

FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES NO CONTROLE DE *Meloidogyne incognita* EM MUDAS DE TOMATEIRO¹

CARLA DA SILVA SOUSA^{2*}, ANA CRISTINA FERMINO SOARES², JOÃO LUIZ COIMBRA³, MARLON DA SILVA GARRIDO², GISELE DA SILVA MACHADO²

RESUMO - Os fungos micorrízicos arbusculares tem demonstrado afetar algumas espécies de nematóides fitoparasitos, reduzindo em muitos casos a ovoposição e o número de galhas no sistema radicular de plantas infectadas. Com o objetivo de avaliar o potencial biocontrole de fungos micorrízicos arbusculares em reduzir a infectividade de *Meloidogyne incognita* em mudas de tomateiro, foi conduzido um experimento com delineamento experimental em blocos casualizados com oito repetições, em esquema fatorial com os seguintes tratamentos: com e sem *M. incognita*, com presença e ausência das espécies fúngicas *Glomus clarum* Nicolson & Schenck, *Gigaspora albida* Schanck & Smith e *Acaulospora scrobiculata* Trappe. O fungo *G. clarum* promoveu redução significativa do índice de galhas (46,4%) e do número de massa de ovos (78,8%) do nematóide nas mudas de tomateiro. O percentual de colonização radicular não é por si só um indicativo da eficiência fúngica em controlar a infectividade de *M. incognita* em mudas de tomateiro, uma vez que *A. scrobiculata* apresentou alto grau de colonização (77,6%) e não foi eficiente em controlar a reprodução do nematóide. As espécies de fungos micorrízicos arbusculares diferem quanto a eficiência em reduzir a infectividade de *M. incognita* em mudas de tomateiro.

Palavras chave: *Lycopersicon esculentum* Mill. Nematóide de galhas. Micorriza.

ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI IN THE CONTROL OF *Meloidogyne incognita* IN TOMATO SEEDLINGS

ABSTRACT - Mycorrhizal fungi has been shown to affect some species of parasitic nematodes, in many cases reducing oviposition and the number of galls on the root system of infected plants. In order to evaluate the biocontrol potential of arbuscular mycorrhizal fungi to reduce the infectivity of *Meloidogyne incognita* in tomato plants, an experiment was conducted with a randomized block design with eight replications in a factorial with the following treatments: with and without *M. incognita*, with presence and absence of fungal species *Glomus clarum* Nicolson & Schenck, *Gigaspora albida* Schanck & Smith and *Acaulospora scrobiculata* Trappe. The fungus *G. clarum* significantly reduced the gall index (46.4%) and the number of egg mass (78.8%) of the nematode on tomato seedlings. The percentage of root colonization is not in itself an indicator of efficiency in controlling fungal infectivity of *M. incognita* in tomato plants, since *A. scrobiculata* exhibited a high degree of colonization (77.6%) and was not effective in controlling nematode reproduction. The species of mycorrhizal fungi differ in efficiency in reducing the infectivity of *M. incognita* in tomato seedlings.

Keywords: *Lycopersicon esculentum* Mill. Gall nematode. Mycorrhiza.

*Autor para correspondência.

¹Recebido para publicação em 02/06/2009; aceito em 10/05/2010.

²Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas – UFRB, 44380-000, Cruz das Almas - BA; cssagro@yahoo.com.br; fermino-soares@gmail.com; garridoms@yahoo.com.br; agrogisele@hotmail.com

³Departamento de Ciências Humanas, Campus IX - UNEB, 47800-000, Barreiras - BA; joaoluizcoimbra@hotmail.com

INTRODUÇÃO

O tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) é a mais importante hortaliça cultivada no Brasil, embora do ponto de vista agrônomo seja uma cultura complexa e de risco econômico elevado, principalmente em virtude da susceptibilidade a diversos fitopatógenos (FILGUEIRA, 2000). Em quase todas as regiões do mundo, um dos problemas fitossanitários mais prejudiciais ao tomateiro é a meloidoginose. Essa doença é causada por nematóides do gênero *Meloidogyne* spp., conhecidos como nematóides de galhas, devido ao sintoma característico de formação de galhas nas raízes da planta. A formação de galhas nas raízes do tomateiro impede a absorção de água e nutrientes do solo, provocando deficiência mineral e perda de produtividade da ordem de 25 a 85% (RESENDE; COSTA, 2000).

