

Pleurotus spp. NO CONTROLE DE *Meloidogyne incognita* NA CULTURA DA SOJA

Maria Claudia Guimarães Carpi¹, Vanusa Lara Previato Barbosa², Simone de Melo Santana Gomes^{1*}, Cleyton Emanuel dos Santos³, Raiane Pereira Schwengber⁴, Giani Andrea Linde⁵, Nelson Barros Colauto⁵ e Ana Daniela Lopes⁵

¹Programa de Pós-graduação em Ciências Agrárias, UEM, Umuarama – PR. E-mail: mahcappi@hotmail.com; sms.nema@gmail.com

²Engenheira Agrônoma, UNIPAR, Umuarama – PR. E-mail: lara.barbozaa@hotmail.com

³Discente do curso de Engenharia Agrônômica, UNIPAR, Umuarama – PR. E-mail: cleyton.santos@edu.unipar.br

⁴Mestre em Ciências Agrárias, UEM, Umuarama – PR. E-mail: raiane_schwengber@hotmail.com

⁵Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Aplicada à Agricultura, UNIPAR, Umuarama, PR. E-mail: gianilindecolauto@gmail.com; nelsonbcolauto@gmail.com; anadanielalopes@prof.unipar.br

RESUMO: Fitonematoides são vermes microscópicos que parasitam plantas, no qual o gênero *Meloidogyne* sp. causa grandes prejuízos em culturas de importância agrícola, como na soja. Entre os métodos de controle, destaca-se o controle biológico com fungos. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito de duas cepas do gênero *Pleurotus* no controle de *Meloidogyne incognita* na cultura da soja, associado à ocorrência de marcador oxidativo. Inoculou-se 4000 ovos e eventuais juvenis, com arranjo fatorial 2x2 +1, e duas cepas do fungo *Pleurotus ostreatus* (U12-4) e *Pleurotus pulmonarius* (U16-21) em duas concentrações (2,5 e 10,0 mg 100 mL⁻¹) e um tratamento sem aplicação do fungo. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, com seis repetições totalizando 30 unidades experimentais. Após 30 dias da inoculação, avaliou-se massa fresca da raiz (g), nematoides/g de raiz com o teste de penetração, conteúdo de aldeído malônico (MDA) nas folhas e raízes. As concentrações de *Pleurotus* spp. reduziram em 58% o número de nematoides por grama de raiz. O marcador oxidativo nas folhas demonstraram diferenças significativas entre as concentrações fúngicas, enquanto na raiz obteve-se diferença significativa nas concentrações e cepas, porém na concentração de 10 mg 100 mL⁻¹, a cepa U12-4 promoveu maior dano oxidativo na raiz.

Palavras-chave: controle biológico, nematoide das galhas, fungo nematófago.

Pleurotus spp. IN THE CONTROL OF *MELOIDOGYNE INCOGNITA* IN SOYBEAN CROP

ABSTRACT: Phytomatoides are microscopic veres that parasitize plants, in which the genus *Meloidogyne* sp. damage to crops of agricultural importance, such as soybeans. Among the control methods, biological control with fungi stands out. The objective of this work was to evaluate the effect of two strains of *Pleurotus* spp. on the control of *Meloidogyne incognita* in soybean crop, associated with the occurrence of oxidative marker. 4000 eggs and eventual juveniles were instilled, with a factorial arrangement of 2x2 +1, and two fungal strains of *Pleurotus ostreatus* (U12-4) e *Pleurotus pulmonarius* (U16-21) in two concentrations (2.5 and 10.0 mg 100 mL⁻¹) and one treatment without fungus application. The design used was completely randomized, with six replicates totaling 30 experimental units. After 30 days of inoculation, fresh root mass (g), root nematodes/g were evaluated with the penetration test, malonic aldehyde content (MDA) in the leaves and roots. The concentrations of *Pleurotus* spp. reduced by 58% the number of nematodes per gram from scratch. The oxidative marker in the leaves showed significant differences between fungal concentrations, while in the root there

was a significant difference in concentrations and strains, but at the concentration of 10 mg 100 mL⁻¹, the U12-4 strain promoted greater oxidative damage in the root.

Key words: biological control, gall nematode, nematophagous fungus

INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max*) é uma espécie pertencente à família *Fabaceae* de origem asiática, com o primeiro registro da cultura no Brasil em 1914, no estado do Rio Grande do Sul (Embrapa, 2017). Mundialmente os quatro principais produtores e exportadores de soja são Brasil, Estados Unidos, Argentina e China. No Brasil o estado do Mato Grosso é o maior produtor de soja, seguido do Paraná e Rio Grande do Sul. No Paraná, a soja é cultivada em uma área de 5,438 milhões de hectares produzindo 16,253 milhões de toneladas com produtividade de 2.989 kg/ha (Embrapa, 2019). Dentre as cidades que mais produzem está Ponta Grossa com colheita superior a 2 milhões de toneladas, Campo Mourão com 1,9 milhões de toneladas e Cascavel com 1,5 milhão de tonelada (Popov, 2019).

A cultura da soja está exposta a diversos fatores que podem influenciar de forma negativa seu crescimento, desenvolvimento e produtividade. Dentre eles destacam-se os fitonematoides parasitas de plantas que acarretam prejuízos à inúmeras culturas, tais como soja, milho, algodão, tomate, cana-de-açúcar, dentre outras (Ferraz e Brown, 2016). De acordo com Brida (2016), mais de 100 espécies de nematoides de 50 gêneros diferentes podem causar danos à cultura da soja, entre eles os mais prejudiciais são os formadores de galhas (*Meloidogyne*) e lesões nas raízes (*Pratylenchus*) (Ferraz 2001 e Dias 2010), que podem devastar toda a produção (Dias, 2010).

Os nematoides são patógenos microscópicos de corpos cilíndricos caracterizados pela presença de estilete, parte do corpo por onde se alimenta. O gênero *Meloidogyne incognita* é caracterizado por ser um endoparasita sedentário, ou seja, entra no sistema radicular da planta e se instala onde consegue sugar água e nutrientes da planta sem trocar de lugar, se alimentando e se multiplicando causando galhas no sistema radicular. Entre os sintomas causa nanismo, murcha, clorose, deficiência nutricional, abortamento de vagens, amadurecimento prematuro das plantas, reboleiras nas lavouras e baixa produtividade. Ataca grandes culturas como soja, café, algodão, cana-de-açúcar entre outras.

