

# Controle do nematoide das galhas por *Pleurotus ostreatus* em alface

R. H. Marino<sup>(1)</sup>, D. G. C. da Silva<sup>(1)</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Engenharia Agrônômica, Universidade Federal de Sergipe, 49.100-00, São Cristóvão-SE, Brasil

<sup>2</sup> Departamento de Agricultura, Universidade Federal de Lavras, 37.200-00, Lavras-MG, Brasil

rehmarino@hotmail.com

(Recebido em 29 de maio de 2013; aceito em 22 de outubro de 2013)

O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência de isolados do fungo *Pleurotus ostreatus* no controle do nematoide das galhas em alface. Os isolados de *P. ostreatus* utilizados foram DF39, EF58, EF60 e PS5. Os inoculantes fúngicos foram produzidos em substrato à base de pó de coco autoclavado. O plantio das mudas de alface (cv. Luisa) foi realizado em vasos contendo inoculante dos isolados fúngicos e solo autoclavado na proporção de 1:3. Em cada vaso foi realizada a inoculação de 5 mL de água destilada contendo 100 µL de uma suspensão com 600 ovos de *Meloidogyne incognita*. Foram realizadas inoculações em três pontos ao redor da raiz. Os parâmetros avaliados foram número de galhas e de massas de ovos nas raízes de alface, após 35 dias do plantio. Todos os isolados fúngicos testados reduziram significativamente o número de galhas e de massas de ovos de *M. incognita* em comparação com o controle.

Palavras-chave: *Lactuca sativa*, *Meloidogyne*, controle alternativo

## Control of root-knot nematode by *Pleurotus ostreatus* in lettuce

The objective of this research was to evaluate the efficiency of the isolated fungus *Pleurotus ostreatus* in control of root-knot nematode in lettuce. Isolates of *P. ostreatus* were used DF39, EF58, EF60 and PS5. The fungal inoculants were produced in substrate of coconut fiber autoclaved. The planting the seedlings of lettuce (cv. Luisa) was conducted in pots containing fungi inoculant and sterilized soil in the proportion of 1:3. In each vessel was inoculated with 5 mL of distilled water containing 100 µL of a suspension with 600 eggs of *Meloidogyne incognita*. Inoculations were performed at three points around the root. The parameters were the number of galls and egg masses on roots of lettuce after 35 days of planting. All fungal isolates tested reduced significantly the number of galls and egg masses of *M. incognita* in comparison with the control.

Keywords: *Lactuca sativa*, *Meloidogyne*, alternative control

## 1. INTRODUÇÃO

A alface (*Lactuca sativa* L.) é uma planta herbácea da família Asteraceae. No Brasil é a hortaliça folhosa de maior consumo e de maior importância econômica [17, 21].

No Estado de Sergipe, a produção de alface concentra-se na região Agreste, sendo o município de Itabaiana a principal região produtora desta hortaliça. O cultivo da alface é realizado em pequenas propriedades e um dos maiores problemas é a ocorrência do nematoide das galhas *Meloidogyne* sp., o que resulta em perda de produção e de qualidade [5].

As espécies de nematoides causadoras das galhas, pertencentes ao gênero *Meloidogyne*, encontram-se dentre os principais patógenos de importância agrícola, pela ampla distribuição destes parasitos, o número de hospedeiros e a interação com outros organismos patogênicos. Atualmente, o manejo mais utilizado para o controle destes patógenos é a aplicação de nematicidas, que apresenta custos econômicos e ambientais consideráveis. Diante disso, existe a necessidade de se adotar novas opções de manejo, dentre as quais o controle biológico, como por exemplo, o uso de fungos nematófagos. Estes fungos são cosmopolitas, ocorrendo em solos naturais e agricultáveis, localizações propícias também ao desenvolvimento de diversas populações de nematoides parasitas de plantas. No ambiente, os fungos nematófagos são biologicamente muito importantes, desempenhando um papel na reciclagem de carbono,

nitrogênio e outros elementos que podem ter origem a partir da degradação de organismos como os nematoides [12].

Existem mais de 140 espécies de fungos nematófagos já identificadas e utilizam como estratégias a infecção e o parasitismo de nematoides. Segundo a estratégia utilizada para o antagonismo, eles podem ser classificados em parasitas de ovos, endoparasitas e predadores [8, 18].

