

AVALIAÇÃO DA PATOGENICIDADE DE *Paecilomyces lilacinus* SOBRE *Meloidogyne paranaensis* EM CAFEIEIRO

Débora C. SANTIAGO¹, E-mail: santiago@uel.br; Marina C. CADIOLI¹; Arian D. de OLIVEIRA¹; Vanessa dos S. PAES¹; Giovani de O. ARIEIRA¹

¹Universidade Estadual de Londrina, C.P. 6001, Londrina, PR, CEP 86051-990.

Resumo:

Nematóides do gênero *Meloidogyne* são responsáveis pela redução de 15% da produção em áreas cafeeiras. *Paecilomyces lilacinus* é uma espécie fúngica utilizada no controle biológico de nematóides e uma das mais estudadas a campo. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar 10 isolados de *P. lilacinus*, obtidos na região de Londrina-PR, quanto a sua eficiência no controle de *M. paranaensis*, em experimento conduzido em casa-de-vegetação. Para tanto, antes do cultivo das mudas de cafeeiro, plântulas de tomateiro foram inoculadas com *M. paranaensis* e mantidas durante 45 dias, em vasos de plástico de 1,5 L, para simular uma condição de solo altamente infestado. Decorrido esse período, essas plantas foram retiradas dos vasos, as raízes foram cortadas e misturadas ao mesmo substrato em recipientes individuais, e a este procedeu-se a inoculação dos isolados de *P. lilacinus*, através da adição e mistura de 50 g de arroz colonizado (10^9 esporos do fungo.g⁻¹ de arroz). O substrato, agora, formado pela mistura de raízes e de grãos de arroz colonizados foi distribuído em sacos de polietileno com capacidade para 2,0 L. Na seqüência, efetuou-se o transplântio de mudas de cafeeiro cv. Icatú, na proporção de uma por saquinho. Após 15 dias procedeu-se mais uma aplicação de 50g dos isolados. O delineamento foi inteiramente casualizado com doze tratamentos (dez isolados + uma testemunha inoculada com *M. paranaensis* e uma testemunha não inoculada com *M. paranaensis*). Aos 90 dias da primeira inoculação do fungo, foram avaliados: altura de plantas, tomada do colo até o ápice; diâmetro do caule, a 2 cm do colo da planta; pesos da matéria fresca da parte aérea e do sistema radicular; número de ovos por sistema radicular; números de juvenis em 250 cc de solo; além da sobrevivência dos isolados ao final deste experimento. Os isolados que reuniram as características mais desejáveis para o controle de *M. paranaensis* foram Pae 03, 12 e 20.

Palavras-chave: controle biológico, nematóide de galha, fungo endoparasita, parasitismo, supressividade.

PATHOGENICITY OF *Paecilomyces lilacinus* ON *Meloidogyne paranaensis* IN COFFEE PLANT

Abstract:

Nematodes of *Meloidogyne* genus are responsible for 15 % reduction of coffee fields. *Paecilomyces lilacinus* is fungi specie used for biological control of nematodes and most studied at field conditions. The objective of the present paper was to evaluate the efficacy of 10 isolates of *P. lilacinus* obtained in Londrina-PR to control *M. paranaensis* at greenhouse trials. Before planting coffee seedlings, tomatoes seedlings were inoculated with *M. paranaensis* and kept for 45 days in plastic vassels of 1,5 l to simulated a high-infested soil condition. After that time, the plants were picked out of vassels and their roots were cut and mixed with the substrate and put in individual vassels and inoculated with isolates of *P. lilacinus* using a mixture of 50 g of rice colonized with *P. lilacinus* (10^9 fungi spore per g of rice). The substrate mixed with rice grains was distributed in 2,0 l polyethylene bags. The coffee plants variety Icatu were planted one per bag. After 15 days another inoculated was made using 50 g of isolates. The experimental design was completely randomized with 12 treatments (10 isolates, 1 check inoculated with *M. parananensis* and 1 check not inoculated). After 90 days of fungi inoculation it was evaluated plant height, stem diameter, fresh weight of aerial part and root system, number of eggs in root system, number of juveniles in 250 cc of soil, besides isolate surviving at the end of the trial. The best isolates for the control of *M. parananensis* were Pae 03, 12 and 20.

