

**ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE FUNGOS NOCIVOS  
A NEMATÓIDES; SUA UTILIZAÇÃO NO  
CONTROLE BIOLÓGICO.**

**VÂNIA SILVIA BARDAUIL ALCANTARA**  
Instituto Agrônomo - Campinas

**Orientador: DR. JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO**

Dissertação apresentada à Escola Superior de  
Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade  
de São Paulo, para obtenção do título de Mestre  
em Genética e Melhoramento de Plantas.

**PIRACICABA**  
Estado de São Paulo - Brasil  
Agosto - 1979

Ao Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo, mestre inigualável em Genética de Microrganismos, exemplo de humildade, sabedoria, paciência e dedicação, só próprio dos nobres de espírito.

e

Ao Prof. Luiz Gonzaga E. Lordello, grande especialista em Nematologia e excelente mestre, laborioso e humilde,

Dedico.

Ao Meu irmão e cunhada, Paulo e Valquíria,

A Josefa e

A Minha mãe, cujas ações e pensamentos são sempre modelo de dignidade,

Ofereço.

## AGRADECIMENTOS

Fica aqui manifestado o meu mais sincero agradecimento a todos, que de uma forma ou de outra, colaboraram para que meu objetivo fosse alcançado. Meu reconhecimento a:

Deus por tudo que sou e por tudo que tenho e, ainda pelas pessoas abaixo citadas, imprescindíveis a execução deste trabalho.

Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo, pela amizade, paciência, bondade, entusiasmo e sábia orientação na realização desta obra.

Prof. Dr. Luiz Gonzaga E. Lordello, pelo estímulo e orientação no desenvolvimento deste trabalho.

Dr. Charles W. Laughlin, da Universidade de Michigan (EUA), pela colaboração na última parte do trabalho prático.

Prof. Dr. Humberto de Campos pela análise estatística.

Prof. Dr. Roland Venkovsky e Eng<sup>o</sup> Agr<sup>o</sup> Isaías Olivio Geraldi pela sugestões na parte estatística.

Pesq. Cient. Cybele Pacheco Vaz Pimental da Seção de Micologia Fitopatológica do Instituto Biológico pela confirmação do gênero de alguns fungos.

Eng<sup>o</sup> Agr<sup>o</sup> Rubens Rodolfo Albuquerque Lordello, pelo material concedido e pelas sugestões apresentadas.

Eng<sup>o</sup> Agr<sup>o</sup> Cláudio Luiz Messias, pelas fotografias tiradas com muito zelo.

Eng<sup>o</sup> Agr<sup>o</sup> Albertus Bernardus Eskes, pelo auxílio na elaboração do "summary".

Prof<sup>a</sup> Maria Lúcia A. C. Paranhos pela correção do português.

Srt<sup>a</sup> Helca de Abreu pela amizade e colaboração.

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida.

Professores do Instituto de Genética pela nossa formação científica.

Funcionários: Sergio Antonio Françoso, Rodolfo Fulini, Antonio J. Rocha Campos e Luiz Próspero, pelo auxílio técnico.

Colegas do curso de pós-graduação pela amizade e  
companheirismo.

Minha mãe, em especial, pelo amor, dedicação e in-  
centivo inesgotáveis durante todas as fases de mi-  
nha vida.

## ÍNDICE

	<u>página</u>
1 - RESUMO .....	1
2 - INTRODUÇÃO .....	3
3 - REVISÃO DE LITERATURA .....	5
3.1 - Fungos utilizados no controle biológico .....	5
3.2 - Experimentos de laboratório .....	8
3.3 - Experimentos em vasos .....	11
4 - MATERIAL E MÉTODOS .....	15
4.1 - Nematóides utilizados .....	15
4.2 - Meios de cultura e soluções utilizadas .....	15
4.2.1 - Meio completo (PONTECORVO e col. 1953) .....	15
4.2.2 - Batata Dextrose Ágar .....	16
4.2.3 - Corn meal ágar .....	16
4.2.4 - Solução salina .....	16
4.2.5 - Solução de tween 80 .....	17
4.2.6 - Solução de vitaminas .....	17
4.2.7 - Solução de caseína hidrolisada .....	17
4.2.8 - Hidrolisado de ácido nucleico de leveduras .....	18
4.2.9 - Sublimado corrosivo (HgCl <sub>2</sub> ) .....	18
4.3 - Obtenção de nematóides para isolamento dos fungos .....	18
4.4 - Isolamento dos fungos encontrados na parte externa do corpo dos nematóides .....	20
4.5 - Isolamento dos fungos encontrados na parte interna do corpo dos nematóides .....	20
4.6 - Classificação a nível de gênero dos fungos obtidos .....	21

	<u>página</u>
4.7 - Isolamento dos fungos de região externa e interna de raízes de feijão alado .....	22
4.8 - Extração de larvas do nematóide <i>Rotylenchulus reniformis</i> de uma amostra de solo com cultura do algodoeiro .....	22
4.9 - Observação ao microscópio dos órgãos de captura formados pelos fungos .....	23
4.10 - Teste de produção de toxinas pelos isolados .....	24
4.11 - Experimento em casa de vegetação .....	25
5 - RESULTADOS .....	27
5.1 - Isolamento de fungos a partir de nematóides .....	27
5.2 - Classificação a nível de gênero de alguns fungos obtidos .....	28
5.3 - Isolamento de fungos da região externa e interna da raiz de feijão alado .....	29
5.4 - Observação ao microscópio das estruturas de captura .....	29
5.5 - Teste de produção de toxinas .....	38
5.6 - Experimento em casa de vegetação .....	38
6 - DISCUSSÃO .....	43
6.1 - Classificação a nível de gênero dos isolados obtidos ....	43
6.2 - Isolamento de fungos da região externa e interna da raiz de feijão alado .....	44
6.3 - Formação de estruturas de captura .....	44
6.4 - Testes para produção de toxinas .....	45
6.5 - Ensaio em casa de vegetação .....	47
7 - CONCLUSÕES .....	49
8 - SUMMARY .....	51
9 - LITERATURA CITADA .....	53