O controle de nematóides com nematicidas constitui um dos manejos mais antigos na agricultura (CHITWOOD, 2002). Entretanto, nematicidas de solo, além de apresentar elevado custo, são prejudiciais à saúde humana, animal e ao meio ambiente, e são pouco eficientes no controle da meloidoginose em hortaliças (FILGUEIRA, 2000). Muitas espécies de nematóides parasitas de plantas são migratórias no solo ou dentro das raízes, como por exemplo, os do gênero *Meloidogyne*, ficando distantes do local de aplicação do nematicida químico, de modo que este não consegue atingi-los. Outro fator limitante ao controle químico é que esses organismos apresentam estruturas, como cutículas, que são impermeáveis a muitas moléculas orgânicas (THOMAS, 1996).

O controle biológico tem se apresentado como alternativa viável para o manejo de fitonematóides, por minimizar o dano ambiental, além de ser mais vantajoso economicamente, quando comparado aos métodos químicos convencionais (COIMBRA; CAMPOS, 2005). As micorrizas arbusculares são associações simbióticas mutualistas entre raízes de plantas e fungos do filo Glomeromycota (SCHUSSLER et al., 2001), que favorecem o crescimento e aquisição de nutrientes pela grande maioria das plantas de interesse econômico (CARNEIRO et al., 2008). Plantas em simbiose micorrízica sofrem alterações bioquímicas, fisiológicas e moleculares relacionadas ao sistema de defesa para o estabelecimento da simbiose (GARCIA-GARRIDO; OCAMPO, 2002) conferindo-lhes aumento da resistência contra patógenos incluindo os nematóides (POZO et al., 2002; ELSÉN et al., 2003; ELSÉN et al., 2008).

Além de indução de resistência, como mecanismos envolvidos, podem ser considerados a melhoria do estado nutricional da planta hospedeira, compensação do dano causado pelo patógeno, mudanças anatômicas e morfológicas no sistema radicular do hospedeiro e competição pelo sítio de infecção e sítio de colonização (AZCÓN-AGUILAR; BAREA, 1996; LINDERMAN, 1994; POZO et al., 2002).

Entretanto, nos estudos dessa interação destacam-se em importância a densidade de inóculo do nematóide, a espécie do FMA simbiote, o tempo da micorrização em relação à inoculação do nematóide, a resistência natural da planta ao patógeno e a cultivar da planta testada (MAIA et al., 2005).

É possível que a utilização de FMA possa constituir alternativa para aumentar a tolerância ao nematóide *Meloidogyne incognita* e consequentemente a produtividade do tomateiro, assim como reduzir gastos com nematicidas e fertilizantes, no caso do plantio de mudas micorrizadas em solos infestados por nematóides. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial dos fungos micorrízicos arbusculares *Glomus clarum*, *Gigaspora albida* e *Acaulospora scrobiculata* no controle de *Meloidogyne incognita* em mudas de tomateiro.

MATERIAL E MÉTODOS

Para obtenção dos J2, raízes de tomateiro da cultivar Santa Clara, infestadas com *M. incognita*, em condições de casa de vegetação, foram lavadas com água potável e trituradas em liquidificador por 20 segundos com solução de hipoclorito de sódio a 0,5%, seguindo-se a técnica de Boneti e Ferraz (1981). Em seguida, a suspensão de raízes trituradas foi transferida para um conjunto de peneiras, constituído por uma peneira superior de 60 mesh e uma peneira inferior de 400 mesh. O material retido na peneira inferior foi transferido para câmara de eclosão, montada numa placa de Petri com tela de 35 mesh e papel toalha poroso.