No grupo dos fungos parasitas de ovos, como *Pochonia chlamydosporia* [7], as hifas penetram na casca do ovo, através de pequenos poros existentes na camada vitelínica, causando alteração na permeabilidade da casca e expandindo seu volume. A hifa aumenta de tamanho ao passar pela camada vitelínica e atravessa a camada adjacente de quitina e de lipídeos. Em seguida, a camada vitelínica se divide, a de quitina se torna vacuolizada e a de lipídeos se torna dispersa. As hifas endógenas colonizam o ovo e também a fase juvenil em desenvolvimento no seu interior. Os fungos endoparasitas, como *Paecilomyces lilacinus*, também são capazes de infectar os nematoides através de esporos, que uma vez ingeridos desenvolvem hifas responsáveis pela absorção do conteúdo interno do nematoide. Estes fungos não produzem hifas vegetativas fora do corpo do hospedeiro, mas hifas férteis contendo esporos [8].

A maioria das espécies nematófagas está classificada como fungos predadores de nematoides, tais como *Arthrobotrys oligospora*, *A. musiformis*, *Monacrosporium robustum* e *Paecilomyces lilacinus*, produzem extenso sistema de hifas e ao longo delas são produzidas estruturas denominadas armadilhas do tipo hifas adesivas, ramificações hifais, ramificações adesivas, nódulos adesivos, anéis constritores e não constritores, que capturam os nematoides [10].

O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência de isolados de *Pleurotus ostreatus* no controle do nematoide de galhas na cultura da alface, no Estado de Sergipe. Uma vez que, os isolados de *P. ostreatus* a serem estudados foram melhorados geneticamente e apresentam resistência à temperaturas elevadas, como na região de estudo, o que poderá se tornar uma alternativa no controle do nematoide de galhas, na cultura de alface, sem a necessidade da utilização de agrotóxicos.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Departamento de Engenharia Agrônômica, da Universidade Federal de Sergipe, em São Cristóvão - Sergipe.

Os isolados fúngicos de *Pleurotus ostreatus* utilizados foram DF39, EF58, EF60 e PS05, pertencentes à Micoteca da Clínica Fitossanitária, do Departamento de Engenharia Agrônômica. A multiplicação dos isolados fúngicos foi realizada em meio de cultura à base de Batata-Dextrose-Ágar (200 g de batata, 10 g de dextrose e 15 g de ágar), previamente distribuído em placas de Petri. A incubação das placas de Petri, contendo meio de cultura e o fungo, foi realizada por 13 dias à temperatura média de  $28 \pm 1^\circ\text{C}$ , no escuro. Após a completa colonização do meio de cultura pelos isolados de *P. ostreatus*, foi realizada a transferência de 5 discos de meio de cultura colonizado pelo micélio dos isolados para frascos contendo substrato à base de pó de coco [15]. O substrato à base de pó de coco com os discos miceliais foi incubado à temperatura média de  $28 \pm 1^\circ\text{C}$ , até a completa colonização do substrato e foram utilizados como inoculante.

A cultivar de alface utilizada foi Luisa e a semeadura foi realizada em substrato contendo terra preta, areia lavada e esterco, na proporção de 3:1:1, autoclavados a  $120^\circ\text{C}$  e 1 atm, por 1 hora, com adição de 3,2 kg de superfosfato simples, 582 g de cloreto de potássio e 84 g de FTE. As plantas foram mantidas em estufa agrícola, por 25 dias à temperatura ambiente com irrigação por microaspersão.

O inoculante, constituído de substrato de pó de coco colonizado pelos isolados fúngicos foi retirado dos frascos e destorroado em uma bandeja plástica, previamente, desinfestada com álcool 70%. Em seguida, foi realizada a mistura de uma parte de inoculante, para uma parte da mistura de terra preta, areia lavada e esterco (3:1:1), previamente autoclavada e adicionado água até obter 70% de umidade. Esta mistura de solo e inoculante foi acondicionado em vasos plásticos.

O inóculo de nematoide *Meloidogyne incognita* foi preparado com ovos extraídos da superfície das galhas após a lavagem cuidadosa das raízes de alface com água destilada [6]. Em seguida, as raízes foram cortadas em pequenos fragmentos e colocadas em um frasco de 500 mL contendo 200 mL de hipoclorito de sódio (NaOCl) 0,5% e agitadas por 2 min. A suspensão de ovos foi vertida em uma peneira de 100 mesh acoplada a outra peneira de 500 mesh. As raízes foram enxaguadas três vezes com água destilada para a retirada dos ovos restantes, os quais foram colocados em um béquer. Em seguida, colocou-se 100 µL da suspensão de ovos em uma lâmina e com auxílio de microscópio ótico foi determinada a concentração de ovos.