## LISTA DE TABELAS

página

Tabela 1	- Fungos isolados de fêmeas de nematóides do gênero <i>Meloidogyne</i> .....	27
Tabela 2	- Classificação a nível de gênero de 12 dos isolados obtidos .....	28
Tabela 3	- Comparação entre os fungos isolados a partir de nematóides do gênero <i>Meloidogyne</i> e aqueles obtidos de raízes de feijão alado.	30
Tabela 4	- Estruturas de captura formadas pelo isolado nº 8 após 24 horas da adição do nematóide <i>Rotylenchulus reniformis</i> . Adição efetuada decorridas 48 horas de cultivo do fungo a 28°C .....	31
Tabela 5	- Estruturas de captura formadas pelo isolado nº 8 após 48 horas da adição do nematóide <i>Rotylenchulus reniformis</i> . Adição efetuada decorridas 48 horas de cultivo do fungo a 28°C .....	32
Tabela 6	- Estruturas de captura formadas pelo isolado nº 9 após 24 horas da adição do nematóide <i>Rotylenchulus reniformis</i> . Adição efetuada decorridas 48 horas de cultivo do fungo a 28°C .....	34
Tabela 7	- Estruturas de captura formadas pelo isolado nº 9 após 48 horas da adição do nematóide <i>Rotylenchulus reniformis</i> . Adição efetuada decorridas 48 horas de cultivo do fungo a 28°C .....	35
Tabela 8	- Efeito de filtrados de cultura de 22 isolados sobre larvas do nematóide <i>Rotylenchulus reniformis</i> .....	39

Tabela 9 - Efeito de filtrados de cultura dos isolados produtores de toxinas sobre larvas do nematóide <i>Rotylenchulus reniformis</i> ..	40
Tabela 10 - Notas concedidas aos sistemas radiculares de tomateiros, avaliados quanto à presença de galhas, segundo o quadro 4.11. Cinco fungos promissores foram ensaiados, visando redução do ataque de nematóides <i>Meloidogyne incognita</i> .....	41

## LISTA DE FIGURAS

página

- Figura 1a - Isolado nº 8. Anéis hifais observados após 24 horas de adição de larvas do nematóide *Rotylenchulus reniformis* ... 33
- Figura 1b - Isolado nº 8. Anéis hifais observados após 48 horas de adição de larvas do nematóide *Rotylenchulus reniformis* ... 33
- Figura 2 - Isolado nº 9. Anéis hifais observados após 24 horas de adição de larvas do nematóide *Rotylenchulus reniformis* ... 36
- Figura 3 - Isolado nº 9. "Knobs" adesivos formados em presença de larvas do nematóide *Rotylenchulus reniformis* ..... 37

## "CURRICULUM VITAE"

VÂNIA SILVIA BARDAUIL ALCANTARA, de nacionalidade brasileira, nasceu aos 07 de outubro de 1953, em Corumbá, Mato Grosso, sob a filiação de Paulo Alcantara Pereira e Olga Bardauil Alcantara. Cursou a Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", onde obteve aos 18 de dezembro de 1975 o grau de Engenheira Agrônoma.

Aos oito de janeiro de 1978 iniciou atividades de pesquisas no Instituto Agronômico de Campinas, onde trabalha junto à Seção de Microbiologia Fitotécnica.

## 1 - RESUMO

No presente trabalho empregaram-se fungos isolados dos nematóides *Meloidogyne incognita* e *M. javanica*, em testes de laboratório com o objetivo de pesquisar a ocorrência de estruturas especializadas de captura de nematóides e a produção de toxinas por esses fungos. Esses nematóides foram obtidos de raízes de tomateiro (*Lycopersicon esculentum*), cafeeiro (*Coffea arabica*) e feijão alado (*Psophocarpus tetragonolobus*).

Isolaram-se 24 fungos, dos quais 12 puderam ser classificados, havendo representantes dos gêneros *Fusarium*, *Helminthosporium*, *Penicillium*, *Pestalotia* e *Aspergillus*, com predominância do último.

Para observações sobre a ocorrência de estruturas de captura, utilizaram-se apenas os fungos isolados de *M. javanica*, a partir de raízes de tomateiro infestadas. Verificou-se que dois isolados, sendo um do gênero *Pestalotia* e outro de gênero não identificado, foram estimulados a produzir tais estruturas em presença de larvas de *Rotylenchulus reniformis*. Observou-se, também, que na ausência do nematóide essas estru

turas ocorreram, porém em número mais reduzido.

Para os ensaios de produção de toxinas pelos fungos, utilizaram-se filtrados de todos os isolados, excetuando-se os dois formadores de estruturas de captura. *Aspergillus niger*, *Helminthosporium* sp. e *Fusarium* sp. mostraram ação tóxica para as larvas de *R. reniformis* após 12 horas de contato com as mesmas.

Em experimento em casa de vegetação para controle de *M. incognita* infestando tomateiro, utilizaram-se soluções contendo esporos das culturas mais promissoras, não tendo sido encontrada diferença significativa entre os tratamentos.

## 2. INTRODUÇÃO

Os nematóides parasitos de plantas são responsáveis por grandes danos na produção agrícola. Muitas são as medidas de controle adotadas, porém, a utilização de inimigos naturais, embora apenas em caráter experimental em alguns países, constitui um campo fascinante.

Se forem adotados métodos econômicos e efetivos de cultivo de fungos, o emprego do controle biológico torna-se mais racional que o uso de substâncias químicas, pois ele apresenta a grande vantagem de não deixar resíduos tóxicos ao homem.

Considerando-se os microrganismos, em especial os fungos saprófitas do solo, verifica-se, que estes são capazes de se tornar predadores, quando ocorre um acúmulo de insetos nocivos ou nematóides no solo. Tais fungos desenvolvem mecanismos especiais, através dos quais, capturam os nematóides presentes no solo.

Nas tentativas realizadas para controlar nematóides

parasitos de plantas, corretivos orgânicos têm sido adicionados ao solo, a fim de que se criem condições favoráveis para os fungos já presentes; fungos captadores de nematóides têm sido adicionados ao solo; ou, ambas as práticas têm sido realizadas conjuntamente.

Essas tentativas possivelmente terão sucesso, porém, qualquer agente utilizado para controle biológico, provavelmente, não surtirá efeito tão rapidamente quando o controle químico. Por esta razão, tal prática não é de pronta aceitação.

