidogyne mayaguensis* em goiabeira no Brasil. **Nematologia Brasileira**, 25:223-228.
- CARNEIRO RMDG, ALMEIDA MRA. 2001. Técnica de eletroforese usada no estudo de enzimas dos nematoides das galhas para identificação de espécies. **Nematologia Brasileira**, 25(1):35-44.
- CARNEIRO GES, DIAS WP, FOLONI JSS, SANTOS J.F, SOUZA CF, SILVA NETO SP, PEREIRA F.2019. Comportamento de genótipos de soja em área naturalmente infestada com *Meloidogyne incognita*. Embrapa Soja. Documentos, 413:112-115
- CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira de grãos. Brasília, Brasil, **Companhia Nacional de Abastecimento**. Available at: <<https://www.conab.gov.br/safra.asp>>, Accessed in: 24 out. 2019.
- DIAS-ARIEIRA CR, CHIAMOLERA FM. 2011. Cresce a incidência de nematoides em milho e soja. **Revista Campo e Negócios**, 97:18-21.

- DIAS WP, GARCIA A, SILVA JFV, CARNEIRO GES. Nematoides em soja: Identificação e Controle. Londrina: **Embrapa Soja**, 8p.
- FERRAZ LCCB. 2006. O nematóide *Pratylenchus brachyurus* e a soja sob plantio direto. **Revista Plantio Direto** (96):23-32.
- FERRAZ RR, et al. 2019. Plantas daninhas como hospedeiras dos nematoides-das-galhas. **Revista Agronomia Brasileira**, 3:erab201906.
- FERREIRA DF. 2011. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, 35(6):1039-1042.
- GOMES GS, HUANG SP, CARES JE. 2003. Nematode community, trophic structure and population fluctuation in soybean fields. **Fitopatologia Brasileira**, 28:258-266.
- HUSSEY RS, BARKER KRA. 1973. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp. Including a new technique. **Plant Disease Reporter**, 57:1.025-1.028.
- KIRSCH VG. 2016. Fitonematoides na cultura da soja: levantamento, Caracterização de espécies e reação de cultivares a *Meloidogyne* spp. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de Santa Maria, Frederico Westphalen, p. 86.
- LI YH, CHEN SY. 2005. Effect of the right gene on population development of *H. glycines*. **Journal of Nematology**, 37:168-177.
- LIMA FSO, CORREA VR, NOGUEIRA SR & SANTOS PRR. 2017. Nematodes affecting soybean and sustainable practices for their management. In M. Kasai (Ed.), Soybean – the basis of yield, biomass and productivity. **Rijeka: InTech**, p. 95–110.
- MATTOS V S, CORREA V R, MOITA AW, SANTOS DF, ALMEIDA MRA, CASTAGNONE-SERENO P, FURLANETTO C, CARNEIRO RMDG. 2016. *Meloidogyne* spp. populations from native Cerrado and soybean cultivated areas: genetic variability and aggressiveness. **Nematology**, 18(5): 505–515

- MAZZETTI V, et al. 2019. Reaction of soybean cultivars to *Meloidogyne javanica* and *Meloidogyne incognita*. **Revista Ceres**, 66(3):220-225.
- MENDES ML, CAMILO OC, VICENTE FR, RODRIGUEZ PBN. 2001. Reação de genótipos de soja [*Glycine max* (L.) Merrill] a *Meloidogyne javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949. **Nematologia Brasileira**, 25:89-93.
- MIRANDA DM, FAVORETO L, RIBEIRO NR. 2011. Nematoides: um desafio constante. In: SIQUERI F, CAJU J, MOREIRA M (Ed.) **Boletim de pesquisa de soja**. Rondonópolis, Fundação MT, p. 400-414.
- OOSTENBRINK M. 1966. Major characteristics of the relation between nematodes and plants. **Mededelingen Van De landbouwhogeschool Te Wageningen**, 66:01-46.
- SANTANA-GOMES SM, DIAS-ARIEIRA CR, BIELA F, RAGAZZI M, FONTANA LF, PUERARI HH. 2014. Crop succession in the control of *Pratylenchus brachyurus* in soybean. **Nematropica**, 44:200-206.
- SCHMITT J, BELLE C. 2016. Reação de cultivares de soja a *Meloidogyne javanica* E *M. incognita*. **Nematropica**, 46(1):76-80.
- SHARMA R. 1993. Reaction of soybean genotypes to *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, 17:9-10
- SILVA JFV. 2001. Resistência Genética de soja a nematoides do gênero *Meloidogyne*. In: SILVA, J. F. V. (Org.). **Relações parasitohospedeiro nas meloidoginoses da soja**. Londrina: Embrapa Soja, p. 95-127.
- SOARES P, DOS SANTOS J. 2009. Reação de cultivares de soja a uma população atípica de *Meloidogyne javanica*. **Bioscience Journal**, 25(2): 33-36.
- SOARES PLM, BARBOSA BFF, SANTOS JM, ALMEIDA EJ, MARTINELLI P. 2016. Controle biológico de fitonematoides com fungos nematófagos. In: HALFELD-VIEIRA

BA, MARINHO-PRADO JS, NECHET KL, MORANDI MAB, BETTIOL B. (Eds.) **Defensivos Agrícolas Naturais: Uso e Perspectivas**. Brasília, Embrapa, p. 177-213.

TEIXEIRA RA. 2013. Reação de cultivares de soja a *Meloidogyne incognita* e *M. javanica*. **Tese de Doutorado**. Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 60p.

TIHOHOD D, FERRAZ LCCB, VERDELHO MAR. 1988. Avaliação da resistência de cultivares de soja a *Meloidogyne javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949. **Nematologia Brasileira**, 12:141-148.

Artigo 2 nas normas da revista que se pretende submeter, Anais da Academia de Ciência Brasileira.

6. ARTIGO 2. PROSPECÇÃO DE TRICHODERMA PARA CONTROLE DE *Meloidogyne javanica* NA REGIÃO SUL DO BRASIL

Ricardo Rubin Balardin.^{1*}; Cristiano Bellé^{1,2}; Bruno Cherobini Piovesan¹;

Daiane Dalla Nora¹; Rodrigo Ferraz Ramos¹; Zaida Inês Antonioli¹

¹ Universidade Federal de Santa Maria, Avenida Roraima, 1000, 97105-900, Rio Grande do Sul, Santa Maria, Brasil.

² Instituto Phytus, Rua Duque de Caxias, 2319, 1º andar, 97060-210, Rio Grande do Sul, Santa Maria, Brasil.

Keywords: Biological control; Integrated management; gall nematode; Trichoderma.

Running title: Trichoderma no manejo de *Meloidogyne javanica*

Academy Section: Agrarian Sciences

*Author for correspondence, ricardorbalardin@gmail.com

RESUMO

O controle biológico é uma ferramenta utilizada no manejo integrado de nematoides. Os agentes antagonistas que apresentam maior potencial são fungos do gênero *Trichoderma*. Com isso, objetivou-se avaliar se isolados fúngicos de *Trichoderma*, oriundos de diferentes regiões do Brasil, controlam *Meloidogyne javanica*. Os isolados fúngicos foram utilizados para 2 testes *in vitro*, teste de parasitismo e teste de mortalidade e de inibição da eclosão dos nematoides, com 40 isolados. Foi realizada uma desinfecção da suspensão de nematoides, composta por ovos e juvenis de segundo estágio (J2). Os testes foram realizados em placas de Elisa. Para o teste de parasitismo foi colocada uma suspensão de esporos fúngicos de cada isolado. As avaliações foram conduzidas 21 dias após a aplicação. Para o teste de mortalidade e inibição da eclosão dos nematoides, foi realizado um filtrado fúngico para cada isolado para obter metabólitos nematotóxicos. A avaliação da mortalidade foi realizada 48 horas após a aplicação. A avaliação da inibição de eclosão dos nematoides foi realizada 21 dias após a aplicação. Os resultados apresentaram valores acima de 85,50% de parasitismo, 65,3% de mortalidade de J2 e 66% da eclosão de J2, por diferentes isolados. Conclui-se que todos isolados obtiveram resultados positivos em algum dos testes *in vitro* para o controle de *Meloidogyne javanica*, estes oriundos das 3 regiões.