Key words: biological control, nematode galls, endoparasite fungi, parasitism, supression.

Introdução

Os nematóides associados ao cafeeiro compreendem um grupo numeroso de espécies, destacando-se as do gênero *Meloidogyne* Goeldi, amplamente distribuídas em áreas cafeeiras do Brasil e, que vêm causando grandes perdas para os produtores e para a economia do país (Carneiro e Almeida, 2000; Gonçalves et al., 2000).

Nos Estados do Paraná, São Paulo e Minas Gerais, as espécies *M. incognita*, *M. paranaensis*, *M. exigua* e *M. coffeicola* (Lordello e Zamith) têm sido reportadas em áreas de café, havendo flutuações na predominância de uma espécie em relação a outras. Acredita-se que *M. coffeicola* tenha sido erradicada de várias plantações, embora ainda venha ocorrendo esporadicamente (Carneiro e Almeida, 2000). As perdas ocasionadas por essas três espécies implicam em importante queda da produtividade global do café (Guerra Neto et al., 1985; Campos et al., 1990), sendo o controle desses nematóides de grande interesse agrônômico.

Para diminuir as perdas das lavouras de café e reduzir para níveis mínimos os danos causados ao ambiente com a utilização de produtos químicos, o controle biológico vem sendo considerado uma das alternativas, dentro de uma

abordagem integrada, na qual se busca assegurar o desenvolvimento sustentável da agricultura. O uso de inimigos naturais é promissor e torna-se um fascinante campo de investigação, sendo potencialmente útil dentro das medidas duráveis (Stirling, 1991), podendo reduzir populações de fitonematóides para limiares abaixo do nível de dano econômico (Duncan, 1991).

Paecilomyces lilacinus (Thom.) Samson é um fungo do solo que tem se mostrado efetivo no biocontrole de espécies de *Meloidogyne* (Kerry, 1990). Caracteriza-se por penetrar nos ovos dos nematóides, destruindo o embrião, podendo exercer forte pressão na capacidade reprodutiva das fêmeas que são colonizadas e, posteriormente, mortas (Dunn et al., 1982). Estudos envolvendo a seleção de isolados de *P. lilacinus* para o controle de nematóides são importantes na busca de microrganismos eficientes e adaptados às diferentes regiões.

Embora resultados encorajadores sejam observados em condições brasileiras (Carneiro e Gomes, 1993; Costa e Campos, 1997; Freitas et al., 1999; Mizobutsi et al., 2000; Santiago et al., 2006), informações básicas sobre o comportamento de *P. lilacinus* como parasita das diferentes espécies dos nematóides de galhas são necessárias para que seu emprego na agricultura seja recomendado.

Assim, o presente trabalho tem como objetivo selecionar isolados de *P. lilacinus*, obtidos na região de Londrina-PR, quanto a sua eficiência no controle de *M. paranaensis*, em casa-de-vegetação. Esses conhecimentos são importantes para que seja possível viabilizar a cafeicultura em áreas infestadas por essa espécie, buscando restabelecer o equilíbrio natural no solo e, assim, diminuir as perdas de produtividade causadas por este parasita.

Material e Métodos

A determinação da eficiência dos isolados do fungo *P. lilacinus* no controle de *M. paranaensis* em plantas de cafeeiro cv. Icatú foi realizada em casa-de-vegetação, em delineamento experimental inteiramente casualizado, com 12 tratamentos, constituídos por 10 isolados de *P. lilacinus*, uma testemunha não tratada com *P. lilacinus* e não inoculada com *M. paranaensis* e uma testemunha apenas inoculada com *M. paranaensis*, distribuídos em dez repetições.

Os isolados de *P. lilacinus* avaliados pertencem à coleção de organismos do Laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual de Londrina, os quais foram obtidos em áreas de cultivo de cafeeiro na região de Londrina - PR, a exceção do isolado Pae 03 que foi obtido em área de milho (Tabela 1). Estes foram previamente selecionados quanto à capacidade de parasitar ovos de *M. paranaensis* "in vitro", em diferentes temperaturas (Cadioli et al., 2006 – no prelo).