O objetivo do presente trabalho foi isolar os fungos encontrados em nematóides, do gênero *Meloidogyne* de raízes de tomateiro (*Lycopersicon esculentum*), cafeeiro (*Coffea arabica*) e feijão alado (*Psophocarpus tetragonolobus*) e, a partir dos isolados: 1) verificar a formação de estruturas especializadas para captura; 2) verificar a produção de toxinas pelos mesmos e, 3) ensaiar os isolados considerados mais promissores para uma possível utilização no controle biológico de nematóides em casa de vegetação.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 - Fungos utilizados no controle biológico

É sabido, que os fungos predadores desenvolvem mecanismos especiais, que são verdadeiras armadilhas para capturar os nematóides do solo. Tais fungos não são de descoberta recente, sendo que, o primeiro a ser descrito foi *Arthrobotrys oligospora*, por FRESSENIUS (1852, *apud* PRAMER, 1964). Porém, foi WORONIN (1870, *apud* PRAMER, 1964) quem primeiro verificou a formação de armadilhas por esse organismo; e, somente em 1888 que ZOPF (*apud* PRAMER, 1964) observou a captura de nematóides vivos por esse fungo.

Outros pesquisadores observaram o mesmo fenômeno. Entretanto, somente após o trabalho de DRECHSLER (1937), o processo se tornou melhor conhecido. Este autor, além de estudar com mais detalhes o fenômeno, descreveu 11 novas espécies de fungos capazes de atacar nematóides. Uma completa revisão do assunto foi realizada em 1957 por DUDDINGTON que compilou todas as informações fornecidas pelos primeiros pesquisadores.

Em outra revisão, PRAMER (1964) cita que são conhecidas mais de 50 espécies de fungos predadores de nematóides.

Entre os fungos que agem no controle biológico, encontrou-se que o *Aspergillus niger* possui algumas propriedades nematicidas (MANKAU, 1969).

Entre os fungos, existem dois tipos de atividade predadora : os captadores de nematóides e os parasitas endozóicos.

Os fungos captadores de nematóides produzem em seu micélio, órgãos adesivos, os quais prendem os nematóides que ficam em contato com os mesmos. Os nematóides, que porventura escaparem, levam preso ao corpo, o órgão adesivo; em qualquer um dos dois casos, eles estão condenados, uma vez que desse órgão se desenvolvem hifas de assimilação (LORDELLO, 1976).

Segundo DUDDINGTON (1957), algumas espécies de fungos produzem anéis constritores, que parecem ser os mais especializados órgãos de captura. Quando um nematóide passa pelo anel, as três células que o compõem se contraem, prendendo-o. Esta contração parece ser uma resposta tigmotrópica. Segundo o mesmo autor, existem ainda anéis não constritores, que prendem passivamente os nematóides que, acidentalmente, tentam atravessá-los.

Os parasitas endozóicos atacam suas vítimas através da produção de esporos viscosos, que estando em contato com a cutícula do nematóide, aderem a ela e produzem tubos que a perfuram, penetrando no organismo e lá formando órgãos globosos. Destes órgãos globosos, se desenvolvem as hifas de assimilação, as quais se ramificam, tomando conta do corpo do animal. Em outros parasitas endozóicos, os esporos são ingeridos pelo nematóide e formam-se aí, também, as hifas de assimilação (LORDELLO, 1976).

A vida dos fungos predadores parece estar balancea

da entre duas fases de atividade : saprofítica e predatória. Na saprofítica, o fungo permanece em equilíbrio com o meio ambiente, vivendo como qualquer outro, sobre a matéria orgânica contida no material, sobre o qual ele está crescendo; e, assim, os nematóides não são necessários. Uma mudança nas condições ambientais, pode alterar o equilíbrio, de modo que a fase predatória torna-se dominante. São formadas, então, as armadilhas e o fungo vive como um predador (DUDDINGTON, 1957).

Alguns fungos predadores pertencem à classe dos Ficomycetos ; e, muitos, à ordem Moniliales dos Fungos Imperfeitos (DUDDINGTON, 1962). Os gêneros mais comumente representados são : *Arthrobotrys*, *Dactylaria*, *Dactylella* e *Trichothecium*.

Com a finalidade de determinar se alguns nematicidas químicos são prejudiciais aos fungos predadores, MANKAU (1968) realizou testes de laboratório e em vasos, os quais mostraram que enquanto uns produtos são fungitóxicos ou fungistáticos, outros de nada afetam os fungos benéficos.

Finalmente, com relação aos meios de cultura para o cultivo de fungos predadores, DUDDINGTON (1957) afirma, que estes apresentam bom crescimento em "corn meal agar"; enquanto que BLACKBURN e HAYES (1963), o conseguem utilizando um meio composto por maltose,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $KH_2PO_4$ ,  $KCl$ ,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  e  $NaNO_3$ .

### 3.2 - Experimentos de laboratório

Experimentos de laboratório revelaram que, em cultura pura de fungo predador, não se formam armadilhas (PRAMER, 1959); ou, apenas, poucas são produzidas (SCHENCK e PRAMER, 1975). Quando nematóides estão presentes, alguma substância produzida por eles é responsável pela diferenciação do micélio do fungo em armadilhas.

Uma evidência deste fato foi obtida por LAWTON (1957), demonstrando, que água, onde nematóides estiveram em suspensão, induziu a formação de armadilhas.

PRAMER (1959) verificou que, quando uma suspensão de nematóides vivos da espécie *Neoplectana glaseri* era adicionada a cultura de *Arthrobotrys conoides*, o micélio se diferenciava, produzindo órgãos adesivos ou, alças bifais, nas quais numerosos animais eram capturados e destruídos. Em placas de Petri, que não receberam nematóides, não se observou a formação dessas estruturas. Ficou assim provado, que um produto metabólico do nematóide é responsável pela formação de armadilhas pelo fungo. Para esse produto foi proposto o nome de "nemina".

Ainda no mesmo trabalho, diluições do filtrado do nematóide foram ensaiadas com o mesmo fungo. Pelos resultados obtidos, concluiu-se que : ou existia uma concentração ótima de nemina para induzir a formação de armadilhas, ou que os filtrados continham um inibidor da nemina, o qual foi re-

movido pela diluição.