As perdas de produtividade da cultura da soja relacionam-se à obstrução dos feixes vasculares devido à penetração de nematoides no sistema radicular causando redução na translocação de água e solutos, limitando assim seu potencial produtivo (Galbieri, 2016). Quanto maior a população inicial de nematoides no solo, maiores serão os danos causados,

assim, é vantajoso qualquer método de controle que diminua a população inicial (Pinheiro, 2019). Dentre os métodos há a rotação de culturas com plantas antagonista, não hospedeiras como a crotalária, cravo-de-defunto que tem mostrado resultados expressivos no controle dos nematoides de galhas, porém, nem sempre aceito e adotado pelos produtores. Há também a implantação de alqueive, onde consiste em manter o terreno limpo sem nenhum cultivo, nem plantas daninhas com arações e gradagens em períodos de 20 a 30 dias durante três meses, porém sua eficiência depende de sua duração, temperatura e umidade do solo, além de reduzir o lucro do produtor e tendo de custear mantendo o solo limpo (Pinheiro, 2019). As mais utilizados pelo produtor, tem-se o controle genético e o químico, porém devido às dificuldades em se obter materiais resistentes (Fiorini, 2007) e à alta toxicidade dos nematicidas, faz-se necessário a utilização de medidas alternativas que garantam o sucesso na redução dos danos causados (Araújo, 2012).

Uma dessas medidas alternativas é o controle biológico que, além de não desequilibrar, contaminar e nem deixar resíduos no meio ambiente e no produto colhido, também não apresenta alta periculosidade de manuseio, resistência, perda de eficiência além de não causar desbalanço biológico no solo (Dong, 2006). Potencialmente, pode transformar um solo conducente em supressivo, é barato e de fácil aplicação (Soares, 2006). Conforme Freitas (2011) e Lucon (2014), muitos microrganismos tem apresentado efeito antagônico a fitopatógenos, como os fungos habitantes do solo com potencial biocontrole de fitonematoides (Aparecida, 2015).

Há diversas estratégias de captura ou infecção de nematoides utilizada pelos fungos, podendo ser através de endoparasitismo, parasitismo em ovos e fêmeas, predação, produção de metabólitos tóxicos aos nematoides (Stirling 1991; Jansson 1997; Ferraz 2010). Os fungos que se destacam como nematófagos são *Purpureocillium lilacinum* e *Pochonia chlamydosporia* com grande potencial de controle de fungos oportunistas e parasitas de ovos e de fêmeas (Costa, 2015). Trabalhos realizados com *Trichoderma* spp. também demonstraram resultados positivos para *M. incognita* (Zhang, 2013) e *M. javanica* (Al-hazmi, 2016).

Contudo, outras espécies como as do gênero *Pleurotus* são também capazes de repelir, inibir, produzir metabólitos tóxicos e levar os fitonematoides à morte (Stirling, 1991). Entre esses fungos destaca-se o *Pleurotus ostreatus* conhecido e apreciado por produzir cogumelos comestíveis (Colauto; Eira, 1995; Furlani, 2005). De acordo com Okorie (2011), fungos do gênero *Pleurotus* podem preda fitonematoides como *Meloidogyne* spp, exercendo efeito sobre

eclosão, mobilidade e capacidade de penetração no hospedeiro, podendo também alterar a fisiologia da planta tornando a menos atrativa ao nematoide (Khan, 1997).

Esta característica se deve ao fato do fungo possuir células especializadas nas hifas capazes de produzir pequenas gotas de uma substância contendo toxinas, denominadas ostreatinas, nas quais, ao entrar em contato o nematoide sofre uma reação de paralisia em menos de 30 segundos, seguida de lise da cutícula (BARRON, 1987). 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 (Truong, 2007).

Fitonematoides quando presente em altas densidades populacionais, especialmente em solos arenosos afetam drasticamente a fisiologia da planta hospedeira prejudicando a absorção e o transporte de água e nutrientes (Sousa, 2015). De acordo com Castrillo (2001), as proteínas em nível celular da planta podem ser danificadas por falta de hidratação, ataque de pragas, alta salinidade, aumentando das espécies reativas de oxigênio (EROs), dentre eles o aldeído malônico. Quando formados, os EROs devem ser eliminados a fim de minimizar danos eventuais, como a indução de peroxidação de lipídios a qual promove danos irreversíveis à integridade estrutural e funcional das membranas celulares (Samaras, 1995).

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de duas cepas do gênero *Pleurotus* no controle de *M. incognita* na cultura da soja, associado à ocorrência de marcador oxidativo nas folhas e raízes da soja.

MATERIAL E MÉTODOS

Local de condução do experimento

O experimento foi realizado em condições de casa de vegetação da Universidade Paranaense - UNIPAR, Campus III, no município de Umuarama-PR localizado nas coordenadas 23°45'55"S e 53°17'38"W com solo Latossolo Vermelho Distrófico Típico.

Preparação de meios de cultura (MEA e ME)

Para a repicagem dos fungos preparou-se meio de cultivo a base de extrato de malte com ágar (MEA) a 2% o qual foi autoclavado por 30 minutos a 121°C.

Para a obtenção de biomassa dos fungos, o micélio foi inoculado em meio à base de extrato de malte (ME) a 2%, previamente autoclavados por 30 minutos à 121°C.

Plaqueamento das cepas de Pleurotus spp.

O plaqueamento das cepas dos fungos (U12-4 e U16-21) foi realizado em câmara de fluxo laminar, em placas de Petri de 90x15 mm contendo meio sólido de extrato de malte com ágar (MEA). Utilizou-se um disco de 6 mm de diâmetro em cada placa. As placas foram mantidas em estufa BOD por 7 dias à 28°C. A cepa U12-4 (*Pleurotus ostreatus*) e a cepa U16-21 (*Pleurotus pulmonarius*) foram provenientes da coleção de fungos do laboratório de Biologia Molecular da Universidade Paranaense. As cepas foram criopreservadas de acordo com Mantovani et al. (2012) e Zaghi Jr et al. (2020).