Em cada vaso contendo a mistura de pó de coco e solo autoclavado foi transplantada uma planta de alface contendo de 3 a 4 pares de folhas e, em seguida, inoculada com 100 µL de uma suspensão nematoide contendo 600 ovos de *M. incognita*, diluído em 5 mL de água destilada, por ponto de inoculação. Foram realizadas inoculações em três pontos ao redor do sistema radicular. Os vasos foram mantidos em estufa agrícola, com irrigação por microaspersão e após 35 dias foi realizada a colheita das raízes.

No tratamento controle foi empregada a mesma metodologia acima descrita para inoculação com os ovos de nematoides, mas não houve a mistura do solo com fungos.

Os parâmetros analisados foram o número de galhas e massas de ovos por raiz de alface, segundo a metodologia descrita por Freitas *et al.* [6].

Os resultados obtidos de número de galhas e de massas de ovos foram transformados em  $X = \sqrt{X}$ . Os parâmetros analisados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo delineamento inteiramente casualizado, com cinco tratamentos (controle + 4 isolados fúngicos), com cinco repetições, sendo uma planta de alface por repetição. O aplicativo utilizado foi o ASSISTAT [22] e as comparações entre médias foram feitas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os isolados fúngicos de *Pleurotus ostreatus* reduziram o número médio de galhas e de massas de ovos formadas pela espécie nematoide *M. incognita* em plantas de alface (Luisa), em relação ao controle, mas não houve diferença entre os isolados testados (Tabela 1).

Tabela 1. Eficiência de isolados o fungo *Pleurotus ostreatus* na redução do número de galhas e de massas de ovos de *Meloidogyne incognita* em raízes de alface Luisa

Tratamentos	Número de galhas	Número de massas de ovos
Controle	287,0 b*	155,3 a
DF39	73,0 a	13,0 b
EF58	30,6 a	5,0 b
EF60	34,3 a	2,8 b
PS05	76,7 a	19,5 b
Média	100,3	39,1
CV	38,1%	35,1%

\*Comparações, por coluna, entre as médias seguidas por letras minúsculas distintas, diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ )

Thorne e Barron [22] foram os primeiros a relatar que fungos decompositores de madeira possuem a capacidade de capturar, matar e digerir nematoides. Estes autores relataram que 11 espécies de fungos pertencentes à ordem Agaricales, incluindo *Pleurotus ostreatus*, tem a capacidade de matar nematoides de galhas. Já Palizi *et al.* [15] relataram que esta espécie reduziu a formação de cistos do nematoide *Heterodera schachtii*.

A eficiência de isolados de *Pleurotus ostreatus* no controle do nematoide das galhas, também foi citado por Putzke *et al.* [18]. Da mesma forma, Truong *et al.* [23] e Maccheroni Júnior *et al.* [11] citam que *Pleurotus ostreatus* e espécies relacionadas possuem células especializadas nas hifas capazes de produzir pequenas gotas de uma substância contendo toxinas. O nematoide ao entrar em contato com esta substância sofre uma reação de paralisia e lise da cutícula. Embora

vivo, o nematoide permanece imóvel e os líquidos que extravasam de seus tecidos estimulam o crescimento de hifas do fungo em sua direção, em um processo de quimiotaxia. Essas hifas penetram, então, nos tecidos do nematoide digerindo-os e absorvendo os nutrientes liberados.

Satou *et al.* [20] observaram que *Pleurotus ostreatus* produz bolhas com atividade anti-nematoide. Estas bolhas promoveram a redução da “cabeça” do nematoide devido à liberação do ácido linoleico na solução. Estes autores relataram que, a concentração máxima de ácido linoleico foi de 1mM, para que tivesse efeito na redução da “cabeça”, após 2-4 horas de incubação. Além disso, estes autores observaram que o emprego de peróxido de hidrogênio foi o componente responsável pela atividade anti-nematoide do ácido linoleico.

Já Lopes *et al.* [9] citam que os fungos “caçadores” de nematoides apresentam diversos mecanismos de predação, podendo passar um período de sua existência como saprófita e outra parte como parasítica, dependendo dos fatores que estimulem a liberação de esporos, como a interação fungo-nematoide.