MONOSON e col. (1974) verificaram, que nemina extraída de *Aphelenchus avenae*, *Neotylenchus linfordi*, *Cephalobus* sp., *Caenorhabditis elegans* e *C. briggsae*, induzia a formação de armadilhas pelo fungo *Monacrosporium doedycoides*. Quando porém, 6-metil purina, um inibidor da síntese de RNA, era aplicado, juntamente com as neminas, essas armadilhas não se formavam. Se, entretanto, a aplicação de 6-metil purina era feita uma hora após a adição das neminas, não ocorria a inibição.

Esses autores observaram ainda, que dois compostos inibidores da síntese de proteínas (5 fluorouracila e p-fluorofenilalanina) inibiam, também, a formação de armadilhas.

Por esses resultados, concluíram, que o mecanismo de formação de armadilhas induzidas pela nemina parece estar ao nível da transcrição.

Com relação à presença de alguma substância ou sistema de atração, que dirigisse os nematóides às armadilhas, MONOSON e RANIERI (1972) mostraram, que uma substância que atraía nematóides, denominada NAS (nematode attraction substance), era produzida pelo fungo *Arthrobotrys musiformis*, após a formação das armadilhas.

MONOSON e col. (1973), utilizando o mesmo fungo relatado acima, e, ainda, *Monacrosporium doedycoides*, determinaram, que a NAS tem seu efeito dependente da concentração usada; é inativada por tratamento com ácido

da do extrato do fungo por cromatografia; e, não é um regula-  
dor comum de crescimento. Todas estas informações sugerem,  
que a NAS possa ser um pequeno polipeptídeo.

Testes de laboratório têm sido empregados para se  
detectar, em alguns fungos, propriedades nematocidas. Assim,  
MANKAU (1969) utilizando filtrados de cultura de *Aspergillus*  
*niger* em meio Czapek líquido, verificou que ocorria 100% de  
mortalidade dos nematóides *Aphelenchus avenae*, em 4 horas. U  
ma solução a 10% e outra a 25% causou, respectivamente, 83% e  
97% de mortalidade em 12 horas, o que indica que a toxicida-  
de de soluções diluídas aumenta com o tempo.

O mesmo experimento foi repetido para *Fusarium sp.*  
isolado de solo, onde se constatou a ineficiência deste, em  
todas as concentrações empregadas.

Em 1972, DESAI e col. utilizaram filtrado de cultu-  
ra de 15 dias de *Aspergillus niger* contra larvas, do segundo  
estágio, do nematóide *Meloidogyne incognita*, por 12 horas. En-  
controu-se uma mortalidade de 97% das larvas, o que indicava,  
provavelmente, a presença de substâncias tóxicas, nos meta-  
bólitos liberados pelo fungo. Análise do fluido da cultura  
mostrou 8,7% de ácido oxálico, como um dos principais metabó-  
litos. Desde que o ácido oxálico "in vitro" a 0,1% mata as  
larvas, é provável que o metabólito tóxico na cultura seja o  
ácido oxálico.

Estudos feitos por ALAM e col. (1973) para verifi-  
car o efeito dos filtrados de cultura de *Helminthosporium no*

*dulosum*, *Trichoderma lignorum*, *Curvularia tuberculata*, *Penicillium corylophilum* e *Aspergillus niger* obtidos de rizosfera de quiabo sobre a mortalidade dos nematóides, *Hoplolaimus indicus*, *Tylenchorhynchus brassicae*, *Meloidogyne incognita* e sobre a eclosão larval desse último, demonstraram que todos os filtrados foram efetivos, em graus variados. Nematóides mortos ou inertes foram contados após 12, 24 e 48 horas de exposição aos filtrados e a eclosão larval, após 5 dias. Todos os filtrados de cultura foram mais tóxicos a *T. brassicae*, se comparados com os outros dois nematóides, mostrando, que existe certa seletividade.

Extratos dos fungos *Nematoctonus haptocladus*, *N. robustus*, *Monacrosporium ellipsosporium*, *M. doedycoides*, *Arthrobotrys arthrobotryoides*, *A. oligospora*, *Dactylella lysipaga* e *Harposporium anguillulae* foram ensaiados contra *Panagrellus redivivus*, encontrando-se, que *N. robustus* foi o único ativo (KENNEDY e TAMPION, 1978).

### 3.3 - Experimentos em vasos

LINFORD e YAP (1939), em experimentos com abacaxi, utilizando os fungos *Arthrobotrys oligospora*, *A. musiformis*, *Dactylaria candida*, *D. thaumasia* e *Dactylella ellipsospora*, em solo esterilizado inoculado com um nematóide então referido como *Heterodera marioni*, observaram que apenas *Dactylella ellipsospora* restringiu a injúria causada pelo nematóide para um grau moderado, mas satisfatório. Concluíram, ainda,

que os fungos predadores devem ser avaliados não apenas sob condições ambientais variáveis, mas também, devem ser ensaiados em associações com diferentes plantas hospedeiras, visto que a suscetibilidade à injúria, causada por nematóides, não obstante a proteção de fungos captadores, varia muito de planta para planta. Ficou ainda evidente, que fungos predadores, que capturam e destroem nematóides rapidamente em ágar, diferem em sua habilidade de restringir injúria causada por esses parasitos, em plantas suscetíveis. Dessa maneira, testes em solo parecem ser necessários para avaliar a eficiência de tais fungos.

Experimentos realizados para verificar o controle de um nematóide do gênero *Meloidogyne*, por fungos predadores, foram feitos por SOPRUNOV (1947), para tomate e pepino. Verificou-se que, nos vasos que continham fungos predadores, o número de galhas era consideravelmente menor. Os experimentos desse autor mostraram, que quanto maior a densidade populacional de larvas de nematóides no solo, mais efetivos são os fungos predadores. Verificou ele, ainda, que a atividade predatória é influenciada pelo teor de umidade do solo e, sob condições favoráveis, o fungo permanece ativo por um mês.