Palavras chaves: Controle biológico; Manejo integrado; nematoide-das-galhas; *Trichoderma*; Nematicida.

INTRODUÇÃO

No mundo, existem aproximadamente 100 espécies de fitonematoides que impactam negativamente na produção da soja (*Glycine max* (L.) Merrill) (DIAS, et al. 2010). No Brasil, estas espécies são distribuídas principalmente entre os gêneros *Meloidogyne*, *Heterodera*, *Pratylenchus* e *Rotylenchus* (ALMEIDA et al., 2005; DIAS, et al. 2010; MATTOS, 2016; KIRSCH et al., 2016). Os nematoides-das-galhas, do gênero *Meloidogyne*, parasitam uma grande quantidade de culturas economicamente importantes, e isso faz com que sejam um dos principais gêneros de fitonematoides no Brasil e do mundo (SASSER, 1979; MOENS et al., 2009; COYNE et al., 2018).

Estima-se que as espécies deste gênero geram perdas de 10 a 40% na cultura da soja (ALMEIDA et al., 2005; MIRANDA et al., 2011). Para mitigar os danos causados pelos nematoides, demanda-se a realização do controle desta praga. O uso de nematicidas químicos para o controle de nematoides, mesmo efetivo, é pouco utilizado por estar relacionado à problemas ambientais. Por este motivo, buscou-se novas formas de utilização do nematicida químico visando mitigar os danos causados (THOMASON, 1987; SINGH et al. 2012; KUBO, et al. 2012).

Os problemas ambientais são considerados um fator determinante para a busca de novas ferramentas de controle (TZORTZAKAKIS e PETSAS, 2003). Uma alternativa ao uso dos nematicidas químicos é o uso do controle biológico dentro do manejo integrado (DAVIES et al., 1991; HUSSAIN et al., 2011; SINGH et al., 2012). Dentre os microrganismos responsáveis pelo biocontrole de nematoides estão os fungos, que podem controlar até 75% os nematoides (STIRLING, 1991; SIKORA, et al. 2007; SOARES et al. 2018).

Fungos do gênero *Trichoderma* são considerados por Sikora et al. (2007) um dos mais utilizados e mais promissores no controle biológico. Weindling (1932) publicou o primeiro trabalho que descreveu um isolado de *Trichoderma* como agente de biocontrole, e desde então, várias espécies do gênero têm sido pesquisadas e desenvolvidas como agentes de biocontrole para diversos patógenos (Mello et al. 2007). Contudo, se faz necessária a compreensão dos fatores que beneficiam ou prejudicam o potencial dos agentes, como o clima em que os isolados e as espécies de patógenos em que estejam adaptados.

Algumas espécies de *Trichoderma* têm recebido grande atenção da pesquisa devido a sua versatilidade de ação, que possuem potencial de produzir enzimas que degradam a parede celular, produzir substâncias antifúngicas, antibióticos (FORTES et al. 2007). Ademais, alguns isolados possuem diversas estratégias de sobrevivência que os tornam altamente competitivos no ambiente e com extraordinária capacidade de proliferação na rizosfera (MELO, 1996; RESENDE et al. 2004). Além disso, alguns isolados podem apresentar resistência à fungicidas, o que os torna bons agentes a serem usados nos sistemas agrícolas (RESENDE, et al. 2004). Todos estes fatores contribuem para que se busque isolados de *Trichoderma* para o manejo não só de nematoides, mas também de outros patógenos.

Em adição a isso, além de terem ótimas características de sobrevivência, os isolados apresentam diversos modos de ação para o controle de nematoides, como a produção de metabólitos ou pela habilidade de parasitar nematoides e seus ovos (SIKORA, et al. 2007). E, para completar, possui potencial estimulador de crescimento por ativar a produção hormonal, o que aumenta a produção de hormônios específicos que além de aumentarem a taxa de crescimento da planta, também ocorre a ativação de mecanismos de defesa da planta (RICHARDSON, 2001; VESSEY, 2003; FORTES et al. 2007).

Entretanto, segundo Louzada, et al. (2007), deve-se buscar agentes antagonistas nas mais diversas regiões do país, pois pode-se encontrar isolados para uso no controle biológico eficientes em qualquer região do Brasil, porque a maior parte dos isolados comerciais registrados no Brasil são oriundos do Centro-oeste e Sudeste, e nenhum de regiões com clima frio prolongado.

Pelo fato de agentes antagonistas possuírem períodos de adaptação, devido às alterações do ambiente e do clima, agricultores do Sul do Brasil que encontram dificuldade no controle de *M. javanica* necessitam de agentes prospectados na região em que se deseja realizar o controle, por este motivo, objetivou-se avaliar se isolados fúngicos de *Trichoderma*, e oriundos de diferentes locais do Brasil, controlam *Meloidogyne javanica*.

MATERIAL E MÉTODOS

O inóculo do nematoide-das-galhas, *M. javanica* (Est. J3), foi obtido em uma lavoura comercial de soja (*Glycine max*) no município de Júlio de Castilhos

(29°04'55.5"S 53°41'07.7"W). Posteriormente foi extraído os nematoides das raízes de soja pelo método de Hussey e Barker (1973) que consiste na trituração em liquidificador com adição de hipoclorito de sódio a 0,5% seguido de peneiramento e centrifugação com solução de sacarose, realizado no Laboratório de Biologia do Solo da Universidade Federal de Santa Maria.

Os nematoides extraídos foram inoculados em plantas de tomate “Santa Cruz” (*Solanum lycopersicum* L.), para manutenção da população. Os tomates permaneceram em casa de vegetação com temperatura controlada em 25°C ± 2°C. As fêmeas da população foram submetidas à eletroforese com a enzima esterase (CARNEIRO, et al. 2001) para confirmação da pureza da população.

Quarenta isolados de *Trichoderma* foram utilizados no presente trabalho (Tabela 1), oriundos de diferentes locais do Brasil.

Tabela 1 - Lista de isolados de *Trichoderma* obtidos de diferentes regiões do Brasil.

Código Original	Origem	Código do trabalho	Espécie
FW09	Sul	T1	<i>Trichoderma asperellum</i>
FW13	Sul	T2	<i>Trichoderma asperellum</i>
FW14	Sul	T3	<i>Trichoderma virens</i>
FW16	Sul	T4	<i>Trichoderma asperellum</i>
FW21	Sul	T5	<i>Trichoderma asperellum</i>
FW23	Sul	T6	<i>Trichoderma asperellum</i>
FW31	Sul	T7	<i>Trichoderma virens</i>
FW33	Sul	T8	<i>Trichoderma asperellum</i>
FW36	Sul	T9	<i>Trichoderma virens</i>
FW40	Sul	T10	<i>Trichoderma virens</i>
UFSMT1	Sul	T11	<i>Trichoderma virens</i>
PM50	Sul	T12	<i>Trichoderma harzianum</i>
PM63	Sul	T13	<i>Trichoderma harzianum</i>
UFSMT14	Sul	T14	<i>Trichoderma harzianum</i>
PF102	Sul	T15	<i>Trichoderma harzianum</i>
D33	Sul	T16	<i>Trichoderma asperellum</i>
DFS03	Sul	T17	<i>Trichoderma virens</i>
DFS04	Sul	T18	<i>Trichoderma asperellum</i>
DFS05	Sul	T19	<i>Trichoderma asperellum</i>
DFS06	Sul	T20	<i>Trichoderma harzianum</i>
DFS07	Sul	T21	<i>Trichoderma asperellum</i>
Pel210	Sul	T22	<i>Trichoderma asperellum</i>
Pel219	Sul	T23	<i>Trichoderma harzianum</i>
Pel221	Sul	T24	<i>Trichoderma asperellum</i>
Pel233	Sul	T25	<i>Trichoderma harzianum</i>
UFSMT36	Sul	T26	<i>Trichoderma asperellum</i>

UFSMT27	Sul	T27	<i>Trichoderma asperellum</i>
BIF0113	Sudeste	T28	<i>Trichoderma asperellum</i>
BIF0111	Sudeste	T29	<i>Trichoderma asperellum</i>
BIF0107	Sudeste	T30	<i>Trichoderma harzianum</i>
BIF0119	Sudeste	T31	<i>Trichoderma asperellum</i>
BIF0162	Sudeste	T32	<i>Trichoderma brevicompactum</i>
BIF0115	Sudeste	T33	<i>Trichoderma atroviride</i>
UFSMT34	Sul	T34	<i>Trichoderma asperellum</i>
UFSMT35	Sul	T35	<i>Trichoderma harzianum</i>
CCT-7589	Centro-Oeste	T36	<i>Trichoderma harzianum</i>
SF-04	Centro-Oeste	T37	<i>Trichoderma asperellum</i>
12616	Centro-Oeste	T38	<i>Trichoderma asperellum</i>
T-22	Centro-Oeste	T39	<i>Trichoderma harzianum</i>
ESALQ-1306	Sudeste	T40	<i>Trichoderma harzianum</i>

Os isolados de *Trichoderma* foram mantidos em placas de Petri contendo o meio de Batata-Dextrose-Ágar (BDA) e incubadas a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ em Demanda Bioquímica de Oxigênio (BOD).