No experimento foram utilizados apenas J2 eclodidos nas 48 horas seguintes à montagem da câmara de eclosão. Para a desinfestação dos J2, a suspensão obtida na câmara de eclosão foi transferida para uma peneira de 400 mesh, na qual os J2 ficaram retidos, sendo esta em seguida imersa em solução de hipoclorito de sódio a 0,5% durante 1 min, seguido de quatro lavagens com água destilada e esterilizada. Para confirmação da espécie, foi realizado o corte na região perineal das fêmeas adultas, conforme método proposto por Taylor e Sasser (1978).

Para a obtenção de inóculo dos fungos micorrízicos arbusculares, sementes de *Brachiaria decumbens* foram desinfestadas com uma solução aquosa de 1% de hipoclorito de sódio e três lavagens em água corrente e, em seguida, foram semeadas em areia esterilizada. Uma semana após a germinação, as plântulas foram transplantadas para vasos com capacidade para 3 kg, contendo solo e areia, na proporção de 3:1, esterilizados em autoclave, a 120°C durante uma hora e meia, em três dias alternados.

Na fase de transplantio, cada plântula foi inoculada, colocando-se junto às raízes, com o auxílio

de uma pipeta Pasteur, uma suspensão aquosa contendo aproximadamente 200 esporos da espécie fúngica por vaso. Os vasos foram mantidos em casa de vegetação por 120 dias, sob irrigações diárias com água destilada.

O experimento foi conduzido em delineamento experimental de blocos inteiramente casualizados, com oito repetições, em arranjo fatorial com e sem *Meloidogyne incognita* e com inoculação ou não dos seguintes fungos micorrízicos arbusculares: *Glomus clarum* Nicolson & Schenck, *Gigaspora albida* Schanck & Smith e *Acaulospora scrobiculata* Trappe.

O solo utilizado no experimento foi esterilizado por autoclavagem a 120°C por uma hora e meia durante três dias alternados, em seguida foi transferido para sacos com capacidade para 400 cm³ e realizado o plantio das sementes de tomate cultivar Santa Clara.

Para os tratamentos com FMA, os esporos das espécies fúngicas foram extraídos do solo dos vasos de produção de inoculo, pelo método do peneiramento úmido (GERDEMANN; NICOLSON, 1963) e centrifugação em sacarose (JENKINS, 1964). Na semeadura, foram colocadas três sementes por vaso e no mesmo momento, fez-se a inoculação com os FMA, colocando-se em volta das sementes, 200 esporos por vaso. Quinze dias depois da germinação do tomateiro, fez-se o desbaste deixando-se 1 planta por vaso e foi realizada a inoculação das mudas com 1000 J2 por planta, através de orifícios no solo, e colocando o inóculo em contato com as raízes, com o auxílio de uma micropipeta de 1 mL.

Quarenta dias depois da inoculação com *M. incognita*, foi realizada coleta das plantas, separando-se as raízes, que foram lavadas em água corrente e, em seguida pesadas em balança analítica para determinação do peso fresco. Parte das raízes foi imersa em solução de fucsina ácida a 0,15% durante 20 minutos, e com auxílio de um microscópio estereoscópio (40x) foi realizada a contagem das massas de ovos e galhas.

Para determinar a percentagem de colonização micorrízica, outra parte das raízes foram diafanizadas em KOH 10% a 90°C em banho-maria durante 30 minutos, acidificadas em HCl 5% por 1 minuto, e em seguida coloridas com azul de metila 0,05% em lactoglicérol a 90°C em banho-maria por 15 minutos (PHILLIPS; HAYMAN, 1970). As raízes coloridas foram preservadas em frascos de vidro contendo glicérol ácido, até a montagem das lâminas microscópicas com segmentos de 1 cm de comprimento das raízes, cobertas com glicérol ácido e laminula. Foram montadas 10 lâminas por repetição, com 10 segmentos de raiz por lâmina. A contagem dos segmentos colonizados foi feita com auxílio de microscópio ótico (100x), conforme descrito por Melloni e Cardoso (1999).