Filtragem e maceração de fungos

Decorridos 14 dias do crescimento do fungo, fez-se a filtragem dos mesmos em câmara de fluxo laminar, a partir de um funil com papel filtro quantitativo. A biomassa micelial retida foi seca por aproximadamente 7 dias à 28°C em estufa.

Após secagem, a biomassa micelial foi macerada em almofariz até tornar-se um pó. A biomassa micelial total foi acondicionada em congelador até sua utilização. Foi utilizada no experimento na forma de pó, aplicado no sulco de semeadura

Obtenção, extração e calibração do inóculo de Meloidogyne incognita

A população de nematoide foi obtida de raízes de soja cv. Monsoy 6410 artificialmente infectadas, cultivadas em solo esterilizado em casa de vegetação para multiplicação dos mesmos. Para inoculação, realizou-se a extração dos espécimes de nematoide do sistema radicular, conforme Hussey e Barker (1973) adaptada por Bonetti e Ferraz (1981). A suspensão foi calibrada para 4000 espécimes/mL, sendo inoculado 1 mL em cada vaso.

Instalação do experimento

O experimento foi instalado em arranjo fatorial 2x2 +1, sendo duas cepas do gênero *Pleurotus* (U12-4 e U16-21) aplicadas em duas concentrações distintas (2,5 e 10 mg 100 mL⁻¹) e um tratamento sem aplicação do fungo. O experimento foi conduzido no período de março a abril de 2019, cujas temperaturas médias mensais foram de 27°C em março e 26°C em abril (Instituto Agrônômico do Paraná).

Foram utilizados vasos plásticos com capacidade para 2 kg de solo (1,5 L), o qual foi autoclavado a 121°C por duas horas, procedendo, na sequência, a calagem do solo (1,2 g/vaso)

e adubou-se com 0,16 g de ureia e 0,18 g de cloreto de potássio por vaso. Após 7 dias da calagem, realizou-se orifícios no centro dos vasos para inoculação dos nematoides, inserindo o fungo nas respectivas concentrações e 4 sementes de soja cv. Monsoy 6410 em cada vaso, nesta ordem. Após a germinação das sementes, realizou-se desbaste, deixando apenas uma muda por vaso.

Decorridos 30 dias da instalação do experimento, avaliou-se os parâmetros nematológicos das plantas. Aferiu-se então massa fresca da raiz (g), nematoides/g de raiz, conteúdo de aldeído malônico (MDA) nas folhas e raízes e método de coloração de nematoides em tecidos vegetais.

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial com 6 repetições totalizando 30 unidades experimentais. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância a 5% de significância, no programa estatístico Sisvar (Ferreira, 2011). Quando a interação foi significativa procedeu o desdobramento dos fatores, utilizando-se Tukey a 5% para comparação das médias.

Extração e quantificação de aldeído malônico (MDA)

Ao final do experimento, amostras contendo 300 mg de raiz e folha foram coletadas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e mantidas sob refrigeração até o momento da análise. Os teores de aldeído malônico foram determinados a partir da extração com ácido tricloroacético (TCA) (Hodges, 1999). As folhas e raízes foram pulverizadas em nitrogênio líquido e homogeneizadas em TCA, seguido de centrifugação e coleta de sobrenadante, ao qual adicionou-se solução de tiobarbitúrico (TBA) em TCA 20%. As amostras foram incubadas em banho-maria (90°C) por 20 minutos, e em seguida a reação foi interrompida em banho de gelo e as amostras centrifugadas a 13.000 rpm por 4 minutos a 25°C. Após centrifugação as amostras foram dispostas em microplacas com 96 poços e procedeu-se a leitura da absorbância em leitora de microplacas SpectraMax Plus 384, nos comprimentos de onda de 400, 532 e 600 nm. Para o cálculo da concentração de MDA nmol por g de matéria fresca utilizou-se a equação: $6,45 \times (A_{532} - A_{600}) - 0,56 \times A_{450}$.

Método de coloração de nematoides em tecido vegetal

A avaliação da penetração de *M. incognita* nas raízes de soja foi realizada pelo método de coloração de nematoides com fucsina ácida após 30 dias da inoculação (Byrd, 1983). Após coloridas, as raízes foram mantidas em glicerina até o preparo das lâminas, que foram

observadas em microscópio ótico, sendo quantificado o número de nematoide presentes em cada sistema radicular.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com os resultados obtidos, observou-se diferença estatística ($p \leq 0,005$) entre os tratamentos para a variável nematoides por grama de raiz (Figura 1), evidenciando o efeito do fungo na redução da penetração dos juvenis de *M. incognita* em raízes de soja. Nas concentrações de 2,5 e 10 mg 100 mL⁻¹ ocorreram reduções populacionais de 62,8 e 53,7%, respectivamente, quando comparadas ao tratamento testemunha, em que não houve aplicação de biomassa micelial do fungo. Em uma eventual recomendação, o mais indicado seria a aplicação de 2,5 mg 100 mL⁻¹ em que se utilizaria menor quantidade de massa micelial, implicando um melhor custo benefício. As plantas apresentavam galhas no sistema radicular caracterizando a presença dos nematoides, com pouca massa fresca radicular causado também pelos nematoides.