Em 1953, experimentos realizados por SVESHNIKOVA e KONDAKOVA (*apud* GORLENKO, 1956), mostraram a possibilidade de reduzir a infestação do nematóide causador de galhas nas plantas, pelo uso de fungos predadores e, que adição de maior quantidade destes aumenta sua efetividade.

DUDDINGTON e col. (1956), desejando verificar a influência do fungo *Dactylaria thaumasia* e do teor de matéria orgânica sobre o nematóide da beterraba, *Heterodera schachtii*, em solo fortemente infestado, observaram, através de ensaios em vasos, que enquanto o fungo não teve efeito significativo na população final de cistos, a matéria orgânica causou uma diminuição significativa deles. Não se sabe se a matéria orgânica aumentou a atividade de fungos predadores ou se elevou a população de microrganismos no solo, causando uma maior competição por oxigênio; o que poderia reduzir a eclosão larval e a atividade das larvas do nematóide.

MANKAU (1961), utilizando *Arthrobotrys conoides*, *A. dactyloides*, *A. arthrobotryoides*, *Dactylaria thaumasia*, *D. brochopaga* e *D. ellipsozona* para proteger o tomate e quiabo do ataque do nematóide *Meloidogyne incognita*, não obteve sucesso; porém, os fungos tiveram variado efeito sobre a infestação, e sua atividade foi influenciada pelo tipo de solo e conteúdo de matéria orgânica.

DESAI e col. (1972) realizaram testes em vasos, utilizando tomate da variedade Marglobe, em solo não infestado, infestado naturalmente e solo artificialmente infestado com nematóides *Meloidogyne incognita*, empregando filtrado de cultura de *Aspergillus niger*, suspensão de micélio e mistura de ambos. Os resultados obtidos mostraram, que a redução máxima do ataque foi observada, usando-se a mistura de filtrado do fungo com micélio. A ocorrência de danos foi menor com o filtrado em solo artificialmente infestado e

com mistura de filtrado de micélio, em solo naturalmente infestado. Verificou-se, que filtrado de cultura foi mais efetivo, no controle do parasito, em todas as inoculações do solo.

#### 4. MATERIAL E MÉTODOS

##### 4.1 - *Nematóides utilizados*

Para o isolamento dos fungos:

*Meloidogyne javanica* de raízes de tomateiro, feijão alado e tubérculos de batata.

*Meloidogyne incognita* de raízes de cafeeiro e tubérculos de batata.

Para os ensaios de laboratório:

*Rotylenchulus reniformis* de solo com cultura do algodoeiro.

Para o ensaio em casa de vegetação:

*Meloidogyne incognita* de raízes de tomateiro.

##### 4.2 - *Meios de cultura e soluções utilizadas*

###### 4.2.1 - Meio Completo (PONTECORVO e col. 1953) (MC).

$\text{NaNO}_3$	6,0 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1,5 g
KCl	0,5 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5 g
$\text{Fe SO}_4$	traços
$\text{Zn SO}_4$	traços
Glicose	10,0 g

Peptona	2,0 g
Caseína hidrolisada	1,5 g
Extrato de leveduras	0,5 g
Solução de vitaminas	1,00 ml
Ácido nucleico de leveduras	2,50 ml
Água destilada	1000 ml

Quando sólido, foi adicionado 15,0 g de ágar.

O pH foi ajustado para 6,8 com NaOH, procedendo-se, então, a autoclavagem.

#### 4.2.2 - Batata Dextrose Ágar - DIFCO (BDA)

Infusão de batatas	200 g
Bacto dextrose	20 g
Bacto ágar	15 g

Foram dissolvidas 39 g da mistura em 1000 ml de água destilada, efetuando-se, a seguir, a autoclavagem.

#### 4.2.3 - Corn meal Ágar - DIFCO

"Corn meal"	20 g
Ágar	15 g

Foram adicionadas 17 g em 1000 ml de água destilada, autoclavando-se em seguida.

#### 4.2.4 - Solução salina

Preparou-se uma solução de cloreto de sódio 0,9%,

dissolvendo-se o sal em água destilada. A solução foi colocada em frascos (9 ml por frasco), em seguida, autoclavada.

#### 4.2.5 - Solução de tween 80

Adicionou-se tween 80 em água destilada, a uma concentração de 0,1% (v/v). Em seguida, distribuiu-se 2,5 ml da solução em tubos de ensaio que foram autoclavados.

#### 4.2.6 - Solução de vitaminas

Ácido nicotínico	100 mg
Ácido p-aminobenzóico	10 mg
Aneurina	50 mg
Biotina	0,2 g
Piridoxina	50 mg
Riboflavina	100 mg
Água destilada	100 ml

A solução foi esterilizada em banho-maria, por 15 minutos e guardada em frasco escuro no refrigerador.

#### 4.2.7 - Solução de caseína hidrolisada

Em um frasco contendo 10 ml de água destilada, a adicionaram-se 100 mg de caseína hidrolisada, pro cedendo-se, então, a esterilização em banho-ma-

ria por 15 minutos. A solução foi, a seguir, conservada em frasco escuro em refrigerador.

#### 4.2.8 - Hidrolisado de ácido nucleico de leveduras

Ácido nucleico de leveduras (Oxoid) 2 gramas em 15 ml de solução normal de ácido clorídrico.

Ácido nucleico de leveduras (Oxoid) 2 gramas em 15 ml de solução de hidróxido de sódio.

As soluções foram aquecidas por 20 minutos, a 100°C e em seguida, misturadas. O pH foi ajustado para 6,0, filtrando-se em seguida. Completou-se o volume para 40 ml e guardou-se a prepara-ção em refrigerador sob clorofórmio.

#### 4.2.9 - Sublimado corrosivo (HgCl<sub>2</sub>)

Dissolveu-se 1 g de bicloreto de mercúrio em 400 ml de ácido clorídrico. Em seguida, tomou-se 1 ml dessa solução e diluiu-se em 1000 ml de água destilada.

Os meios de cultura e as soluções foram sempre esterilizados em autoclave durante 15 minutos a 121°C, com presção de 1 atmosfera.