Para o teste de parasitismo de *Trichoderma* em *M. javanica*, os ovos foram extraídos manualmente a partir de massas de ovos. Posteriormente foram colocados em tubo de ensaio com solução de hipoclorito de sódio a 0,5%, e agitados manualmente por um minuto. Após os ovos foram desinfestados com estreptomicina a 1% e mercaptaetanol a 0,1%, durante quatro minutos; lavados em água esterilizada e coletados com micropipeta.

A partir da suspensão obtida, foram adicionados 50 ovos, e transferidos para cavidades individuais de placas de Elisa. Em cada cavidade, juntamente com os J2, foi adicionado 100 μL de suspensão fúngica (10^8 conídios/ml). Em seguida as placas foram mantidas no escuro, em BOD, sob temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. As avaliações foram realizadas 21 dias após a aplicação do fungo. Determinou-se os números de ovos parasitados. Este teste foi repetido duas vezes para maior confiabilidade dos dados.

Foram preparados filtrados de cada um dos isolados. Para isso, cada fungo foi cultivado em placa de Petri, com meio de cultura BDA. Sete dias após a incubação a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, três discos de 5 mm de diâmetro foram retirados das bordas das culturas, e colocados em *Erlenmeyer* de 250 mL, contendo 100 mL de meio líquido Czapek Dox (0,5 g de KCl, 1 g de KH_2PO_4 , 2g de NaNO_3 , 30 g de sacarose, 0,01 g de $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e 0,5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ por 1000 mL de água destilada).

Os *Erlenmeyers* foram esterilizados utilizando a autoclave por 30 minutos. Em cada *Erlenmeyer* estéril foi colocado 1 isolado diferente. Os frascos foram mantidos em incubadora a 25°C com agitação constante, por 15 dias. Após esse período, todo o conteúdo de cada *Erlenmeyer* foi filtrado em membrana de acetato celulose, com 0,22 µm de abertura. Para cada isolado, trocou-se a membrana de acetato celulose. Os filtrados fúngicos obtidos foram mantidos refrigerados por 48 horas a uma temperatura de 6 a 10°C ± 2°C, até o estabelecimento do ensaio.

Para o teste de mortalidade de juvenis de segundo estágio (J2) de *M. javanica* foi seguida a metodologia do funil de Baermann modificado por Christie e Perry (1951). A suspensão com J2 foi obtida a partir da câmara de eclosão com lenço de papel (Whatman 3mm) Dessa suspensão, foram retirados 50 nematoides, através da captura individual.

Posteriormente, foi realizada a pipetagem de 20 µL de água, e adicionados 80 µL dos filtrados fúngicos, contidos em tubos *Eppendorf* (1,5 mL), juntamente com 50 nematoides capturados, colocados em cavidades individuais da placa de Elisa. Após 48 horas da aplicação da suspensão de nematoides foi avaliado a mortalidade de nematoides.

Para o teste de eclosão, a suspensão de ovos foi obtida conforme metodologia de Hussey e Barker (1973), que foi colocado 50 ovos por cavidade da placa de Elisa. A avaliação foi feita no 21º dia, quando foi realizada a contagem dos 50 ovos visualizados.

Em cada tratamento foram feitas oito repetições, mantidas a 25 °C, no escuro. Estes testes foram repetidos duas vezes, visando aumento na confiabilidade dos dados. Foi colocado duas testemunhas, uma contendo somente água destilada e outra contendo somente meio Czapek Dox.

O delineamento experimental do experimento utilizado foi inteiramente casualizado com oito repetições para cada tratamento, e cada isolado fúngico correspondeu a um tratamento (40 isolados). As variáveis avaliadas foram: número de nematoides J2 mortos, contagem da eclosão de J2 e contagem do número de ovos parasitados.

Os resultados foram submetidos à análise de variância, e as médias de cada tratamento comparadas entre si pelo teste de agrupamento de Scott-Knott (1974) a 5% de probabilidade, pelo software SISVAR (FERREIRA, 2011).

Para a identificação molecular dos isolados de *Trichoderma* spp., um disco colonizado com o fungo foi depositado em uma placa de *Petri* com meio BDA e após incubado a 25°C até que o micélio encontre a borda da placa. Após o seu crescimento, a massa fúngica foi coletada e macerada em nitrogênio líquido utilizando pistilo e almofariz de porcelana previamente esterilizados. O DNA genômico total foi extraído pelo método descrito por Doyle & Doyle (1990).

Os macerados dos isolados de *Trichoderma* foram colocados em microtubo de 1,5 mL com 400 µL de solução de extração (Tris-HCl 100 mM pH 8,0; EDTA 20 mM pH 8,0; NaCl 1,4 M; CTAB 2%; PVP 1%; 2-Mercaptoetanol 0,1% e Proteinase K 0,01%) previamente aquecido à 65°C por 3 minutos e agitado em vórtex por 10 segundos. E após, foi incubado em banho-maria a 65°C por 45 min, agitando a cada 15 min.

Em seguida, foram acrescentados 400 µL de clorofórmio e agitado por suaves inversões, durante 5 min. Após, foi centrifugado a 14000 rpm, 20°C, por 5 min. Após a centrifugação foi retirado aproximadamente 400 µL da fase aquosa e transferido para um novo microtubo de 1,5 mL, onde foi adicionado 200 µL de isopropanol (2-propanol) gelado e homogeneizado por suaves inversões por 1 min e incubado a -20°C por 30 min. A solução foi centrifugada a 1400 rpm, 20°C, por 5 min. O sobrenadante foi descartado, mantendo somente o pellet no fundo do microtubo. Para precipitação do DNA, foi adicionado ao tubo 200 µL de etanol 70% gelado (4°C), seguido de centrifugação à 14000 rpm a 4°C, por 5 min e o sobrenadante foi descartado mantendo o pellet formado. O precipitado foi seco à temperatura ambiente, e recuperado em volume de 50 µL de TE [1 mM de Tris e 0,1 mM EDTA] + RNase e incubado a 37 °C por 30 min., e foi quantificado e armazenado seu DNA a -20 °C até a sua utilização.

As amostras de DNA genômico extraídas dos fungos foram submetidas à reação em cadeia da polimerase (PCR), visando amplificação parcial do gene do fator de alongação (EF-1α) sendo utilizados os primers 5'-ATGGGTAAGGARGACAAGAC-3' e 5'-GGARGTACCAGTSATCATGTT3-'. Para a reação de amplificação foram adicionados 3 µL do DNA dos fungos para o volume final da reação de PCR de 25 µL, contendo 10 mM Tris HCl pH 8,3; 50 mM KCl; 1,1 mM MgCl₂; 10 mM de cada dNTP; 25 nmoles de cada primer EF1 e EF2; 1,5 µL de Taq DNA polimerase (Invitrogen, Brasil) e água ultrapura para completar o volume da reação. Um controle negativo sem DNA foi incluído na PCR.

As reações de amplificação foram efetuadas em termociclador (Applied Biosystems 2720, Thermo Fisher Scientific, EUA), sob as seguintes condições de ciclo: 94°C por 1 min, 35 ciclos de 95°C por 3 min, 95° C por 1 min, 72° C por 1 min e 30 s, e 72° C por 10 min. Ao final da reação, os fragmentos amplificados foram mantidos a 4 °C. Para verificar a amplificação, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 1,5%, em tampão TBE 1X, corado com Sybr Gold (Invitrogen, Brasil).