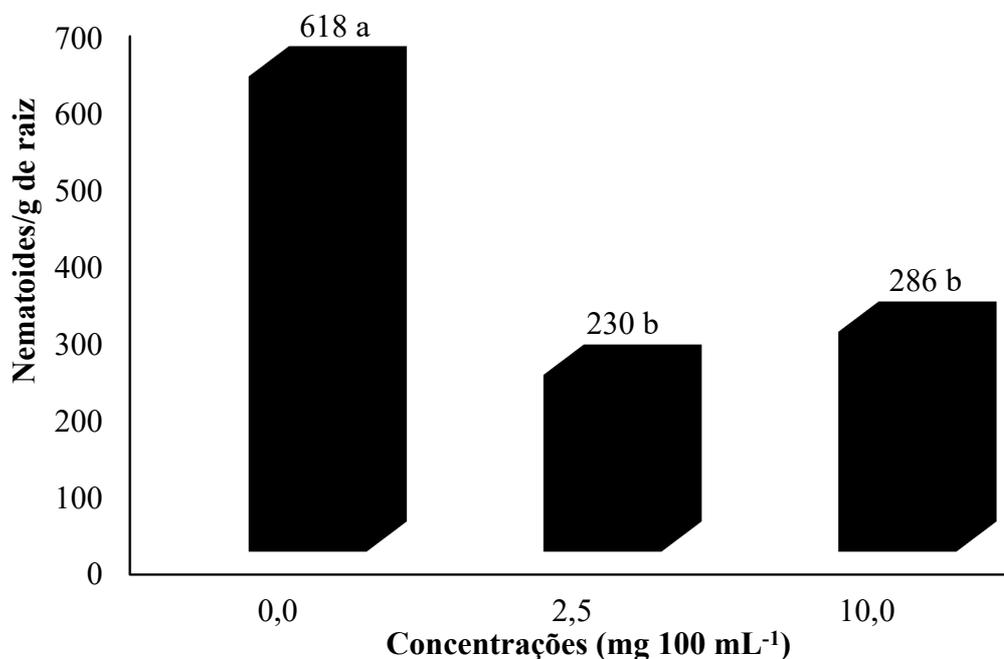


Figura 1 - Número de nematoides *Meloidogyne incognita* por grama de raiz submetidas a diferentes concentrações de *Pleurotus* spp. após 30 dias de cultivo. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. Coeficiente de variação: 46,94%.

Costa (2000), conclui que substâncias produzidas *in vitro* por bactérias e fungos inibem a eclosão, afetam a motilidade e causam também a morte em fitonematoides. Thorn e Barron (1984), relataram que fungos que deterioram a madeira, como os do gênero *Pleurotus* tem capacidade para capturar, matar e digerir nematoides. Esses autores descrevem pela primeira vez o fenômeno de predação por *P. ostreatus* a nematoides, o fungo é capaz de produzir pequenas partículas esféricas que contém a chamada nematotoxina, quando em contato com nematoides ficam repentinamente imobilizados em alguns minutos e a região da cabeça e esôfago diminuem consideravelmente de tamanho.

Okorie (2011), evidenciou que nos tratamentos inoculados com *P. ostreatus* houve 50% de redução do número de *M. incognita*, assim como no presente trabalho. Já Heydari (2006), realizou um trabalho com *P. ostreatus* e concluiu que após 24 horas de incubação, as toxinas produzidas pelo fungo cultivados em meio de cultura líquido foi capaz de paralisar 100% dos juvenis. Truong (2007), Balaes (2016) e Royse (2017) afirmam que após a nematotoxina do fungo entrar em contato com o fitonematoide e o imobilizá-lo, subsequentemente o micélio invade os orifícios do nematoide para se alimentar, extraindo seus nutrientes.

Marino (2013), realizou um trabalho com isolados de *P. ostreatus* na cultura de alface, no qual obteve redução significativa de 20% do número de galhas e 12% de massas de ovos de *M. incognita*. Putzke (2007) também cita a eficiência de isolados de *P. ostreatus* no controle de *M. incognita* nematoide das galhas, assim como Truong (2007) e Maccheroni (2004) que relatam que este fungo e espécies relacionadas intoxicam o nematoide, digerindo-o e absorvendo os nutrientes liberados. Satou (2008), observou que *P. ostreatus* produz bolhas com atividade antinematode que reduziram o tamanho da cabeça do nematoide devido ao ácido linoleico presente na solução com o emprego de peróxido de hidrogênio. Polizi (2008), afirma com estudos preliminares sobre a caracterização dos metabólitos tóxicos produzidos por *Pleurotus* spp., foi caracterizado por ser estável ao calor e dialisável ao composto de baixo peso molecular.

De acordo com Barron e Thorn (1987) *Pleurotus* spp. foram testadas em ágar-água onde afirmou-se a capacidade de infectar nematoides por sua toxina liberada como gotículas por células secretórias da hifa, observadas nas hifas de todas as cepas testadas. Esses mesmos resultados também são afirmados por outros autores como (Heydari, 2006; Palizi, 2006; Palizi, 2007). Palizi (2008) realizou uma pesquisa para identificar o potencial de *P. ostreatus* (isolados com e sem esporos) no controle de *Heterodera schachtii* com teste em estufa e *in vitro*, no qual observou-se uma taxa de 96% de mortalidade após 24 horas em isolado com esporo, enquanto

no isolado sem esporos o resultado foi de 20% de mortalidade. Já no teste em estufa, o número de cistos nas raízes de beterraba foi menor em plantas tratadas com compostos de cogumelos. O estudo confirmou a capacidade de *Pleurotus* spp. capturar, matar e digerir o nematoide de cisto reduzindo a população sob condições *in vitro* e *in vivo* considerado um grande potencial agente de biocontrole.

Kerry (1990) afirma que *Pleurotus* spp. destrói nematoides por sua potente toxina, e a pesquisa nessa área está crescendo, considerando a possibilidade de que genes desse fungo possa ser transferido às plantas ou aos organismos da rizosfera que afetariam o desenvolvimento de nematoides. De acordo com Costa (2015), algumas empresas já produzem produtos à base de microrganismos que possuam potencial antagonistas aos fitonematoides com controle biológico comprovado em pesquisas, reduzindo a utilização de agrotóxicos, evitando perdas, gerando sustentabilidade ao sistema agrícola e produzindo alimentos de qualidade. Atualmente, há buscas por novos metabólitos de fungos e outros microrganismos que tenham ação nematicida com menor impacto ambiental do que as moléculas sintéticas tradicionais. Os resultados obtidos para a variável concentração de MDA nas raízes apresentaram diferença estatística ($p \leq 0,05$) para as concentrações nas cepas U12-4 e U16-21 (Figura 2).