#### 4.3 - *Obtenção de nematóides para isolamento dos fungos*

Em casa de vegetação, 20 vasos de 16 cm de altura

e 18 cm de diâmetro, contendo uma mistura de cerca de 70% de terra e 30% de areia esterilizadas, foram semeados com tomate, da variedade Santa Cruz. Decorridos 10 dias da semeadura, procedeu-se o primeiro desbaste e, o segundo, 7 dias após o primeiro, ficando em cada vaso, três plantas.

Após 15 dias, tubérculos de batata infestados com *Meloidogyne incognita* e *Meloidogyne javanica*, provenientes do Instituto Agronômico de Campinas, foram cortados em pedaços e, homogeneizados com água em liquidificador, sendo que, cada vaso recebeu 150 ml dessa solução. Decorridos 7 dias, nova infestação foi efetuada.

Passados 60 dias, as raízes das plantas foram examinadas quanto à presença de galhas.

Em um vaso, de igual altura e diâmetro ao citado anteriormente, contendo três plantinhas de tomate (também semeadas em mistura de terra e areia esterilizadas) e mantido em casa de vegetação, foram inoculados 150 ml de água com larvas de *Meloidogyne incognita*, obtidas de raízes de cafeeiros (provenientes de análise de material realizada no Departamento de Zoologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz").

A análise das raízes foi efetuada 60 dias após a inoculação.

Por outro lado, raízes de tomateiro e feijão alado, provenientes do Instituto Agronômico de Campinas, infestadas com *Meloidogyne javanica*, foram utilizadas diretamente para

a extração de nematóides e isolamento dos fungos.

#### 4.4 - *Isolamento dos fungos encontrados na parte externa do corpo dos nematóides*

Raízes infestadas com nematóides foram lavadas em água e cortadas nas regiões das galhas, extraíndo-se as fêmeas com o auxílio de um escalpelo.

Em cada placa de Petri, contendo BDA acrescido do antibiótico estreptomomicina (100 µg/ml, cuja finalidade era evitar contaminação bacteriana), foram colocadas quatro fêmeas bem distanciadas, dentro de círculos marcados com lápis dermatográfico no fundo das placas. Estas foram incubadas a 28<sup>o</sup>C por 5 dias. Decorrido esse período de tempo, os fungos crescidos foram purificados em placas, contendo o mesmo meio de cultura usado anteriormente. Tais fungos, que receberam a denominação geral de E (externos), foram estocados em tubos de ensaio, contendo MC inclinado e estes conservados em refrigerador.

#### 4.5 - *Isolamento dos fungos encontrados na parte interna do corpo dos nematóides*

Primeiramente, procedeu-se a extração das fêmeas das raízes das plantas.

Grupos de três fêmeas eram, então, colocados, por um minuto, em um vidro de relógio, contendo sublimado corrosivo

( $\text{HgCl}_2$ ) 1 : 1000 sendo, em seguida, esmagadas contra a parede de um tubo de ensaio, contendo 2 ml de solução salina esterilizada. A parede do tubo era lavada com o auxílio de uma pipeta e, dessa solução, retirava-se 0,1 ml, que era semeado por placa contendo BDA. As placas eram incubadas a  $28^\circ\text{C}$ , por 5 dias, purificando-se, então, os fungos obtidos, denominados I (internos) e estocando-os em tubos com MC inclinado mantidos em refrigerador.

#### 4.6 - *Classificação a nível de gênero dos fungos obtidos*

Para se fazer uma classificação sumária a nível de gênero dos fungos obtidos, procedeu-se da seguinte maneira :

Em uma placa de Petri, contendo meio de cultura (BDA), colocaram-se quatro lâminulas previamente flambadas em álcool e bem distanciadas entre si. O fungo, em questão, era então inoculado com um fio de platina nos quatro lados de cada lâminula. Após 2 a 3 dias de incubação a  $28^\circ\text{C}$ , as lâminulas eram retiradas com o auxílio de uma pinça flambada e colocadas sobre lâminas, com uma gota de água e estas, levadas ao microscópio.

As diferentes estruturas dos fungos eram então observadas e, procedia-se a classificação de acordo com o Manual Illustrated Genera of Imperfect Fungi (BARNETT, 1958). O mesmo método foi realizado para todos os fungos. A confirmação do gênero de alguns fungos foi feita pela Seção de Micologia Fitopatológica do Instituto Biológico, São Paulo.

#### 4.7 - Isolamento de fungos da região externa e interna de raízes de feijão alado

O objetivo desse isolamento foi verificar, se os fungos que ocorriam em raízes de feijão alado, eram os mesmos, isolados a partir dos nematóides. Para tanto, pedaços da região externa da raiz infestada com *Meloidogyne javanica*, foram inoculados em meio de cultura (BDA) e, incubados a 28°C, por 5 dias, a fim de se isolar os fungos que aí ocorressem. Com a mesma finalidade, pedaços da região interna da raiz, após tratamento com sublimado corrosivo (HgCl<sub>2</sub>) 1 : 1000, foram inoculados em BDA e, incubados a 28°C, por 5 dias.

#### 4.8 - Extração de larvas do nematóide *Rotylenchulus reniformis* de uma amostra de solo com cultura do algodoeiro.

Para se fazer a extração de larvas de nematóides de uma amostra de solo da cultura do algodoeiro, infestada com *Rotylenchulus reniformis*, utilizou-se o método do peneiramento (OOSTENBRINK, 1960) conjugado ao Baermann modificado (MONTEIRO, 1970). Assim, colocou-se o solo em um recipiente ao qual se adicionou água, promovendo-se, a seguir, o destorroamento. A suspensão homogeneizada foi passada em peneira número 20, para separar as impurezas maiores, e em seguida, em peneira número 200, onde os nematóides ficaram retidos. Esta peneira foi, então lavada mediante jatos d'á

gua e os nematóides acompanhados de partículas menores foram coletados em um beaker. Essa suspensão foi, em seguida, passada através de uma camada de algodão hidrófilo mantida sobre uma tela de nylon, onde os nematóides ficaram retidos. O conjunto algodão-tela foi colocado sobre um vidro de relógio (siracusa) contendo água. Os nematóides devido ao seu geotropismo positivo movimentaram-se em direção ao fundo da siracusa, de onde foram retirados após 24 horas.