Os produtos da PCR foram purificados com o kit Gen Elute PCR clean-up Kit® (Sigma, EUA) e sequenciados (ABI PRISM 3100, Thermo Fisher Scientific, EUA). As seqüências foram analisadas no programa Staden Package 2.0.0b (Staden et al., 2003) para a obtenção dos consensos.

O alinhamento das seqüências nucleotídicas obtidas foi realizado nos programas Clustal W e Clustal X (THOMPSON et al. 1997), sendo utilizadas para as comparações seqüências depositadas nas bases de dados. O método de *Neighbour-joining*, com modelo Jukes-Cantor, foi utilizado para estimar a distância evolutiva. A árvore filogenética foi construída no programa MEGA 7.0, com o algoritmo *Maximum Likelihood* e os valores de *bootstrap* calculados com 1.000 replicatas.

RESULTADOS

A porcentagem de parasitismo dos isolados à *Meloidogyne javanica*, todos os isolados apresentaram valores de ovos parasitados acima de 85,50% (T9) (Tabela 2). Os isolados fúngicos que se destacaram foram T14, T15, T17, T27, T31, T33, T37, T38, T39 e T40, e possuem 98,68; 96,81; 98,81; 98,43; 97,93; 98,68; 98,43; 98,43; 98,31 e, 99,00% de mortalidade por parasitismo, respectivamente, se distinguindo dos demais estatisticamente.

Tabela 2. Efeito do parasitismo de isolados de *Trichoderma* spp. em *Meloidogyne javanica*.

Isolados	% de Ovos Parasitados	
Testemunha	0,00	F
T1	92,62	C
T2	90,87	C
T3	87,81	E
T4	91,56	C
T5	93,37	C
T6	88,12	E

T7	91,25	C
T8	87,62	E
T9	85,50	E
T10	93,37	C
T11	94,62	B
T12	90,43	C
T13	89,87	D
T14	98,68	A
T15	96,81	A
T16	92,50	C
T17	98,81	A
T18	95,00	B
T19	93,31	C
T20	94,81	B
T21	94,18	B
T22	95,75	B
T23	92,62	C
T24	94,06	B
T25	94,87	B
T26	92,18	C
T27	98,43	A
T28	89,75	D
T29	89,68	D
T30	93,93	B
T31	97,93	A
T32	92,62	C
T33	98,68	A
T34	96,18	B
T35	94,12	B
T36	95,68	B
T37	98,43	A
T38	98,43	A
T39	98,31	A
T40	99,00	A
CV (%)	4,37	

As letras diferenciam-se entre si pelo teste de Scott-Knott $p \leq 5\%$.

Com relação a mortalidade do *M. javanica* (Tabela 3), os isolados que obtiveram as menores porcentagens foram os T4 e T18, com respectivamente, 70,8 e 65,3 % de mortalidade, diferindo dos demais estatisticamente. Já os isolados que obtiveram os maiores valores de mortalidade foram os T13, T17, T24, T27, T29, T30, T31, T32, T33, T34, T35, T36, T37, T38, T39, T40, com respectivamente, 90,10; 88,70; 85,80; 91,80; 91,90; 91,70; 85,00; 92,20; 91,90; 91,60; 91,00; 93,10; 90,90; 90,80; 90,60 e, 91,70% de mortalidade, diferindo dos demais estatisticamente.

O isolado que teve menor efeito nematicida e nematostático foi o T10, com 66% de inibição da eclosão de J2, e se diferiu dos demais isolados estatisticamente.

Já os isolados de *Trichoderma* que apresentaram os maiores valores de inibição da eclosão foram T30, T32, T33, T34, T35, T36, T37, T38, T39, T40, com porcentagens, de 93,40; 92,50; 92,60; 94,00; 91,80; 94,40; 93,80; 91,60; 91,90 e, 91,80%, respectivamente, e se diferiram dos demais estatisticamente.

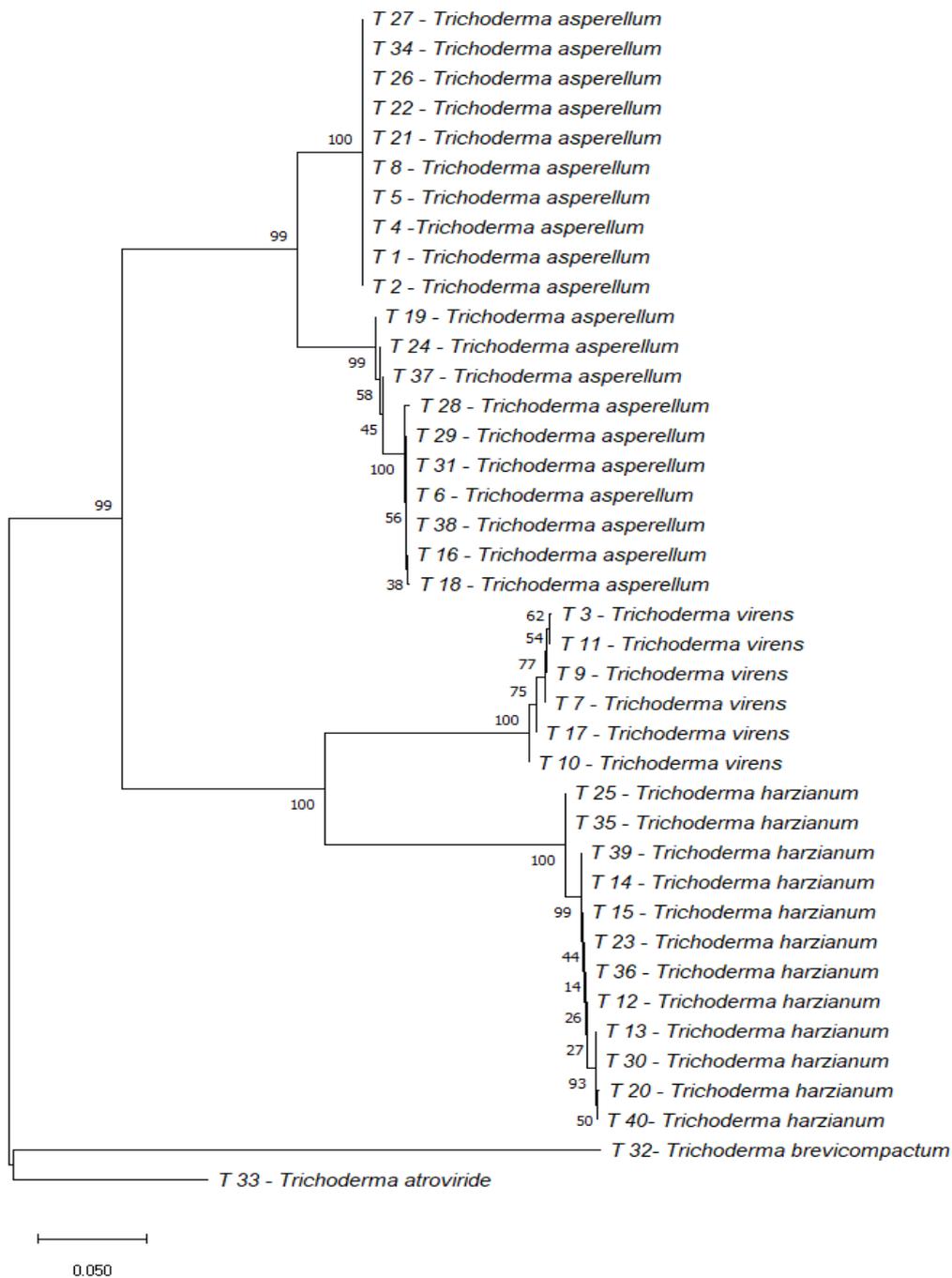
Tabela 3 - Efeito nematicida e nematostático de metabólitos dos filtrados fúngicos.