Dentre as cultivares de alface, as de folhas lisas, como Luisa, são consideradas altamente suscetíveis à infecção por nematoides do gênero *Meloidogyne* [1]. Entretanto, é importante ressaltar que o emprego do fungo *Pleurotus ostreatus* reduziu a suscetibilidade da cultivar de alface ao *Meloidogyne*. As raízes de alface sem a inoculação do fungo *P. ostreatus*, apresentaram, em média, 287,0 galhas e 155,3 massas de ovos, como uma cultivar altamente suscetível a *M. incognita*, segundo a classificação de Charchar *et al.* [2]. Por outro lado, a inoculação dos fungos na alface Luisa resultou em 30,6 a 76,7 massas de ovos e de 2,5 a 5,0 massas de ovos, sem diferença dos isolados testados (Tabela 1), sendo a alface classificada como moderadamente resistente a *M. incognita*, segundo Charchar *et al.* [2].

Considerando que no ciclo reprodutivo do *Meloidogyne* em cada massa de ovos contem cerca de 400 a 500 ovos e que após quatro ciclos ou gerações serão formados 390.625 adultos [3]. A redução do número de massas de ovos observada com a inoculação dos isolados de *P. ostreatus* testados poderá contribuir para redução da população deste nematoide em condições de campo, como citado por Perry e Moens [17], como critério para seleção de variedades resistentes a nematoides de galhas.

A combinação de agentes de controle biológico, como fungos e bactérias nematófagos, é uma abordagem que tem ganhado mais impulso, principalmente, nos últimos dez anos [10]. O mesmo autor ainda cita que diversos autores têm verificado efeito das combinações sobre o vigor das plantas e supressão no número de fêmeas, ovos, juvenis, e galhas, principalmente envolvendo espécies de *Meloidogyne*.

A utilização de inoculantes fúngicos deve fazer parte de um conjunto de medidas de manejo das fitonematoses em alface, tais como a adição da matéria orgânica, que estimula a atividade microbiana do solo e possibilita o estabelecimento dos fungos parasitas e/ou predadores, dentre outros microrganismos do solo, potencializando o controle dos nematoides, além de contribuir para disponibilização de nutrientes para plantas, o que favorece a tolerância aos agentes fitopatogênicos.

#### 4. CONCLUSÃO

O emprego de *Pleurotus ostreatus* reduz o número de galhas e de massas de ovos de *Meloidogyne incognita*.

#### 5. AGRADECIMENTOS

À Fundação de Apoio à Pesquisa e à Inovação Tecnológica do Estado de Sergipe (FAPITEC-SE) pelo apoio financeiro.

- 
1. CHARCHAR, J. M.; MOITA, A. W. Metodologia para seleção de hortaliças com resistência a nematoides: Alface/ *Meloidogyne* spp. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2005. 8p. (Embrapa Hortaliças. Comunicado Técnico,26).