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e teste de Scott & Knott, a 5% de probabilidade, para a comparação das médias,

utilizando o programa estatístico SISVAR. Os dados referentes a percentagem de colonização micorrízica,

foram transformados em arc sen $\sqrt{x/100}$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O fungo *G. clarum* destacou-se proporcionando uma redução de 46,4% no número de galhas do nematóide *M. incognita* nas raízes das mudas de tomateiro, seguido pelo fungo *G. albida* (redução de 26,8%) (Tabela 1). Foi observada também significativa redução de 78,8 e 71,8% no número de massa de ovos de *M. incognita* colonizadas pelos fungos *G. clarum* e *G. albida*, respectivamente, com relação ao controle. Mudanças de tomateiro inoculadas com o fungo *A. scrobiculata*, não diferiram estatisticamente das mudas controle, com relação ao número de galhas e de massa de ovos de *M. incognita*.

Trabalhos já demonstraram que certas espécies de fungos micorrízicos arbusculares podem reduzir a infecção de nematóides nas raízes das plantas. Plantas de tomate inoculadas com *G. fasciculatum*, apresentaram significativa redução no número de galhas (66,1%) e de massas de ovos (66,5%) em comparação às plantas controle não micorrizadas (SHREENIVARA et al., 2007). Zhang et al. (2008), verificaram que *G. intraradices*, *G. mosseae* e *G. versiforme*, reduziram a reprodução de *M. incognita* em raízes de pepino. A densidade de *M. incognita* no solo foi reduzida em 85% quando mudas de tomate foram colonizadas por *G. mosseae* (TALAVERA et al., 2001). Estes autores verificaram também neste estudo que este fungo reduziu em 49% a população de *Pratylenchus penetrans* no solo rizosférico de plantas de cenoura.

Segundo Benedetti (2005), o efeito dos fungos micorrízicos arbusculares sobre a reprodução de nematóides tem sido apontado como dependente do grau de colonização das raízes por esses microrganismos. Entretanto, verificou-se no presente trabalho que o fungo *A. scrobiculata* que apresentou maior grau de colonização (77,6%) em relação às demais espécies fúngicas, não reduziu a reprodução do nematóide (Tabela 1), sugerindo que a interação planta-fungo-parasita ocasiona diversos efeitos e essa variabilidade de respostas pode ser explicada pela especificidade do trinômio e alterações no ambiente, genótipo da planta, espécie do nematóide e isolado fúngico podem levar à diversidade de resultados (HOL; COOK, 2005).

As espécies fúngicas *G. clarum* e *G. albida*, apresentaram alto grau de colonização radicular tanto na presença (74,4 e 70,2% respectivamente), quanto na ausência (63,0 e 64,5%) de *M. incognita* (Tabela 2). Brandão et al. (2004), também observaram que a presença de *P. coffeae* não influenciou a colonização

Tabela 1. Índice de galhas e número de massa de ovos por grama de raiz nas mudas de tomateiro inoculadas com fungos micorrízicos.

Espécie fúngica	Índice de galhas g raiz ⁻¹		Massa de ovos g raiz ⁻¹	
	Número	Redução (%)	Número	Redução (%)
Controle (não inoculado)	235 a	-	245 a	-
<i>Glomus clarum</i>	126 c	46,4	52 b	78,8
<i>Gigaspora albida</i>	172 b	26,8	69 b	71,8
<i>Acaulospora scrobiculata</i>	183 a	22,1	206 a	15,9

Letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott & Knott, a 5% de probabilidade.

Tabela 2. Colonização radicular por fungos micorrízicos arbusculares em mudas de tomateiro infectadas e não infectadas com de *M. incognita*.