#### 4.9 - *Observação ao microscópio dos órgãos de captura formados pelos fungos*

Fungos isolados a partir do nematóide *Meloidogyne javanica* em raízes de tomateiro, foram ensaiados em meio de cultura Corn Meal Agar, a fim de verificar se ocorria a formação de órgãos de captura. O uso de Corn Meal Agar, para o cultivo de fungos predadores, é recomendado por DUDDINGTON (1957).

De cada tubo estoque, com MC inclinado, contendo os isolados foi feita uma suspensão em tween, para se obter cerca de  $10^6$  esporos por ml. A contagem do número de esporos foi realizada em hematímetro.

Para cada isolado, quatro placas eram usadas como tratamento e uma, como controle. As placas foram semeadas em Corn Meal Agar, contendo 100 µg por ml de estreptomicina, usando-se 0,1 ml da suspensão de esporos. O antibiótico tinha por finalidade evitar contaminação com bactérias.

Decorridas 48 horas a 28<sup>o</sup>C, as placas dos tratamentos receberam uma mistura de 0,5 ml de uma suspensão contendo larvas do nematóide *Rotylenchulus reniformis*, proveniente de solo com cultura do algodoeiro e, 0,01 ml de solução de tween; a seguir voltaram à estufa a 28<sup>o</sup>C.

A observação ao microscópio foi realizada 24 e 48 horas após a adição do nematóide, procedendo-se a contagem do número de estruturas de captura em 10 campos observados.

O método utilizado nesse ensaio foi o de SCHENCK e PRAMER (1975), com alterações.

#### 4.10 - Teste de produção de toxinas pelos isolados

Ensaio para a produção de toxinas foram efetuados utilizando-se o método de ALAM e col. (1973), porém com algumas modificações.

Os isolados foram inoculados em erlenmeyers contendo 250 ml de MC líquido e se desenvolveram sob agitação, por 48 horas. Cada isolado foi então, filtrado em papel de filtro e recolhido o extrato livre de células, em um frasco.

De cada frasco, 9 ml foram pipetados em vidros de relógio (siracusas), acrescentando-se estreptomicina e penicilina, de modo a se obter 100 µg/ml de antibiótico, para se evitar contaminação bacteriana e 1 ml da suspensão de água com larvas do nematóide *Rotylenchulus reniformis*. Estas foram observadas em microscópio estereoscópico após 8, 12 e 24

horas, a fim de se verificar a ocorrência de larvas *inertes*.

Como controle, utilizou-se MC líquido agitado por 48 horas e água destilada.

#### 4.11 - *Experimento em casa de vegetação*

Os isolados que formaram estruturas de captura e os que produziram toxinas, foram empregados em teste em casa de vegetação, utilizando-se vasos de 16 cm de altura e 13 cm de diâmetro, contendo cerca de 70% de terra acrescida de 30% de areia esterilizada e plantados com tomate da variedade Santa Cruz (uma planta por vaso após desbaste).

Decorridos 25 dias da sementeira, os vasos foram infestados com o nematóide *Meloidogyne incognita*, proveniente de raízes de tomateiro. O método de infestação foi o mesmo descrito no item 4.3; porém, não foi repetido após 7 dias.

Passados 7 dias, preparou-se uma suspensão de esporos de tween, de cada um dos isolados, com cerca de  $10^7$  esporos por ml. Adicionaram-se os 2 ml da suspensão de tween em 98 ml de água destilada e, essa solução foi distribuída aos vasos, obedecendo-se o sorteio.

O delineamento utilizado foi: blocos ao acaso segundo PIMENTEL GOMES (1973), e os tratamentos foram: apenas fungo, fungo e nematóide, apenas nematóide.

Como testemunhas foram utilizadas plantas sadias

(sem fungo e sem nematóide).

Decorridos, aproximadamente, 90 dias da adição dos fungos, procedeu-se o exame das raízes. Para tal, cada uma das plantas foi arrancada e, seu sistema radicular, avaliado quanto à presença de galhas, de acordo com as notas do quadro (LORDELLO, 1976).

- Nota 1 - Não houve infestação
- Nota 2 - infestação extremamente leve
- Nota 3 - infestação leve
- Nota 4 - infestação moderada
- Nota 5 - infestação severa

## 5. RESULTADOS

## 5.1 - Isolamento de fungos a partir de nematóides

Um total de 24 fungos foi isolado, tanto da parte externa quanto da interna do corpo de fêmeas de nematóides do gênero *Meloidogyne*, conforme indica a Tabela 1.

Tabela 1 - Fungos isolados de fêmeas de nematóides do gênero *Meloidogyne*

Nematóide	Procedência	Origem	Isolados nº
<i>Meloidogyne javanica</i>	raízes de tomateiro	E+	1,3,4,5,7,9
		I++	2,6,8
<i>Meloidogyne javanica</i>	raízes de feijão alado	E	11,12,13,16
		I	10,14,15
<i>Meloidogyne javanica</i> e <i>Meloidogyne incognita</i>	batatas infestadas	E	17,20,22
		I	18,19,21
<i>Meloidogyne incognita</i>	raízes de cafeeiro	E	- +++
		I	23,24

+E - Fungos encontrados na parte externa do corpo das fêmeas.

++I - Fungos encontrados internamente no corpo das fêmeas.

+++ - Não foram encontrados fungos na parte externa do corpo das fêmeas dessa espécie.

5.2 - *Classificação a nível de gênero de alguns dos fungos obtidos*

Os 24 isolados obtidos tiveram suas estruturas observadas ao microscópio, a fim de se tentar classificá-los, a nível de gênero. Apenas 12 puderam ser identificados, como mostra a Tabela 2.

Tabela 2 - Classificação a nível de gênero de 12 dos isolados obtidos.

Isolado nº	Gênero
1	<i>Helminthosporium</i>
2	<i>Aspergillus</i>
3	<i>Penicillium</i>
5	<i>Penicillium</i>
6	<i>Aspergillus</i>
8	<i>Pestalotia</i>
11	<i>Helminthosporium</i>
12	<i>Fusarium</i>
20	<i>Aspergillus</i>
22	<i>Penicillium</i>
23	<i>Aspergillus</i>
24	<i>Aspergillus</i>

### 5.3 - Isolamento de fungos da região externa e interna da raiz de feijão alado

Apenas quatro fungos (um pertencente ao gênero *Aspergillus*, um *Penicillium* e dois não identificados) foram obtidos nesse isolamento, como se pode constatar pela Tabela 3.