2. CHARCHAR, J.M.; GIORDANO, L.B.; BOITEUX, L.S. Metodologia para seleção de hortaliças com resistência a nematoides: Famílias Convolvulaceae e Solanaceae/*Meloidogyne* spp. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2003. 4p. (Embrapa Hortaliças. Comunicado Técnico, 21).
3. FIORINI, C.V.A.; GOMES, L.A.A.; LIBÂNIO, R.A.; MALUF, W.R.; CAMPOS, V.P.; LICURSI, V.; MORETTO, P.; SOUZA, L.A. DE; FIORINI, I.V.A. Identificação de famílias F2: 3 de alface homozigotas resistentes aos nematoides-das-galhas. Horticultura Brasileira, v.25, n.3, p.509-513, 2007.
4. FREITAS, L.G.; NEVES, W.S.; OLIVEIRA, R.D.L. Métodos em nematologia vegetal. In: Alfnas, A.C.; Mafia, R.G. (Eds). Métodos em fitopatologia. Viçosa: Editora UFV, 2007. cap. 11, p.262-263.
5. GIROTTO, M. J.; AQUINO, L. F. B.; PEREZ, R. B.; NEVES, M. F.; SACO, S. R. O uso de fungos nematófagos no controle biológico de nematoides parasitas: revisão de literatura. Revista Científica e Eletrônica de Medicina Veterinária, v.7, n.10, p.1-7, 2008.
6. JONATHAN, E.I.; RAJENDRAN, G. Biocontrol potential of the parasitic fungus *Paecilomyces lilacinus* against the root knot nematode *Meloidogyne incognita* in banana. Journal Biology Control, v.14, n.1, p.67-69, 2001.
7. KAMZOLKINA, O.V.; GRISHANINA, A.N.; PANCHEVA, E.V.; VOLKOVA, V.N.; KOZLOVA, M.V. Micromorphological features of *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quel. and *P. ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. strains in pure and binary culture with yeasts. Tsitologiya, v.48, n.1, p.153-160, 2006.
8. KRZYŻANOWSKI, A. A. Controle biológico de nematoides de galha do cafeeiro com fungos nematófagos. 2006. 76f. Tese (Doutorado). Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita", Jaboticabal.
9. LOPES, E.A.; FERRAZ, S.; FREITAS, L.G.; FERREIRA, P.A.; AMORA D.X. Efeito dos extratos aquosos de mucuna preta e de manjeriço sobre *Meloidogyne incognita* e *M. javanica*. Nematologia Brasileira, v.29, n.1, p.67-74, 2005.
10. LOPES, E. A. Formulações de condicionadores de solo com propriedades nematicidas. 2007. 112f. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
11. MACCHERONI, W.; ARAÚJO, W.L.; LIMA, A.O.S. Ecologia: habitat e interações fúngicas com plantas, animais, fungos e bactérias. In: ESPOSITIVO, E. e AZEVEDO, J. L. (Eds.). Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. Caxias do Sul: EDUCS, 2004. p. 451-490.
12. MARINO, R.H.; EIRA, A.F. DA; CARDOSO, E.Q. Melhoramento genético de *Pleurotus ostreatus* (Jacq.:Fr.) Kumm. Hoehnea, v.33, n.3, p.349-357, 2006.
13. MARINO, R.H.; ABREU, L.D.; MESQUITA, J.B.; RIBEIRO, G.T. Crescimento e cultivo de diferentes isolados de *Pleurotus ostreatus* (Jacq. Fr.) Kummer em serragem da casca de coco. Arquivos do Instituto Biológico, v.75, n.1, p.29-36, 2008.
14. MOURA, C.R.W. Coeficiente de cultura baseado no conceito de graus - dia e avaliação de métodos de estimativa de evapotranspiração da alface hidropônica sob ambiente protegido. 2007. 94f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.
15. PALIZI, P.; GOLTAPPEH, E.M.; POURJAM, E.; SAFAIE, N. Potencial of oyster mushrooms for the biocontrol of sugar beet nematode (*Heterodera schachtii*). Journal of Plant Protection Research, v.49, n.1, p.27-34, 2009.
16. PIMENTEL, M.S.; PEIXOTO, A.R.; 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.
17. PERRY, R. N.; MOENS, M. Plant Nematology. London: British Library, 2006. 463p.
18. PUTZKE, M.T.L.; MATSUMURA, A.T.S.; CAVALCANTI, M.A.Q.; FILHO, A.C. Taxonomia e importância das espécies de *Hohenbuehelia*, *Resupinatus* e *Pleurotus* no controle de *Meloidogyne javanica*. Caderno de Pesquisa série Biologia, v.19, n.3, p.38-81, 2007.

- 
19. SANCHEZ, S. V. Avaliação de cultivares de alface crespa produzidas em hidroponia tipo NFT em dois ambientes protegidos em Ribeirão Preto (SP). 2007. 78f. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita”, Jaboticabal.
  20. SATOU, T.; KANEKO, K.; LI, W.; KOIZE, K. The toxin produced by *Pleurotus ostreatus* reduces the head size of nematodes. Biol. Pharm. Bull., v.31, n.4, p.574-476. 2008.
  21. SILVA, F.A.S.E.; AZEVEDO, C.A.V. DE. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, v.4, n.1, p.71-78, 2002.
  22. THORN, R.G.; BARRON, G.L. Carnivorous mushrooms. Science, v.224, n.1, p.67-78, 1984.
  23. TRUONG, B.N.; OKAZAKI, K.; FUKIHARU, T.; TAKEUCHI, Y.; FUTAI, K.; LE, X.T.; SUZUKI, A. Characterization of the nematocidal toxocyst in *Pleurotus* subgen. *Coremiopleurotus*. Mycoscience, v.48, n.1, p.222–230, 2007.