Espécie fúngica	Colonização radicular (%) por fungos micorrízicos	
	Mudas com <i>M. incognita</i>	Mudas sem <i>M. incognita</i>
Controle (não inoculado)	0bA	0cA
<i>Glomus clarum</i>	74,4 aA	63,0 aA
<i>Gigaspora albida</i>	70,2 aA	64,5 aA
<i>Acaulospora scrobiculata</i>	77,6 aA	44,5 bB

Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Scott & Knott, a 5% de probabilidade. Letras maiúsculas comparam na linha a colonização radicular por cada espécie fúngica com e sem a presença do nematóide. Letras minúsculas comparam na coluna a colonização radicular pelas diferentes espécies fúngicas com e sem a presença do nematóide.

radicular por *G. etunicatum* e *A. longula* em mudas de graviola. Entretanto, as mudas apresentaram maior grau de colonização pelo fungo *A. scrobiculata* na presença (77,6%) que na ausência (44,5%) de *M. incognita*, sugerindo que possivelmente a competição com o nematóide pode ter estimulado a colonização radicular como uma estratégia de sobrevivência do fungo (HART; READER, 2002). O alto grau de colonização pelo fungo *A. scrobiculata* na presença do *M. incognita* como uma estratégia de sobrevivência e não como efetividade simbiótica, possivelmente justifica o não controle da infectividade causada por este nematóide nas raízes das mudas de tomateiro.

CONCLUSÕES

Os fungos *G. clarum* e *G. albida* são eficientes em reduzir a infectividade de *M. incognita* em mudas de tomateiro, sugerindo que estes podem ser utilizados com agentes de biocontrole;

O grau de colonização radicular pelas espécies fúngicas não é por si só um indicativo do controle da infectividade de *M. incognita* em mudas de tomateiro;

As espécies de fungos micorrízicos arbusculares diferem quanto à eficiência em reduzir a infectividade de *M. incognita* em mudas de tomateiro.

REFERÊNCIAS

AZCÓN-AGUILAR, C.; BAREA, J. M. Arbuscular micorrizas and biological control of soil-borne plant pathogens – an overview of the mechanisms involved. **Mycorrhiza**, v. 6, n. 6, p. 457-464, 1996.

BENEDETTI, T. **Controle biológico (*Glomus etunicatum*), químico (fipronil) e estudo molecular (PCR-ITS) do nematóide do cisto da soja (*Heterodera glycines* Ichinohe)**. 2005. 57 f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2005.

BONNETI, J. I. S.; FERRAZ, S. Modificação do método de Hussey e Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* do cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 6, n. 3, p. 553, 1981.

BRANDÃO, J. A. C. et al. Interação entre fungos micorrízicos arbusculares e *Pratylenchulus coffeae* na produção de mudas de graviola (*Annona muricata*). **Nematologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 1, p. 27-33, 2004.

CARNEIRO, R. F. V. et al. Bagaço de cana-de-açúcar como substrato para multiplicação de fungos