Tabela 1 - Origem dos isolados de *Paecilomyces lilacinus* utilizados.

Código de Acesso	Substrato	Local	Código de Acesso	Substrato	Local
Pae 03	Milho	Londrina, PR	Pae 20	Café	Cambé, PR
Pae 10	Café	Londrina, PR	Pae 21	Café	Cambé, PR
Pae 12	Café	Londrina, PR	Pae 22	Café	Cambé, PR
Pae 13	Café	Londrina, PR	Pae 24	Café	Cambé, PR
Pae 18	Café	Cambé, PR	Pae 28	Café	Cambé, PR

Para multiplicação dos isolados de *P. lilacinus*, em quantidade suficiente para aplicação em vasos, foram utilizados grãos de arroz parboilizados distribuídos, em porções de 100 gramas juntamente com 100 mL de água, em embalagens de polipropileno com capacidade para 1 kg, e submetidos a autoclavagem durante uma hora a 120 °C e 1 atm. Após o resfriamento, cada embalagem foi inoculada com três discos de 5 mm de diâmetro retirados das colônias de *P. lilacinus* desenvolvidas em meio de BDA por sete dias. Após a inoculação, as embalagens foram deixadas em temperatura ambiente por 15 dias para que o fungo colonizasse o substrato.

O inóculo de *M. paranaensis* foi obtido através da multiplicação em plantas de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* L.) cv. Santa Cruz, a partir das quais procedeu-se à extração dos ovos, segundo a metodologia de Boneti e Ferraz (1981), obtendo-se uma suspensão ajustada para concentração média de 1.000 ovos e eventuais.mL⁻¹.

Antes do cultivo das mudas de cafeeiro, plântulas de tomateiro cv. Santa Cruz, com 16 dias de idade, foram transplantadas para vasos de plástico de 1,5 L contendo como substrato solo e areia lavada, previamente tratados com brometo de metila, na proporção de 1:1 (v.v⁻¹). Aos 15 dias do transplantio, as plântulas foram inoculadas na região da rizosfera com 5 mL da suspensão contendo \pm 5000 ovos e eventuais juvenis de *M. paranaensis*, com o auxílio de pipeta esterilizada. Em seguida, as plantas foram mantidas durante 45 dias para simular uma condição de solo altamente infestado e permitir a produção da segunda geração de ovos, uma vez que *P. lilacinus* tem preferência pelo parasitismo destes. Decorrido esse período, as plantas juntamente com o substrato de desenvolvimento foram removidas do vaso e a parte aérea foi descartada. As raízes foram cortadas e misturadas ao mesmo substrato em recipientes individuais, e a este procedeu-se a inoculação dos isolados de *P. lilacinus*, através da adição e mistura de 50 g de arroz colonizado (10⁹ esporos do fungo.g⁻¹ de arroz). O substrato, agora, formado pela mistura de raízes e de grãos de arroz colonizados foi distribuído em sacos de polietileno com capacidade para 2,0 L e, a este procedeu-se a inoculação dos isolados de *P. lilacinus* através da adição e mistura de 50 g de arroz colonizado (10⁹ esporos do fungo.g⁻¹ de arroz). Na seqüência, efetuou-se o transplantio de mudas de cafeeiro cv. Icatú, na proporção de uma por saquinho.

Nas testemunhas, não tratadas com *P. lilacinus* e não inoculadas com *M. paranaensis* foram introduzidas apenas 50 gramas de arroz não colonizado. Já nas testemunhas não tratadas com *P. lilacinus* e com inoculação do nematóide foram introduzidas 50 gramas de arroz não colonizado mais as raízes contendo inóculo de *M. paranaensis*. Aos 15 dias do

transplântio das mudas de cafeeiro, efetuou-se nova aplicação em cobertura dos tratamentos (50 g de arroz colonizado com os isolados).