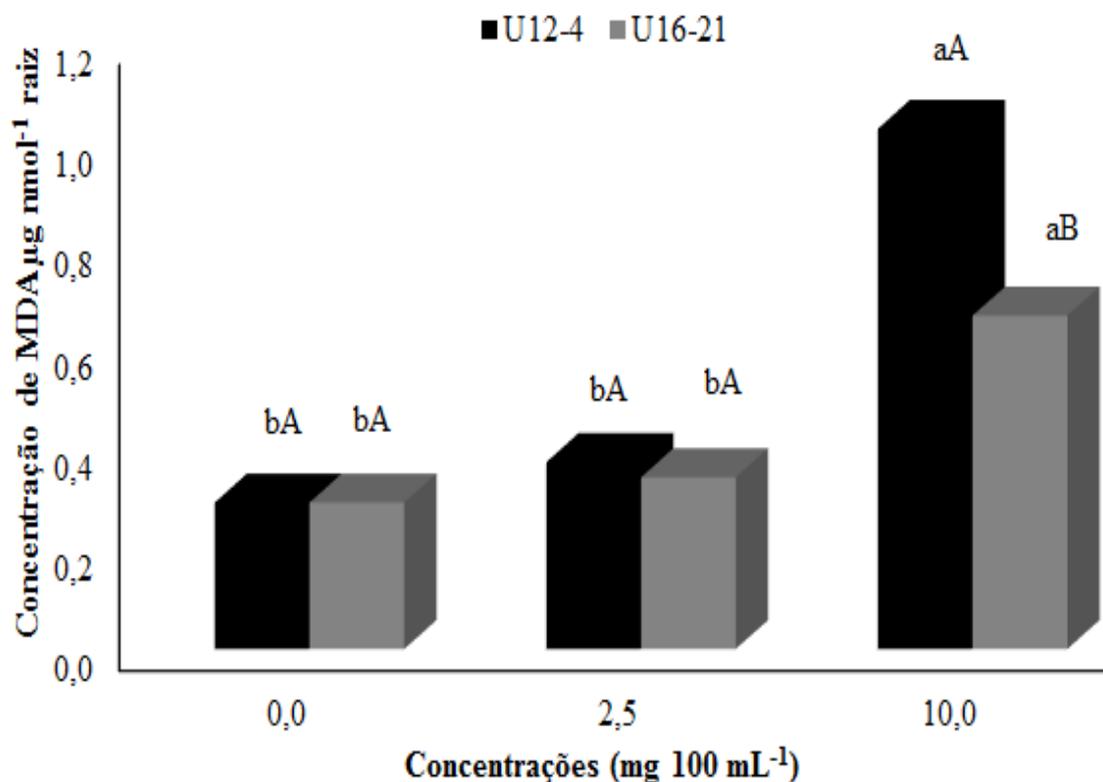


Figura 2 - Concentração de MDA no sistema radicular ($\mu\text{g nmol}^{-1}$) de plantas submetidas a diferentes concentrações do extrato fúngico de *Pleurotus ostreatus* (U12-4) e *Pleurotus pulmonarius* (U16-21) após 30 dias de cultivo. Letras minúsculas não diferem entre si para concentração e letras maiúsculas para cepas pelo teste de Tukey a 5% de significância. Coeficiente de variação: 17,84%.

Nos tratamentos testemunha e 2,5% não houve diferença estatística, com concentrações de 0,25 e 0,35 de MDA ($\mu\text{g nmol}^{-1}$), enquanto na concentração de 10% constatou-se 1,10 ($\mu\text{g nmol}^{-1}$) para U12-4 e 0,7 ($\mu\text{g nmol}^{-1}$) para a cepa U16-21 no qual é possível ver, que a cepa U12-4 foi mais agressiva com maior quantidade de aldeído malônico. Esse resultado na concentração de 10 mg 100 mL⁻¹ foi atípico, pois esperava-se que quanto maior a massa micelial de fungo, menor a concentração de MDA, o que não aconteceu. Valores elevados de MDA representam maior eliminação de espécies reativas de oxigênio (EROs), afim de evitar maiores danos celulares na planta. No entanto, este resultado pode ser explicado. Há a hipótese de que o fungo por degradar lignina pode ter ocasionado este aumento na concentração de 10 mg 100 mL⁻¹ (Azevedo et al., 2009). Como a concentração do fungo era maior, o aumento do conteúdo de MDA pode ser atribuído a ele. Logo, ele controlou o nematoide, contudo, promoveu este dano à planta no sistema radicular.

De acordo com Noctor e Foyer (1998), os EROs são determinados pela intensidade de estresse oxidativo em uma célula responsável pela ocorrência de danos fotoinibitórios e fotooxidativo, nas formas de superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais hidroxil. Os EROs são extremamente reativos ao DNA, RNA, proteínas, lipídios de membranas que ocasionam a perda de seletividade e a capacidade de compartimentalização celular. Um desequilíbrio entre EROs e a atividade de enzimas antioxidantes podem gerar um excesso de radicais livres que causam peroxidação de lipídeos, desnaturação de proteínas, entre outros efeitos que conseqüentemente podem resultar no aumento de extravasamento de eletrólitos e na perda de compartimentalização celular (Asada, 1999), o que explica o resultado do presente trabalho.

Nos resultados obtidos para a variável concentrações de MDA na folha houve diferença estatística ($p \leq 0,005$) apenas para as concentrações do extrato fúngico (Figura 3).