Tratamentos	% de Mortalidade J2		% Inibição da Eclosão de J2	
Testemunha H ₂ O	6,30	E	8,00	F
Testemunha Czapek Dox	5,00	E	7,10	F
T1	74,90	C	84,60	C
T2	80,40	B	81,50	C
T3	81,70	B	73,10	D
T4	70,80	D	84,90	C
T5	81,50	B	79,40	C
T6	84,30	B	80,60	C
T7	82,50	B	83,50	C
T8	77,90	B	86,00	C
T9	75,90	C	83,60	C
T10	80,30	B	66,00	E
T11	79,20	B	84,80	C
T12	79,40	B	85,30	C
T13	90,10	A	87,30	B
T14	83,00	B	87,20	B
T15	84,20	B	86,70	B
T16	75,50	C	77,70	C
T17	88,70	A	87,20	B
T18	65,30	D	85,30	C
T19	74,80	C	85,50	C
T20	79,30	B	83,60	C
T21	78,90	B	81,50	C
T22	80,20	B	79,90	C
T23	80,80	B	79,70	C
T24	85,80	A	88,70	B
T25	81,20	B	85,20	C
T26	82,40	B	83,80	C
T27	91,80	A	88,30	B
T28	74,80	C	82,90	C
T29	91,90	A	88,50	B
T30	91,70	A	93,40	A
T31	85,00	A	87,20	B
T32	92,20	A	92,50	A
T33	91,90	A	92,60	A
T34	91,60	A	94,00	A
T35	91,00	A	91,80	A

T36	93,10	A	94,40	A
T37	90,90	A	93,80	A
T38	90,80	A	91,60	A
T39	90,60	A	91,90	A
T40	91,70	A	91,80	A
CV (%)	6,90		7,80	

As letras diferenciam-se entre si pelo teste de Scott-Knott $p \leq 5\%$.

Figura 1. Dendrograma das sequências parciais do gene do fator de alongação EF-1 α (TEF) dos isolados de *Trichoderma* spp., conforme discriminado na Tabela 1, através do método Maximum Likelihood baseado no modelo Jukes-Cantor.



Os isolados de *Trichoderma* foram identificados por técnicas moleculares como pertencentes as espécies *T. asperellum*, *T. harzianum*, *T. virens*, *T. brevicompactum* e *T. atroviride*, observados 20 exemplares de *Trichoderma asperellum*, 12 exemplares de *T. harzianum*, 6 exemplares de *T. virens*, e 1 exemplar de *T. brevicompactum* e 1 exemplar de *T. atroviride*.

DISCUSSÃO

Neste estudo observou-se que todos os isolados apresentaram, em algum nível, potencial de controle de *M. javanica*, tanto por parasitar ovos, quanto por produzir metabólitos por matar e/ou inibir a eclosão de J2. Todos os fungos testados apresentaram potencial parasítico para o *M. javanica*, com valores mínimos de 85,50%. Dez isolados fungicos destacaram-se com valores acima de 97,93%, oriundos do Sudeste (3), Centro-oeste (3) e Sul (4), ressaltando que foram utilizados 4 isolados comerciais do Centro-oeste e 1 do Sudeste.

Estes dados corroboram com Zhang et al. (2015), em que obtiveram valores de 87,9% de mortalidade de *M. incognita* após 72 horas de aplicação de *Trichoderma* em um trabalho também *in vitro*. Além das capacidades parasíticas, o *Trichoderma* tem como outras formas de controlar o *M. javanica* a produção de metabólitos nematicidas (FREITAS et al. 1995; GOSWAMI et al. 2008).

A produção dos metabólitos pelos fungos, por meio de filtrados fúngicos, mostrou resultados positivos para o biocontrole de *M. javanica*, obtendo valores mínimos de 65,3 e 70,8% de mortalidade em 2 isolados, porém, 16 isolados obtiveram valores acima de 85% de mortalidade, oriundos do Sudeste (6), Centro-Oeste (4) e Sul (6), ressaltando que foram utilizados 4 isolados comerciais do Centro-oeste e 1 do Sudeste. Freitas, et al. (2011) relataram que isolados de *Trichoderma* reduziram significativamente a reprodução de nematoide-das-galhas (*M. incognita*), mesmo que não tenham inibido a reprodução do mesmo. Entretanto, uma das causas dessa redução está ligada a produção de metabólitos tóxicos, característica desejada no caso de agentes biológicos incluídos controle biológico (HOWELL, 2003).

Freitas, et al. (2012) também encontraram efeito positivo na mortalidade de J2 de nematoides em seus isolados testados *in vitro*, após 24h da aplicação. É mencionado por Devrajan e Seenivasan (2002) que filtrados de *Trichoderma*

possuem efeito tóxico sobre adultos de *Meloidogyne* sp. O mesmo foi observado por Costa (2001), em que todos filtrados apresentaram atividade tóxica contra *M. incognita*, obtendo 98% de J2 imóveis e mortos.

A produção de metabólitos pelos fungos teve efeitos positivos na inibição da eclosão de J2, onde os isolados obtiveram valores acima de 66% de inibição da eclosão de J2. E os isolados com maior potencial, 10 isolados, apresentaram valores acima de 91,6% de inibição da eclosão de J2, oriundos do Sudeste (4), Centro-oeste (4) e Sul (2), ressaltando que foram utilizados 4 isolados comerciais do Centro-oeste e 1 do Sudeste. Este potencial também foi observado por Al-Hazmi & Tariqjaveed (2016), onde isolados de *Trichoderma* suprimiram a reprodução de *M. javanica* e estimularam o crescimento de plantas de tomate.

Sharon et al. (2001) sugerem que algumas espécies de *Trichoderma* que possuem potencial para colonizar ovos e J2 de *M. javanica* necessitam de mecanismos facilitadores para a penetração da cutícula do nematoide e da casca dos ovos. Um desses mecanismos correspondem a produção de enzimas líticas que auxiliam na penetração do fungo, especialmente observado no *Trichoderma harzianum* (SPIEGEL et al. 2005; ALBEHADELI et al. 2019). A infecção de ovos de nematoide por isolados de *Trichoderma* é possível devido ao aumento da atividade de enzimas como quitinases e proteases quando o fungo entra em contato com os ovos e J2s (SAHEBANI e HADAVI, 2008).

Outro indício positivo de que o *Trichoderma* possui potencial de controle de ovos e J2 de nematoides é pelas observações de Sharon et al. (2007) em que foi constatado que a matriz gelatinosa em que os nematoides depositam os ovos é uma rica fonte de nutrientes para *Trichodermas*, com isso, o fungo é atraído por esta matriz gelatinosa e realiza o controle dos ovos e J2.

Kiriga et al. (2018) concluíram que dois isolados de *Trichoderma* (*T. asperellum* M₂RT₄ e *Trichoderma* sp. MK₄) e dois isolados de *P. lilacinum* reduziram significativamente a quantidade de ovos eclodidos, entre 60,8 e 81,8%. No mesmo trabalho, foi observado que *T. asperellum* M₂RT₄ foi o isolado mais eficiente para o controle de galhas, massa de ovos e de ovos depositados, reduzindo respectivamente, 81,8, 78,5 e 88,4%, indicando que isolados desta espécie possuem potencial de biocontrole. Ambos resultados coincidem com os dados de mortalidade de ovos e J2 e inibição da eclosão de J2, obtidos neste trabalho. Em contrapartida, o *T. atroviride* F₅S₂₁ não teve efeito significativo em comparação ao controle, o que vai

em desconcontro ao resultado obtido no presente trabalho, que o *T. atroviride* (T33) apresentou resultados positivos no parasitismo, na mortalidade e na inibição da eclosão de J2.

Harman (1991) salienta que resultados com antagonistas obtidos *in vitro* podem não corresponder aos resultados obtidos em casa de vegetação e à campo, já que os organismos apresentam reações diferentes em relação ao hospedeiro ou ambiente, indicando a necessidade de conduzir estes trabalhos à campo.

Louzada, et al. (2009) testaram 230 isolados, sendo somente 8 pertencentes à região Sul, mas que todos devem ser mantidos como potenciais agentes antagonistas. Os autores afirmam sobre a importância de realizar uma prospecção de agentes de controle biológico, principalmente fungos, em toda área territorial brasileira, pois bons antagonistas estão dispersos por diferentes regiões do país.