Aos 90 dias da primeira inoculação do fungo, foram avaliados: altura de plantas, tomada do colo até o ápice; diâmetro do caule, a 2 cm do colo da planta; pesos da matéria fresca da parte aérea e do sistema radicular; número de ovos por sistema radicular; números de juvenis em 250 cc de solo; além da sobrevivência dos isolados ao final deste experimento. Para determinação dos pesos da matéria fresca, a parte aérea foi separada do sistema radicular na região do colo, e em seguida determinou-se o peso. As raízes foram lavadas em água corrente para remoção dos detritos, dispostas sobre papel absorvente até a eliminação do excesso de água e, em seguida, foram pesadas. Posteriormente as raízes foram processadas empregando-se a técnica de Boneti e Ferraz (1981) para extração e contagem dos ovos. Para determinação do número de juvenis no substrato de cultivo foi empregada a técnica de Jenkins (1964). Para avaliar a sobrevivência dos fungos no solo foram coletadas, para cada isolado, amostras de 10 gramas de solo de cinco vasos por tratamento. Para cada amostra, procedeu-se  diluição seriada e, da diluição 10^{-3} , alíquotas de 1 mL foram distribuídas em placas de Petri contendo o meio semi-seletivo, em número de cinco repetições por amostra, onde no sexto dia de incubação foi determinado o percentual de desenvolvimento das colnias em cada placa. Os dados obtidos foram submetidos às análises de variância e ao teste de Scott Knott a 5% de probabilidade de erro, para comparação de mdias.

Resultados e Discussão

A relação dos isolados de *P. lilacinus* com a altura das plantas, diâmetro do caule e pesos da parte aérea e raízes do cafeeiro estão apresentadas nas Tabela 2 e com a presença de ovos por raízes, juvenis de *M. paranaensis* e sobrevivência de *P. lilacinus* no solo estão na Tabela 3, sendo estas características fundamentais para escolha dos melhores isolados. Quanto à altura, notou-se que as plantas que receberam os tratamentos com os isolados Pae 10, 13, 18, 22, 24 e 28 apresentaram altura média superior  da testemunha. Já plantas tratadas com os isolados Pae 03, 12, 20, 21 não diferiram significativamente da testemunha. Na avaliação do diâmetro do caule, notou-se que não houve diferença significativa para nenhum dos isolados com relação à testemunha, indicando que estes isolados não interferiram nesta característica da planta, durante o período avaliado. Com relação ao peso fresco da parte aérea, notou-se que as plantas tratadas com os isolados de *P. lilacinus* apresentaram pesos superiores ao da testemunha, com destaque para os isolados Pae 24, 28, 10, 22, 13 e 18 em ordem decrescente. Resultados inversos foram observados para o peso fresco das raízes, onde as plantas tratadas apresentaram pesos menores em comparação com a testemunha.

Quanto ao número de nematóides por sistema radicular, todos os isolados foram capazes de reduzir o número de ovos nas raízes em comparação com a testemunha, com destaque para os isolados Pae 03, 20, 21 e 22 que apresentaram excelentes resultados se enquadrando no mesmo grupo da testemunha não inoculada (Tabela 3). Resultados semelhantes foram verificados por Felli et al. (1985), Cabanillas et al. (1989a) e Freitas et al. (1999), trabalhando com as espécies *M. incognita* e *M. javanica* em tomateiros tratados com diferentes isolados de *P. lilacinus*. Com relação  eficiência dos isolados contra os juvenis de *M. paranaensis* no solo, os dados foram variáveis, verificando-se que, com exceção dos isolados Pae 03 e 12 que proporcionaram acentuada redução da população de juvens, os tratamentos com os demais isolados apresentaram números de juvenis acima da testemunha, ou seja, permitiram o aumento da população de nematóides no solo, característica não desejável para escolha dos isolados (Tabela 3). Segundo Morgan-Jones e Rodriguez-Kbana (1985), os estdios juvenis, em função de sua mobilidade, são menos vulneráveis ao ataque pelo micélio dos fungos. La Mondia e Brodie (1984), apontam que ovos nos estdios iniciais do desenvolvimento embriogênico são mais facilmente parasitados do que quando já possuem o juvenil de segundo estdio já formado. Na análise da sobrevivência do *P. lilacinus* no solo, notou-se um ótimo ndice de sobrevivência dos isolados no solo com destaque para os isolados Pae 03, 12, 20, 21 e 22, podendo ter mais condições de adaptação às diversas condições (Tabela 3).