- micorrízicos arbusculares e sua influência sob o estiolosantes. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 21, n. 5, p. 189-196, 2008.
- CHITWOOD, D. J. Phytochemical based strategies for nematode control. **Annual Review of Phytopathology**, v.40, p. 221-249, 2002.
- COIMBRA, J. L.; CAMPOS, V. P. Efeito de exsudados de colônias e de filtrados de culturas de actinomicetos na eclosão, motilidade e mortalidade de juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne javanica*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n.3, p. 232-238, 2005.
- ELSEN, A. et al. Effects of an arbuscular mycorrhizal fungus and two plant-parasitic nematodes on *Musa* genotypes differing in root morphology. **Biology and Fertility of Soils**, v. 38, n. 6, p. 367-376, 2003.
- ELSEN, A. et al. AMF-induced biocontrol against plant parasitic nematodes in *Musa* sp.: a systemic effect. **Mycorrhiza**, v. 18, n. 5, p. 251-256, 2008.
- FILGUEIRA, F. A. R. **Manual de oleicultura**: cultura e comercialização de hortaliças. São Paulo: Ed. Agrônômica Ceres, 2000. v. 2, 357 p.
- GARCIA-GARRIDO, J. M.; OCAMPO, J. A. Regulation of the plant defence response in arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 373, p. 1377-1386, 2002.
- GERDEMANN, J. W.; NICOLSON, T. H. Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. **Transaction British Mycological Society**, v. 46, p. 235-244, 1963.
- HART, M. M.; READER, R. J. Taxonomic basis for variation in the colonization strategy of arbuscular mycorrhizal fungi. **New Phytologist**, v. 153, n.2, p. 335-344, 2002.
- HOL, W. H. G.; COOK, R. An overview of arbuscular mycorrhizal fungi–nematode interactions. **Basic and Applied Ecology**, v. 6, n. 6, p. 489-503, 2005.
- JENKINS, W.R.A. Rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. **Plant Disease Report**, v. 48, n. 2, p. 692. 1964.
- LINDERMAN, R. G. Role of VAM fungi in biocontrol. In: PFLEGER, F. L.; LINDERMAN, R. G. (Ed.). **Mycorrhiza and plant health**. St. Paul: APS, 1994. p. 1-24.
- MAIA, L. C.; SILVEIRA, N. S. S.; CAVALCANTE, U. M. T. Interação entre fungos micorrízicos arbusculares e patógenos radiculares. In: MICHEREFF, S. J. (Org.). **Ecologia e Manejo de patógenos em solos tropicais**. 1. ed. Recife: UFRPE, 2005. p. 183-205.
- MELLONI, R.; CARDOSO, E. J. B. N. Quantificação de micélio extrarradicular de fungos micorrízicos arbusculares de plantas cítricas. II. Comparação entre diferentes espécies cítricas e endófitos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 23, n. 1, p. 59-67, 1999.
- PHILLIPS, J. M.; HAYMAN, D. S. Improved procedures for clearing root and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. **Transaction British Mycological Society**, v. 55, n. 1, p. 158-161, 1970.
- POZO, M. J. et al. Localized versus systemic effect of arbuscular mycorrhizal fungi on defense responses *Phytophthora* infection in tomato plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 368, p. 525-534, 2002.
- RESENDE, G. M.; COSTA, N. D. Produtividade de cultivares de tomate industrial do Vale do São Francisco. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 18, n. 2, p. 126-129, 2000.
- SHREENIVARA, K. R.; KRISHNAPPA, K.; RAVICHANDRA, N. G. Interaction effects of arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus fasciculatum* and root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* on growth and phosphorous uptake of tomato. **Karnataka Journal of Agricultural Sciences**, v. 20, n.1, p. 57-61, 2007.
- SCHUSSLER, A.; SCHWARZOTT, D.; WALKER, C. A. New fungal phylum, the glomeromycota: phylogeny and evolution. **Mycological Research**, v. 105, n. 12, p. 1413-1421, 2001.
- TALAVERA, M.; ITOU, K.; MIZUKUBO, T. Reduction of nematode damage by root colonization with arbuscular mycorrhiza (*Glomus* spp.) in tomato – *Meloidogyne incognita* (Tylenchida: Meloidogynidae) and carrot – *Pratylenchus penetrans* (Tylenchida: Pratylenchidae) pathosystems. **Applied Entomology and Zoology**, v. 36, n.3, p. 387-392, 2001.
- TAYLOR, A. L.; SASSER, J. N. **Identification and control of rootknot nematodes (*Meloidogyne* spp.)**. Raleigh: North Carolina State University, 1978. 111 p.

THOMAS, W. B. Methyl bromite: effective pest management tool and enviromental threat. **Supple Journal Nematology**, v. 28, p. 586-590, 1996.

ZHANG, L.; ZHANG, J.; CHRISTIE, P.; LI, X. Pre-inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi suppresses root knot nematode (*Meloidogyne incognita*) on cucumber (*Cucumis sativus*). **Biology and Fertility of Soils**, v. 45, n. 2, p. 205-211, 2008.