Assim, ao verificar que os isolados comerciais (T36 ao T40) foram isolados em diferentes regiões do Sudeste e Centro-Oeste brasileiro, e também de empresa privada (T28 a T33) da região Sudeste, e os demais tratamentos foram isolados de diferentes locais no Rio Grande do Sul, da região Sul, com adaptações climáticas diferentes, pôde-se observar que se obteve resultados positivos, tanto na mortalidade via parasitismo quanto via produção de metabólitos e inibição de eclosão de J2, nos isolados advindos do Sul brasileiro.

Com isso, se abre uma oportunidade de pesquisa na prospecção de fungos em regiões mais frias do país. Como observado nos resultados obtidos no estudo, há agentes de controle biológico eficientes no controle de nematoide-das-galhas nessas regiões mais frias, o que se leva a acreditar na ocorrência de mais agentes antagonistas à outras pragas, fomentando ainda mais o mercado biológico no Brasil.

Finalmente, se conclui que os agentes obtidos para o controle de *Meloidogyne javanica* são ferramentas que fazem parte do manejo integrado, o que consiste em várias estratégias diferentes, o qual não limita a somente um tipo de controle. E é sugerido que sejam realizados trabalhos complementares em casa de vegetação e à campo com todos os isolados obtidos para que se possa ter uma ideia de como estes isolados se comportarão no ambiente. Além disso, com esta prospecção, aumenta-se a quantidade de organismos isolados e passíveis de serem testados em diversos alvos, aumentando as chances de encontrarmos agentes de biocontrole.

CONCLUSÕES

Todos os isolados de *Trichoderma* testados apresentaram potencial para biocontrole de *Meloidogyne javanica*, por meio de parasitismo ou por produzir metabólitos nematotóxicos capazes de matar os nematoides.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi realizado com o apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Brasil (nº 131703 / 2019-6)

REFERÊNCIAS

- AL-HAZMI A, TARIQJAVEED M. 2016. Effects of different inoculum densities of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride* against *Meloidogyne javanica* on tomato. **Saudi Journal of Biological Sciences**, 23(2):288-292.
- ALBAHADLI Y, MAMARABADI M, MAHDIKHANI MOGHADAM E. 2019. Possibility of the biocontrol of *Meloidogyne javanica* using the fungus *Trichoderma harzianum* under greenhouse condition. **Plant Archives**, v. 19.
- ALMEIDA, A. M. R.; FERREIRA LP, YORINORI JT, SILVA JFV, HENNING AA, GODOY CV, COSTAMILAN LM & MEYER MC. 2005. Doenças da soja. In: KIMATI H, AMORIM L & REZENDE JAM (Eds.) Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. 4ª ed. São Paulo, **Agronômica Ceres**. p. 570-588.
- BONETTI JIS, FERRAZ S. 1981. Modificações do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* em raízes de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, 6:553.
- CARNEIRO RMDG, MOREIRA WA, ALMEIDA MRA, GOMES ACMM. 2001. Primeiro registro de *Meloidogyne mayaguensis* em goiabeira no Brasil. **Nematologia Brasileira**, Brasília, 25:223-228.
- CHRISTIE JR, and PERRY VG. 1951. Removing nematodes from soil. **Proceedings of Helminthological Society of Washington**, 18:106-108.
- Costa MJN. 2001. Toxicidade de filtrados fúngicos a *Meloidogyne incognita*. **Fitopatologia Brasileira**, 26:749-755.
- COYNE, et al. 2018. Plant-Parasitic Nematodes and Food Security in Sub-Saharan Africa, **Annual Review of Phytopathology**, 56:381-403.

- DAVIES KG, LAIRD V, KERRY BR. 1991. The motility, development and infection of *Meloidogyne incognita* encumbered with spores of the obligate hyperparasite *Pasteuria penetrans*. **Revue de Nematologie**, 14:611–618
- DEVRAJAN K, e SEENIVASAN N. 2002. Biochemical changes in banana roots due to *Meloidogyne incognita* infected with *Paecilomyces lilacinus*. **Current Nematology**, Bigleswade, 13(1):1-5.
- DIAS WP, et al. 2010. Nematoides em soja: Identificação e Controle. Londrina: **Embrapa Soja**, p. 8.
- DOYLE JJ, DOYLE JL. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, 12:13-15.
- FERREIRA DF. 2011. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, 35(6):1039-1042.
- FORTES FO, SILVA ACF, ALMANÇA MAK, & TEDESCO SB. 2007. Promoção de enraizamento de microestacas de um clone de *Eucalyptus* sp. por *Trichoderma* spp. **Rev. Árvore**, 31(2):221-228.
- FREITAS MA. et al. 2012. Seleção de *Trichoderma* spp. como potenciais agentes para biocontrole de *Meloidogyne incognita* em cana-de-açúcar [Screening *Trichoderma* spp. as potential agents for biocontrol of *Meloidogyne incognita* in sugarcane]. **Nematropica**, 42(1):115-122.
- GOSWAMI J, PANDEY RK, TEWARI JP and GOSWAMI BK. 2008. Management of root- knot nematode on tomato through application of fungal antagonists, *Acremonium strictum* and *Trichoderma harzianum*. **Journal of Environmental Science and Health**, 43:237–240.
- HARMAN GE. 1991. Seed treatment for biological control of plant disease. **Crop Prot.** 10(3):166-171.
- HOWELL CR. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* Sspecies in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. **Plant Disease**, 87(1):4-10.
- HUSSAIN MA, MUKHTAR T, KAYANI MZ. 2011. Efficacy evaluation of *Azadirachta indica*, *Calotropis procera*, *Datura stramonium* and *Tagetes erecta* against root-knot nematodes *Meloidogyne incognita*. **Pakistan Journal of Botany**, 43:197–204.
- HUSSEY RS, BARKER KR. 1973. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. **Plant Disease Reporter**, St. Paul, 57:1.025-1.028.

- KIRIGA AW, et al. 2018. Effect of *Trichoderma* spp. and *Purpureocillium lilacinum* on *Meloidogyne javanica* in commercial pineapple production in Kenya. **Biological control**, 119:27-32.
- KIRSCH VG, et al. 2016. Characterization of *Meloidogyne* and *Helicotylenchus* species associated with soybean in Rio Grande do Sul State. **Nematropica**, 46:197-208.
- KUBO RK, MACHADO ACZ, OLIVEIRA CMG. 2012. Efeito do tratamento de sementes no controle de *Rotylenchulus reniformis* em dois cultivares de algodão. **Arquivos Instituto Biológico**, 59(1/2):239-245.
- LOUZADA GAS, et al. 2009. Potencial antagônico de *Trichoderma* spp. originários de diferentes agroecossistemas contra *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium solani*. **Embrapa Arroz e Feijão-Artigo em periódico indexado (ALICE)**.
- MATTOS V, et al. 2016. *Meloidogyne* spp. populations from native Cerrado and soybean cultivated areas: genetic variability and aggressiveness. **Nematology**, 18:505-515.
- NELSON E, KAGEYAMA K, DIJK KV, & WINDSTAM S. 2004. Biological control of soilborne diseases: Important concepts from a model system. In A. Vanachter (Ed.) **Proc. XXVI IHC - Managing Soil-Borne Pathogens**. Toronto, Canada: Can. Int. Dev. Agency (CIDA), p. 635.
- MELO IS. 1996. *Trichoderma* e *Gliocladium* como bioprotetores de plantas. **Revis. Anu. Patol. Plantas**, 4(1):261-295.
- MELLO SCM, ÁVILA ZR, BRAÚNA LM, PÁDUA RR & GOMES D. 2007. Cepas de *Trichoderma* para el control biológico de *Sclerotium rolfsii* Sacc. **Fitosanidad**, 11(1):3-9
- MIRANDA DM, FAVORETO L & RIBEIRO NR. 2011. Nematoides: um desafio constante. In: SIQUERI F, CAJU J & MOREIRA M (Ed.) **Boletim de pesquisa de soja** 2011. Rondonópolis, Fundação MT. p.400-414.
- MOENS M, et al. 2009. *Meloidogyne* species—a diverse group of novel and important plant parasites. **Root-knot nematodes**, 1:483.
- OOSTENBRINK M. 1966. Major characteristics of the relation between nematodes and plants. **Mededelingen Van De landbouwhogeschool Te Wageningen**, 66:01-46.
- RESENDE ML, et al. 2004. Inoculação de sementes de milho utilizando o *Trichoderma harzianum* como promotor de crescimento. **Cienc. Agrotec.** 28(4):793-798.