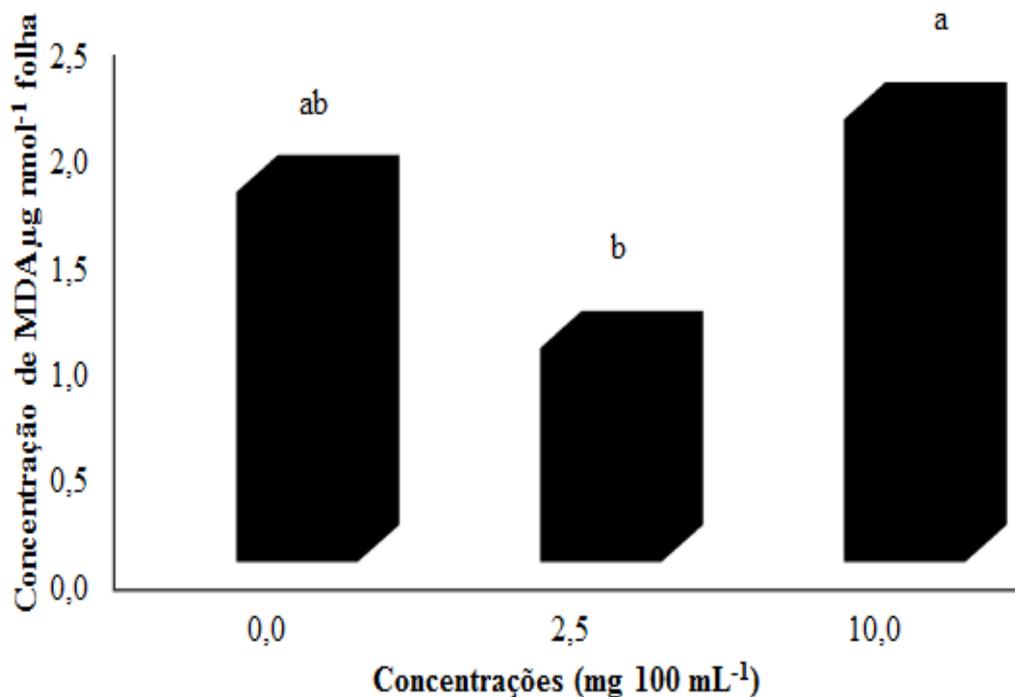


Figura 3 - Concentração de MDA na parte aérea de soja ($\mu\text{g nmol}^{-1}$) submetidas a diferentes concentrações do extrato fúngico de *Pleurotus* spp. após 30 dias de cultivo. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. Coeficiente de variação: 33,57%.

As folhas coletadas para análise apresentavam-se degradadas e com sintomas de deficiência nutricional causado pelos nematoides e fitotoxicidade causado pela aplicação de

fungicida Ópera devido a doença ferrugem asiática ter atacado o experimento. As folhas foram coletadas e mantidas congeladas até o momento de análise. Dinardo (2005), afirma que os prejuízos na parte aérea são consequências do sistema radicular debilitado, incapaz de absorver nutrientes necessários e água para o bom desenvolvimento das plantas, as quais reduzem de tamanho e apresentam-se cloróticas, raquíticas, murchas nas horas mais quentes do dia e menos produtivas.

A combinação de fatores de estresse causados por nematoides como o déficit hídrico e a deficiência de nutrientes enfraquecem a planta, diminuem seus mecanismos de defesa e a deixa mais suscetível ao ataque de doenças como ocorreu no presente trabalho como o míldio, septoriose, crestamento bacteriano e cercóspera. A presença de nematoides no desenvolvimento de plantas relaciona-se à alterações na absorção e translocação de água e nutrientes, espoliação de nutrientes durante alimentação, modificações e destruições dos tecidos das raízes e diminuição das mesmas causando um grande estresse à planta (Hussey e Williamson, 1998). A incerteza da relação entre a intensidade das doenças e o ataque dos nematoides dificulta entender qual estresse foi mais severo às plantas, mas certamente todos foram responsáveis pela degradação das plantas.

CONCLUSÕES

Os fungos *P. ostreatus* e *P. pulmonarius* mostraram-se eficientes no controle de *M. incognita* na cultura da soja nas concentrações de 2,5 e 10,0 mg 100 mL⁻¹ podendo ser mais uma alternativa de controle biológico. Na concentração de 10,0 mg 100 mL⁻¹ também controlaram a população de nematoides, porém apresentou maior dano oxidativo às membranas celulares na cepa U12-4. Recomenda-se assim a utilização na concentração de 2,5 mg 100 mL⁻¹ de biomassa micelial.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a empresa de biotecnologia MYCELIA pela doação de cepas comerciais do gênero *Pleurotus* e ao CNPq, CAPES e Fundação Araucária pelo apoio à pesquisa.

REFERÊNCIAS

- AL-HAZMI, A.S.; TARIQJAVEED, M. Effects of different inoculum densities of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride* against *Meloidogyne javanica* on tomato. **Saudi Journal of Biological Sciences**, Riyadh, v.23, n.2, p.288-292, 2016.
- APARECIDA, C.M. **Biocontrole de nematoides com fungos**. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Jaboticaba - SP, p.57, 2015.
- 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.
- ASADA, K.; NAKANO, Y. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-sepecific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant Cell Physiology**, v.22, p.867-880, 1999.
- AZEVEDO, L.R.; SALES-CAMPOS, C.; VAREJÃO, M.J.C. Avaliação da atividade biodegradadora de *Pleurotus ostreatus* no substrato de cultivo formulado a partir de resíduo madeireiro. In: XVIII JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA PIBIC CNPQ/FAPEAM/INPA 2009, Manaus. **Anais Manaus: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia**, p.644–647.
- BALAES, T.; TANASE, C. Basidiomycetes as potential biocontrol agents against nematodes. **Romanian Biotechnological Letters**, Bucharest, v.21, n.1, p.1185-1193, 2016.
- BARRON, G.L.; THORN, R.G. Destruction of nematode by species of *Pleurotus*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.65, n.4, p.774-778, 1987.
- BONETI, J.I.S.; FERRAZ, S. Modificação do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de raízes de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.6, p.553, 1981.
- BRIDA, A.L.; GABIA, A.A.; FILHO, J.C.P.; MORAES, D.A.C.; WILCKEN, S.R.S. Variabilidade espacial de *Meloidogyne javanica* em soja. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.42, n.2, p.175-179, 2016.
- BYRD, D.W.; KIRKPATRICK, T.; BARKER, Kenneth R. An improved technique for clearing and staining plant tissues for detection of nematodes. **Journal of nematology**, Lakeland, v.15, n.1, p.142-143, 1983.
- CASTRILLO, M.; FERNANDEZ, D.; CALCAGNO, A.M.; TRUJILLO, I.; GUENNI, L. Responses of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase, protein content, and stomatal conductance to water deficit in Maize, Tomato, and Bean. **Photosynthetica**, Praha, v.39, n.2, p.221-226, 2001.
- COLAUTO, N.B.; EIRA, A.F. Efeito de recipientes de contenção do substrato na distribuição da produção de *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Singer. **Energia na Agricultura**, Botucatu, v.10, n.2, 19-28, 1995.