Tabela 2. Características morfológicas das plantas de cafeeiro.

Tratamentos	Altura (cm)	Diâmetro do Caule	Peso (g)	
			Parte aérea	Raízes
	b ²	4,44 a	11,33 b	7,96 b
Pae 10	38,50 a	4,82 a	19,83 a	9,38 b
Pae 12	30,40 b	4,65 a	14,26 b	9,62 b
Pae 13	36,05 a	4,61 a	18,70 a	9,28 b
Pae 18	38,25 a	4,73 a	16,97 a	8,96 b
Pae 20	29,75 b	4,27 a	13,69 b	8,20 b
Pae 21	27,95 b	4,17 a	11,48 b	7,66 b
Pae 22	37,95 a	4,51 a	18,86 a	10,14 a
Pae 24	38,40 a	4,94 a	22,47 a	11,47 a
Pae 28	35,80 a	4,73 a	22,41 a	10,62 a
Testemunha inoculada	32,50 b	4,84 a	11,22 b	11,53 a
Testemunha não inoculada	31,60 b	4,59 a	10,75 b	11,50 a
CV (%)	14,96	15,20	31,30	24,49

¹ Os dados são mdias de 10 repetições.

² Médias seguidas de letras iguais nas colunas, não diferem entre si, pelo teste de Scott-knott em nível de 5% de probabilidade de erro.

Tabela 3. Relação dos isolados de *P. lilacinus* quanto ao parasitismo de *M. paranaensis*

Tratamentos	Juvenis no solo (n°)	Ovos nas raízes (n°)	Sobrevivência (%)
Pae 03	166,67 ¹ j ³	3,48 d	7,63 ² a
Pae 10	1013,33 g	5,68 c	5,38 b
Pae 12	246,67 i	6,25 c	7,89 a
Pae 13	1500,00 f	4,27 c	6,32 b
Pae 18	2446,67 c	5,03 c	4,00 c
Pae 20	1600,00 e	2,90 d	7,06 a
Pae 21	1733,33 d	3,75 d	6,82 a
Pae 22	3280,00 b	3,63 d	8,13 a
Pae 24	1633,33 e	5,63 c	4,35 c
Pae 28	3893,33 a	8,31 b	2,88 d
Test. inoculada	573,33 h	12,25 a	0,71 e
Test. não inoculada	0,00 k	0,71 e	0,71 e
CV (%)	2,86	72,28	17,65

¹ Os dados são médias de 10 repetições e foram transformados em $\sqrt{x + 0,5}$ para análise estatística.

² Os dados são médias de 25 repetições e foram transformados em $\sqrt{x + 0,5}$ para análise estatística.

³ Médias seguidas de letras iguais nas colunas, não diferem entre si, pelo teste de Scott knott em nível de 5% de probabilidade de erro.

Conclusões

Os isolados que reuniram as características mais desejáveis para o combate ao *M. paranaensis* foram os isolados Pae 03, 12 e 20, pois apesar de apresentarem baixa eficiência contra os juvenis, foram eficientes no controle dos nematóides nas raízes e tiveram elevada sobrevivência. E o isolado Pae 03 foi o que melhor reuniu as características desejáveis para um controle efetivo.

Novos estudos têm que ser realizados com relação às melhores condições de desenvolvimento e formas de aplicação dos isolados, além de experimentos em condições de campo, para validação dos resultados.