- RICHARDSON AE. 2001. Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. **Australian Journal of Plant Physiology**, 28:897-906.
- SASSER JN, 1979. Economic importance of Meloidogyne in tropical countries. In: Root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp): **Systematics, Biology and Control** (F. Lamberti, C.E. Taylor, ed.), Academic Press, NY, USA, p. 359–374
- SAHEBANI N, HADAVI N. 2008. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. **Soil Biology & Biochemistry**, 40(2):2016-2020.
- SHARON E, et al. 2007. A Parasitism of *Trichoderma* on *Meloidogyne javanica* and role of the gelatinous matrix. **Eur J Plant Pathology**, 118(3):247-258.
- SHARON E, et al. 2001. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. **Phytopathology**, 91:687-693.
- SIKORA RA, SCHÄFER K, DABABAT AA. 2007. Modes of action associated with microbially induce in planta suppression of plant-parasitic nematodes. **Australasian Plant Pathology**, 36:124-134.
- SINGH V, MAWAR R, and LODHA S. 2012. Combined effects of biocontrol agents and soil amendments on soil microbial populations, plant growth and incidence of charcoal rot of cowpea and wilt of cumin. **Phytopathologia Mediterranea** 51, 307–316.
- SOARES FEF, SUFIATE BL, DE QUEIROZ JH. 2018. Nematophagous fungi: Far beyond the endoparasite, predator and ovicidal groups. **Agriculture and Natural Resources**, 52(1):1-8.
- SPIEGEL Y, and CHET I. 1998. Evaluation of *Trichoderma* spp. As biocontrol agent against soilborne fungi and plant-parasitic nematodes in Israel. **Integrated Pest Managemnt Reviews**, Israel, 3:169-175.
- STADEN R, JUDGE DP, BONFIELD JK. 2003 – Analysing sequences using the Staden package and EMBOSS. **Introduction to Bioinformatics**. A Theoretical and Practical Approach. Eds. Stephen A. Krawetz and David D. Womble. Human Press Inc., Totawa, NJ 07512. p. 393– 410.
- STIRLING GR. 1991. Biological Control of Plant Parasitic Nematodes. Progress, Problems and Prospects. UK: **CAB International**, Wallingford, p.282.
- SWOFFORD DL. 2002. PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony, version 4.0b10. Sinauer, Sunderland.

- THOMASON IJ. 1987. Challenges facing nematology: environmental risk with nematicides and the need for new approaches. In: **Vistas on Nematology** (VEECH JA, DICK-SON DW, ed.), Hyattsville, MD, Society of Nematologists, USA, p. 469–479.
- THOMPSON JD, et al. 1997. The CLUSTAL_X Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, 25:4876-4882.
- TZORTZAKAKIS EA and PETSAS SE. 2003. Investigation of alternatives to methyl bromide for management of *Meloidogyne javanica* on greenhouse grown tomato. **Pest Management Science**, 59:1311–1320.
- VESSEY JK. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and Soil**, 255:571-586.
- WEINDLING R. 1932. *Trichoderma lignorum* as a parasite of others soil fungi. **Phytopathology**, 22(8):837-845.
- ZHANG S, GAN Y, XU, B. 2015. Biocontrol potential of a native species of *Trichoderma longibrachiatum* against *Meloidogyne incognita*. **Applied soil ecology**, 94:21-29.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A proposta do estudo foi avaliar novas ferramentas para aumentar as opções de controle disponíveis aos agricultores visando o manejo integrado dos nematoide-das-galhas.

Foram avaliadas 37 cultivares de soja, sendo que M5947 IPRO, HO Amambay IPRO, BMX Garra IPRO e FPS Atalanta IPRO apresentaram baixa susceptibilidade, com fator de reprodução próximo a 1. Foram avaliados 40 isolados sendo 29 isolados oriundos da região Sul, e com potencial de controle biológico do *Meloidogyne javanica*. Destaca-se que grande parte dos isolados comerciais são obtidos nas regiões Sudeste ou Centro-Oeste, cujo clima é mais ameno, onde são cultivadas duas ou mais safras anualmente, e com propensão de possuir elevadas população dos nematoides caso o manejo não seja realizado adequadamente, visando a diminuição da população.

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que a utilização de ferramentas de controle seja realizada de acordo com o manejo integrado visando o controle do nematoide-das-galhas.

Com isso, pode-se sugerir pelos dados obtidos no trabalho:

1. Estudos de reação utilizando diversos genótipos, de todas as culturas de importância agrícola, são importantes para dar mais opções aos agricultores quanto a cultivares resistentes ou de baixa susceptibilidade;
2. Os isolados de *Trichoderma* podem ser utilizados individualmente ou em conjunto com outros isolados, tanto de *Trichoderma* quanto de outros microrganismos, caso tenha sido realizado um estudo prévio de compatibilidade;
3. Que sejam conduzidos mais estudos em locais considerados impróprios para prospectar agentes antagonistas a quaisquer alvos que se deseja controlar;
4. É sugerido a utilização do controle químico quando necessário e em situações quando não existirem formas de controle biológico, genético ou cultural disponíveis.

8. REFERÊNCIAS

- ABAD P., et al. Genome sequence of the metazoan plant parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. **Nature Biotechnology**, v. 26, p. 909-915, 2008.
- AGRIOS, George N. **Plant pathology**. Academic press, 2005.
- ALMEIDA, A.M.R.; FERREIRA, L.P.; YORINORI, J.T.; SILVA, J.F.V.; HENNING, A.A.; GODOY, C.V.; COSTAMILAN, L.M. & MEYER, M.C. Doenças da soja (*Glycine max*). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIM FILHO, A. & CAMARGO, L.E.A. (Eds.) Manual de Fitopatologia. **Doenças das plantas cultivadas**. 4a ed. Ceres. Piracicaba-SP. v. 2, p. 569-588, 2005.
- ANTÔNIO, H. Fitonematoides na cultura da soja. **Informe Agropecuário**, v. 16, p. 60-65, 1992.
- ARAUJO, F.F.; BRAGANTE, R.J.; BRAGANTE, C.E. Controle genético, químico e biológico de meloidoginose na cultura da soja. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v.42, n.2, p. 220-224, 2012.
- BALARDIN R.R. et al. Reação de plantas daninhas a *Meloidogyne javanica*. **Ciências Agrária: Campo promissor em Pesquisa**, v.5, p.149-157, 2019.
- BELLÉ, Cristiano et al. Plantas daninhas como hospedeiras alternativas para *Meloidogyne incognita*. **Nematropica**, v. 47, n. 1, p. 26-33, 2017.
- BELLÉ, Cristiano et al. Reproduction of *Meloidogyne enterolobii* on weeds found in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 44, n. 4, p. 380-384, 2019.

- CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira de grãos. Brasília, Brasil, **Companhia Nacional de Abastecimento**. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/safras.asp>>, Acessado em: 24 out. 2019.
- COYNE, et al. Plant-Parasitic Nematodes and Food Security in Sub-Saharan Africa, **Annual Review of Phytopathology**, v. 56, p. 381-403, 2018.
- DENNIS, C. & WEBSTER, J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma* I. Production of non-volatile antibiotics. **T. Brit. Mycol. Soc.** v.57, n. 1, p. 25-39, 1971a.
- DENNIS, C. & WEBSTER, J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma* III. Hyphal interactions. **T. Brit. Mycol. Soc.** v.57, n. 3, p. 363-369, 1971b.
- DIAS, W. P. et al. Nematoides em soja: Identificação e Controle. Londrina: **Embrapa Soja**. 8 p., 2010.
- EILENBERG, J., HAJEK, A., & LOMER, C. Suggestions for unifying the terminology in biological control. **BioControl**, v. 46, p. 387– 400, 2001.
- FERRAZ, R. R. et al. Plantas daninhas como hospedeiras dos nematoides-das-galhas. **Revista Agronomia Brasileira**, v. 3, erab201906, 2019.
- HUANG, S.P. & CARES, J.H. Community composition of plant-parasitic nematodes in native and cultivated cerrados of Central Brazil. **Journal of Nematology** v. 27, p. 237-243, 1995.
- IBRAHIM, H. M. M. et al. Post-transcriptional gene silencing of root-knot nematode in transformed soybean roots. **Experimental parasitology**, v. 127, n. 1, p. 90-99, 2011.
- INOMOTO, M.M.; ASMUS, G.L. Controle de nematoides une resistência, rotação e nematicidas. **Visão Agrícola**, v.6, p.47-50, 2006.
- JATALA, P. Biological control of plant-parasitic nematodes. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 24, p. 453-489, 1986.
- KLOEPPER, J. W., RODRÍGUEZ-KÁBANA, R., MCINROY, J. A., & YOUNG, R. W. Rhizosphere bacteria antagonistic to soybean cyst (*Heterodera glycines*) and root-knot (*Meloidogyne incognita*) nematodes: Identification by fatty acid analysis and frequency of biological control activity. **Plant and Soil**, v. 139, n. 1, p. 75– 84, 1992.
- KIRSCH, V. G. et al. Characterization of *Meloidogyne* and *Helicotylenchus* species associated with soybean in Rio Grande do Sul State. **Nematropica** v. 46, p.197-208, 2016.
- KUBO, R. K.; MACHADO, A. C. Z.; OLIVEIRA, C. M. G. Efeito do tratamento de sementes no controle de *Rotylenchulus reniformis* em dois cultivares de algodão. **Arquivos Instituto Biológico**, v. 59, n. 1/2, p. 239-245, 2012.

- LOUZADA, GA de S. et al. Potencial antagônico de *Trichoderma* spp. originários de diferentes agroecossistemas contra *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium solani*. **Embrapa Arroz e Feijão-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2009.
- MASCARIN, G. M. et al. Current status and perspectives of fungal entomopathogens used for microbial control of arthropod pests in Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**, 2018.
- MATTOS, V. et al. Meloidogyne spp. populations from native Cerrado and soybean cultivated areas: genetic variability and aggressiveness. **Nematology**, v. 18, p. 505-515, 2016.
- MIRANDA DM, FAVORETO L. & RIBEIRO N.R. Nematoides: um desafio constante. In: Siqueri F, Caju J & Moreira M (Ed.) **Boletim de pesquisa de soja 2011**. Rondonópolis, Fundação MT, p.400-414, 2011.
- MOENS, M. et al. Meloidogyne species—a diverse group of novel and important plant parasites. **Root-knot nematodes**, v. 1, p. 483, 2009.
- NELSON, E., KAGEYAMA, K., DIJK, K. V., & WINDSTAM, S. Biological control of soilborne diseases: Important concepts from a model system. In A. Vanachter (Ed.) **Proc. XXVI IHC - Managing Soil-Borne Pathogens**. Toronto, Canada: Can. Int. Dev. Agency (CIDA), p. 635, 2004.
- NIBLACK, T. L., & CHEN, S. Biology and management of the soybean cyst nematode. **Schmitt & Associates of Marceline**, 181-206. (2004).
- OKA, Y. Survival of *Meloidogyne javanica* during the summer season under semiarid conditions. **European Journal of Plant Pathology**, p. 1-10, 2019.
- OOSTENBRINK, M. Major characteristics of the relation between nematodes and plants. **Mendelingen Landbouwhogeschool Wageningen**, v.66, p.1-46, 1966.
- PEDROSA, E. M. R.; HUSSEY, R. S.; BOERMA, H. R. Response of resistant soybean plant introductions to *Meloidogyne arenaria* races 1 and 2. **Journal of nematology**, v. 26, n. 2, p. 182, 1994.
- PERRY, R.; MOENS, M.; STARR, J. (Ed.). **Root-knot nematodes**. CABI, 2009.
- PIMENTEL, M. S.; PEIXOTO, A. R.; DA PAZ, C. D. Potencial de controle biológico de *Meloidogyne* utilizando fungos nematófagos e bactérias em cafeeiros. **Coffee Science**, v. 4, n. 1, p. 84-92, 2009.
- POINAR JR, G. O.; JANSSON, H. ed. **Diseases of nematodes**. v. 1. Boca Raton: CRC Press, p. 149, 1988a.
- POINAR JR, G. O.; JANSSON, H. ed. **Diseases of nematodes**. v. 2. Boca Raton: CRC Press, p. 139, 1988b.

- RICHARDSON, A. E. Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 28, p. 897-906, 2001.
- ROSA, L. C. T. Interação e eficácia de produtos biológicos e químicos no manejo de *Meloidogyne javanica* em cultivares de tomate. **Dissertação de Mestrado** - Urutaí, GO: IF Goiano, p. 20, 2018.
- SAHEBANI N.; HADAVI N. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, p. 2016–2020, 2008.
- SANTOS, C.; DE CARVALHO, S.; DA SILVA, M. Solarização do solo em sacos plásticos para o controle dos nematóides das galhas, *Meloidogyne incognita* e *M. javanica*. **Revista Ciência Agronômica**, v. 37, n. 3, p. 350-356, 2006.
- SHAH, M. M.; AFIYA, H. Introductory Chapter: Identification and Isolation of *Trichoderma* spp.-Their Significance in Agriculture, Human Health, Industrial and Environmental Application. In: *Trichoderma-The Most Widely Used Fungicide*. **IntechOpen**, 12p., 2019.
- SHARON, E. et al. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. **Phytopathology**, v. 91, n. 7, p. 687-693, 2001.
- SIDDIQUI, Z. A.; MAHMOOD, I. Biological control of plant parasitic nematodes by fungi: a review. **Bioresource Technology**, College Station, v. 58, p. 229-239, 1996.
- SIKORA, R. A.; SCHÄFER, K.; DABABAT, A. A. Modes of action associated with microbially induce in planta suppression of plant-parasitic nematodes. **Australasian Plant Pathology**, v. 36, p. 124-134, 2007.
- SOARES, P. L. M. Estudo do controle biológico de fitonematóides com fungos nematófagos. **Tese de Doutorado**, FCAV-Jaboticabal, 2006.
- SOARES, F. E. de F.; SUFIATE, B. L.; DE QUEIROZ, J. H. Nematophagous fungi: Far beyond the endoparasite, predator and ovicidal groups. **Agriculture and Natural Resources**, v.52, n. 1, p. 1-8, 2018.
- STARR, J. L. et al. Resistance to plant-parasitic nematodes: history, current use and future potential. **Plant resistance to parasitic nematodes**, p. 1-22, 2002.
- STIRLING, G. R. Biological Control of Plant Parasitic Nematodes. Progress, Problems and Prospects. UK: **CAB International**, Wallingford, p. 282, 1991.
- STIRLING, G. R. Biological control of plant parasitic nematodes. In: **Diseases of nematodes**. CRC Press, p. 103-150, 2018.
- TEIXEIRA, R.A. Reação de cultivares de soja a *Meloidogyne incognita* e *M. javanica*. **Tese de Doutorado**. Universidade Federal de Goiás, Goiânia, p. 60, 2013.

- TIAN, B. et al. Host-derived gene silencing of parasite fitness genes improves resistance to soybean cyst nematodes in stable transgenic soybean. **Theoretical and Applied Genetics**, p. 1-12, 2019.
- VAN GUNDY, S. D. Biological control of nematodes: status and prospects in agricultural IPM Systems. In: HOY, M. A.; HERZOG, D. C. (Eds.). **Biological control in agricultural IPM systems**. New York: Academic Press, p. 467-478, 1985.
- VESSEY, J. K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and Soil**, v. 255, p. 571-586, 2003.
- XIANG, N.; LAWRENCE, K. S.; DONALD, P. A. Biological control potential of plant growth-promoting rhizobacteria suppression of *Meloidogyne incognita* on cotton and *Heterodera glycines* on soybean: A review. **Journal of Phytopathology**, v. 166, n. 7-8, p. 449-458, 2018.
- YEATES, G. W et al. Feeding habits in soil nematode families and genera—an outline for soil ecologists. **Journal of nematology**, v. 25, n. 3, p. 315, 1993.