COSTA, M.A. **Biocontrole de nematoides com fungos**. 2015. 44p. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2015.

COSTA, M.J.N.; CAMPOS, V.P.; PFENNING, L.H.; OLIVEIRA, D.F. Patogenicidade e reprodução de *Meloidogyne incognita* em tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) com aplicação de filtrados fúngicos ou extratos de plantas e de esterco animais. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v.24, n.2, p.219-226, 2000.

DIAS, W.P.; FREITAS, V.M.; RIBEIRO, N.R.; MOITA, A.W.; HOMECHIN, M.; PARPINELLI, N.M.B.; CARNEIRO, R.M.D.G. Reação de genótipos de soja a *Meloidogyne enterolobii* e *M. ethiopica*. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v.34, n.4, p.220-225, 2010.

DINARDO-MIRANDA, L.L. Manejo de nematoides em cana-de-açúcar. **Jornal Cana**, Ribeirão Preto, n.140, p.64-69, 2005.

DINARDO-MIRANDA, L.L. Nematoides e pragas de solo em cana-de-açúcar. **Informações Agrônomicas**, Piracicaba, n.110, p.25-32, 2005.

DONG, L.Q.; ZHANG, K.Q. Microbial control of plant-parasitic nematodes: A five-party interaction. **Plant and Soil**, Hague, v.288, n.1-2, p.31-45, 2006.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Sistemas de Produção**. 2017. Brasília. Disponível em: <https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br>. Acesso em: 25 jul. 2020.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Soja em números (safra 2018/19)**. 2019. Londrina. Disponível em: <https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1/dados-economicos>. Acesso em: 25 jul. 2020.

FERRAZ, L.C.C.B.; ASMUS, G.L.; CARNEIRO, R.G.; MAZAFFERA, P.; SILVA, J.F.V. **Relações parasito-hospedeiro nas meloidoginoses da soja**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Londrina, p.15-38, 2001.

FERRAZ, L.C.C.B.; BROWN, D.J.F. **Nematologia de Plantas: Fundamentos e Importância**. Sociedade Brasileira de Nematologia, Manaus: Editora Norma, 2016. 251p.

FERRAZ, S.; FREITAS, L.G.; LOPES, E.A.; DIAS-ARIEIRA, C.R. **Manejo sustentável de fitonematoides**, Viçosa: Editora UFV, 2010. 306p.

FERREIRA, D.F. Sisvar: A computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.35, n.6, p.1039-1042, 2011.

FIORINI, C.V.A.; GOMES, L.A.A.; LIBÂNIO, R.A.; MALUF, W.R.; CAMPOS, V.P.; LICURSI, V.; MORETTO, P.; SOUZA, L.A.; FIORINI, I.V.A. Identificação de famílias F2:3 de alface homozigotas resistentes aos nematoides das galhas. **Horticultura Brasileira**, Recife, v.25, n.4, p.509-513, 2007.

FREITAS, M.A. **Potenciais agentes de biocontrole para *Meloidogyne incognita* em cana-de-açúcar**. 2011. 74p. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2011.

FURLANI, R.P.Z.; GODOY, H.T. Valor nutricional de cogumelos comestíveis: uma revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v.64, n.2, p.149-154, 2005.

GALBIERI, R.; ASMUS, G.L. Principais espécies de nematoides do algodoeiro no Brasil. In: GALBIERI, R.; BELOT, J.L. **Nematoides fitoparasitas do algodoeiro nos cerrados brasileiros: Biologia e medidas de controle**. Cuiabá: Instituto Mato-Grossense do Algodão, 2016. p.11-36.

HEYDARI, R.; POURJAM, E.; GOLTAPPEH, E.M. Antagonistic effect of some species of *Pleurotus* on the root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* *in vitro*. **Plant Pathology Journal**, Faisalabad, v.5, n.2, p.173-177, 2006.

HODGES, D.M.; DELONG, J.M.; FORNEY, C.F.; PRANGE, R.K. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. **Planta**, Canadá, v.207, n.4, p.604-611, 1999.

HUSSEY, R.S.; WILLIAMSON, V.M. Physiological and molecular aspects of nematode Parasitism. In: BARKER, K.R.; PEDERSON, G.A.; WINDHAM, G.L.; BARTELS, J.M. (Ed.). **Plant and Nematode Interactions**. Madison. 1998. p.87-108.

INSTITUTO AGRONÔMICO DO PARANÁ. **Monitoramento Mensal de Chuva**. 2019. Disponível em: <http://www.iapar.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=637>. Acesso em: 25 jul. 2020.

JANSSON, H.B.; TUNLIB, A.; NORDBRING-HERTZ, B. Biological control: Nematodes. **Fungal Biotechnology**. Weinheim: Editora Chapman & Hall, 1997. p.38-50.

KERRY, B.R. An Assessment of Progress toward Microbial Control of Plant-Parasitic Nematodes. **Journal of nematology**, Lakeland, v.22, n.45, p.621-31, 1990.

KHAN, T.A.; SAXENA, S.K. Integrated management of root knot nematode *Meloidogyne javanica* infecting tomato using organic materials and *Paecilomyces lilacinus*. **Bioresource Technology**, London, v.61, n.3, p.247-250, 1997.

LUCON, C.M M.; CHAVES, A.L.R.; BACILIERI, S. **Trichoderma: o que é, para que serve e como usar corretamente na lavoura**. São Paulo: Instituto Biológico, 2014. Disponível em: <http://www.biologico.sp.gov.br/uploads/files/pdf/cartilhas/trichoderma.pdf>.