Referências Bibliográficas

- BONETI, J. I. S.; FERRAZ, S. Modificação do método de Hussey e Barker para a extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de raízes de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.6, n.3, p.533, 1981.
- CABANILLAS, E.; Barrer, K. R.; Nelson, L. A. Growth of isolates of *Paecilomyces lilacinus* on their efficacy in biocontrol of *Meloidogyne incognita* on tomato. **Journal of Nematology**, Lakeland, v.21, n.2, p.164-172, 1989a.
- CAMPOS, V. P., SIVAPALAN, P.; GNANAPRAGASAM, N. C. Nematode parasites of coffee, cocoa, and tea. In: LUC, M.; SIKORA, R. A.; BRIDGE, J. **Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture**. (eds.). London: Cab International. 1990. p.113-126.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; GOMES, C.B. Metodologia e teste de patogenicidade de *Paecilomyces lilacinus* e *P. fumosoroseus* em ovos de *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**. v.7, n.1, p. 66-75, 1993.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; ALMEIDA, M.R.A. Distribution of *Meloidogyne* spp. on coffee in Brazil: Identification, characterization and intraspecific variability. In: ANTHONY, F.; RODRÍGUEZ, E. **Mejoramiento sostenible del café Arábica por los recursos genéticos, asistido por los marcadores moleculares, con énfasis en la resistencia a los nemátodos**. (eds). Turrialba, Costa Rica: CATIE/IRD, 2000. p. 43-48.
- COSTA, S. B.; CAMPOS, V. P. Obtenção de Fêmeas de *Heterodera glycines* em hidroponia e testes de patogenicidade de fungos isolados de cistos a fêmeas de *H. glycines* e de *Meloidogyne* spp. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v.23, p.239-243, 1997.
- DUNCAN, L.W. Current options for nematode management. **Annual Review of Phytopathology**. v. 29, p.469-490, 1991.
- FELLI, L.F.S. et al. Efeito de *Paecilomyces lilacinus*, carbamatos e matéria orgânica no controle de *Meloidogyne incognita* em tomateiro. **Nematologia Brasileira**, v.9, (único), p.34-35, 1985.
- FREITAS, L. G. ; FERRAZ, S.; ALMEIDA, A. M. S. . Controle de *Meloidogyne javanica* em tomateiro pela produção de mudas e substrato infestado com *Paecilomyces lilacinus*. **Nematologia Brasileira**, Brasília - DF, v. 23, n. 1, p. 65-73, 1999.
- GONÇALVES, W.; SILVAROLLA, M.B.; GUERREIROFILHO, O.; FAZUOLI, L.C.; MEDINA-FILHO, H.P. Nematóides parasitas (*Meloidogyne* spp) do cafeeiro: Manejo genético e químico no Brasil. In : ANTHONY, F.; RODRÍGUEZ, E. **Mejoramiento sostenible del café Arábica por los recursos genéticos, asistido por los marcadores moleculares, con énfasis en la resistencia a los nemátodos**. (eds). Turrialba, Costa Rica: CATIE/IRD. 2000. p. 49-54.
- GUERRA NETO, E. G.; D'ANTONIO, A. M.; FREIRE, A. C. F. **Influência do *Meloidogyne exigua* Goldi, 1887, no desenvolvimento de lavouras de *Coffea arabica* L., variedade Novo Mundo**. In : XII Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras. Caxambú, Brasil. 1985. p. 36-37.

- JENKINS, W.R. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. **Plant Disease Reporter**. v.48, p.692. 1964.
- KERRY, B.R. An assessment of progress toward microbial control of plant parasitic nematode. **Journal of Nematology**. v. 22, n.45, p.621-631, 1990. (Supplement)
- LA MONDIA, J. A.; BRODIE, B. B. An observation chamber technique for evaluating potential biocontrol agents of *Globodera rostochiensis*. **Journal of Nematology**. v.16, n.1, p.112-115. 1984.
- MIZOBUTSI, E.H.; FERRAZ, S.; RIBEIRO, R. C. F. Avaliação do parasitismo de diversos isolados fúngicos em ovos de *Heterodera glycines* e *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, Brasília-DF. v.24, n.2, p.167-172, 2000.
- MORGAN-JONES, G.; RODRIGUEZ-KÁBANA, R. Phytonematode pathology fungal modes of action. A perspective. **Nematropica**. v.15, p.107-14, 1985.
- SANTIAGO, D. C.; HOMECHIN, M.; SILVA, J. F. V.; RIBEIRO, E. R.; GOMES, B. C.; SANTORO, P. H. Seleção de isolados de *Paecilomyces lilacinus* (Thom.) Samson para controle de *Meloidogyne paranaensis* em tomateiro. **Ciência Rural**. Santa Maria. v. 36, n. 4, p. 1055-1064, 2006.
- STIRLING G.R. **Biological control of plant parasitic nematodes**. (Eds.). Wallingford: CAB International, 1991. 282p.