MACCHERONI, W.; ARAÚJO, W.L.; LIMA, A.O.S. Ecologia: habitat e interações fungicas com plantas, animais, fungos e bactérias. **Fungos: uma introdução a biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: EDUCS, p.451-490, 2004.

MANTOVANI, T.R.D'A.; TANAKA, H.S.; UMEO, S.H.; ZAGHI JR, L.L.; VALLE, J.S.; PACCOLA-MEIRELLES, L.D.; LINDE, G.A.; COLUTO, N.B. Cryopreservation at -20 and -70 °C of *Pleurotus ostreatus* on grains. **Indian Journal of Microbiology**, v.52, n.3, p.484-488, 2012.

MARINO, R.H.; SILVA, D.G.C. Controle do nematoide das galhas por *Pleurotus ostreatus* em alface. **Scientia Plena**, São Cristóvão, v.9, n.10, p.100-202, 2013.

NOCTOR, G.; FOYER, C.H. Ascorbate and Glutathione: Keeping active oxygen under control. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v.49, n.1, p.249-279, 1998.

OKORIE, C.C.; ONONUJU, C.C.; OKWUJIAKO, I.A. Management of *Meloidogyne incognita* with *Pleurotus ostreatus* and *P. tuberregium* in Soybean. **International Journal of Agriculture & Biology**, Faisalabad, v.13, n.3, p.401-405, 2011.

PALIZI, P.; GOLTAPPEH, E.M.; POURJAM, E. Nematicidal activity of culture filtrate of seven *Pleurotus* species on *Pratylenchus vulnus*. In: 17TH IRANIAN PLANT PROTECTION CONGRESS, 2006, Karadj. **Anais**: Karadj, p.457.

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**, Poznań, v.49, n.1, p.27-33, 2008.

PALIZI, P.; GOLTAPPEH, E. M.; POURJAM, E.; SAFAIE, N. The relationship of oyster mushrooms fatty acid profile and their nematicidal activity. In: 5TH NATIONAL BIOTECHNOLOGY CONGRESS OF IRAN, 2007, Theran. **Anais**: Theran p.762.

PINHEIRO, J.B. **Cenoura: Nematoides**. Brasília: Embrapa. 2019. Disponível em: <https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cenoura/arvore/CONT000gnhpbhfhf02wx5ok0edacxlrlslvdgr.html>. Acesso em: 25 jul. 2020.

POPOV, D. **Você sabe qual é a região que mais produz soja no Paraná?** Canal Rural, 2019. Disponível em: <https://www.canalrural.com.br/sites-e-especiais/projeto-soja-brasil/voce-sabe-qual-e-a-regiao-que-mais-produz-soja-no-parana/>. Acesso em: 25 jul. 2020.

PUTZKE, M.T.L.; MATSUMURA, A.T.S.; CAVALCANTI, M.A.Q.; CARGNELUTTI FILHO, A. Taxonomia e importância das espécies de *Hohenbuehelia*, *Resupinatus* e *Pleurotus* no controle de *Meloidogyne javanica*. **Caderno de Pesquisa**, Santa Cruz do Sul, v.19, n.3, p.38-81, 2007.

ROYSE, D.J.; SÁNCHEZ, J.E. Producción mundial de setas *Pleurotus* spp. con énfasis en países iberoamericanos. In: **La biología, el cultivo y las propiedades nutricionales y medicinales de las setas *Pleurotus* spp.** Editora Chiapas: El Colegio de la Frontera Sur, 2017. p.17-25.

SAMARAS, Y.; BRESSAN, R.A.; CSONKA, L.N.; GARCÍA-RÍOS, M.G.; D'URZO, M. Paino.; RHODES, D. Proline accumulation during water deficit. **Environment and plant metabolism: Flexibility and acclimation**. Oxford: Bios Scientific Publishers, 1995.

SATOU, T.; KANEKO, K.; LI, W.; KOIKE, K. The toxin produced by *Pleurotus ostreatus* reduces the head size of nematodes. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v.31, n.4, p.574-576, 2008.

SOARES, P.L.M. **Estudo do controle biológico de fitonematoides com fungos nematófagos**. 2006. 252p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

SOARES, P.L.M.; SANTOS, J.M.D. Utilização de fungos nematófagos no controle biológico de fitonematóides. In: BORTOLI, S.A.; BOIÇA JÚNIOR, A.L.; OLIVEIRA, J.E.M. **Agentes de controle biológico: metodologia de criação, multiplicação e uso**. Jaboticabal: Editora Funep, 2006. p.252.

SOUSA, C.C.M.; PEDROSA, E.M.R.; ROLIM, M.M.; OLIVEIRA FILHO, R.A.; SOUZA, M.A.L.M.; PEREIRA FILHO, J.V. Growth and enzymatic responses of cowpea under water stress and root-knot nematode. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v.19, n.2, p.113-118, 2015.

STIRLING, G.R. **Biological control of plant parasitic nematodes**. Wallingford: CABI Publishing, 1991.

THORN, R.G.; BARRON, G.L. Carnivorous mushrooms. **Science**, New York, v.224, n.4644, p.76-78, 1984.

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**, Tokyo, v.48, n.4, p.222-230, 2007.

ZAGHI Jr, L.L.; BERTÉLI, M.B.D.; FREITAS, J.D.S.; OLIVEIRA FILHO, O.B.Q.; LOPES, A.D.; RUIZ, S.P.; VALLE, J.S.; LINDE, G.A.; COLAUTO, N.B. Five-year cryopreservation at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ of edible and medicinal basidiomycetes by wheat grain technique. **Journal of Microbiological Methods**, v.176, 106030, 2020.

ZHANG, F.; YUAN, J.; YANG, X.; CUI, Y.; CHEN, L.; RAN, W.; SHEN, Q. Putative *Trichoderma harzianum* mutant promotes cucumber growth by enhanced production of indole acetic acid and plant colonization. **Plant and Soil**, Hague, v.368, p.433-444, 2013.

ZHANG, J.; HUANG, W.; PAN, Q.; LIU, Y. Improvement of chilling tolerance and accumulation of heat shock proteins in grape berries (*Vitis vinifera* cv. Jingxiu) by heat pretreatment. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.38, p.80-90, 2005.