Uma comparação entre os fungos isolados de nematóides e os obtidos a partir de pedaços da região externa e interna da raiz de feijão alado é mostrada na mesma Tabela.

### 5.4 - Observação ao microscópio das estruturas de captura

Do total de 24 isolados obtidos a partir de nematóides do gênero *Meloidogyne*, apenas aqueles provenientes da espécie *M. javanica* de raízes de tomateiro, em número de nove, é que foram ensaiados em laboratório, quanto à formação de estruturas de captura. Verificou-se, que dos nove isolados, apenas dois (números 8 e 9) apresentaram tais estruturas.

Os dados em números de anéis e "knobs" adesivos, observados após 24 e 48 horas da adição dos nematóides, são apresentados nas Tabelas 4, 5, 6 e 7.

Tabela 3 - Comparação entre os fungos isolados a partir de nematóides do gênero *Meloidogyne* e aqueles obtidos de raízes de feijão alado.

Nematóides e Plantas hospedeiras	Origem(a)		FUNGOS(b)																					
	A <sub>1</sub>	%	A <sub>2</sub>	%	A <sub>3</sub>	%	B	%	C <sub>1</sub>	%	C <sub>2</sub>	%	C <sub>3</sub>	%	D	%	E <sub>1</sub>	%	E <sub>2</sub>	%	F	%	G	%
<i>M. javanica</i> e <i>M. incognita</i> (tomateiro)	E	20	-	-	-	20	20	-	20	-	-	-	-	-	20	20	-	-	-	-	-	-	-	-
	I	80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	60	-	-	-	-	-	60	-	-	-
<i>M. incognita</i> (cafeeiro)	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	I	80	-	-	-	-	40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. javanica</i> (tomateiro)	E	20	-	-	60	-	-	-	-	20	-	-	-	-	20	-	-	100	-	-	-	-	-	-
	I	100	80	-	-	-	-	-	-	-	-	20	20	75	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-
Controle (feijão alado)	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	34	80	-	-	-	-	-	-	-	-
	I	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	34

a) Origem  
E - fungos encontrados externamente ao corpo dos nematóides  
I - fungos encontrados internamente no corpo dos nematóides

b) Fungos  
A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub> - coloração preta, *Aspergillus niger*, *Pestalotia* e *Helminthosporium*, respectivamente.  
B - coloração verde, *Aspergillus flavus*

C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub> - coloração verde, espécies provavelmente distintas  
D - coloração verde, *Penicillium*

E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub> - coloração branca, espécies provavelmente distintas  
F - coloração amarela

G - coloração rosada

Tabela 4 - Estruturas de captura formadas pelo isolado n° 8 após 24 horas da adição do nematóide *Rotylenchulus reniformis*. Adição efetuada decorridas 48 horas de cultivo do fungo a 28°C.

CAMPOS OBSERVADOS	Placas									
	1		2		3		4		Controle	
	A <sup>+</sup>	B <sup>++</sup>	A	B	A	B	A	B	A	B
1	1	1	1	1	1	2	-	-	-	-
2	-	1	-	-	1	-	-	1	-	-
3	2	-	-	-	-	2	-	-	-	1
4	1	-	-	1	-	-	-	-	-	1
5	1	-	-	-	-	1	-	1	1	-
6	-	1	1	-	-	-	2	1	-	-
7	-	-	-	1	-	-	1	1	-	1
8	-	2	1	-	-	-	-	1	-	-
9	-	2	2	1	-	1	-	-	-	-
10	1	-	-	2	-	1	-	1	-	-
TOTAL	6	7	5	6	2	7	3	6	1	3

+A - anel simples

++B - anel do tipo apresentado nas figuras 1a e 1b.

Tabela 5 - Estruturas de captura formadas pelo isolado nº 8 após 48 horas da adição do nematóide *Rotylenchulus reniformis*. Adição efetuada decorridas 48 horas de cultivo do fungo a 28°C.

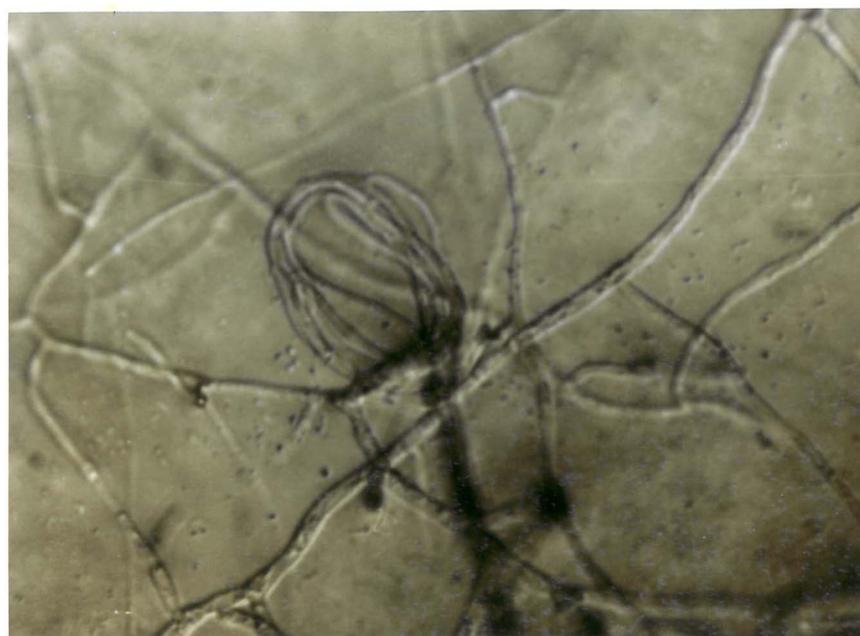
CAMPOS OBSERVADOS	Placas									
	1		2		3		4		Controle	
	A <sup>+</sup>	B <sup>++</sup>	A	B	A	B	A	B	A	B
1	-	3	-	-	1	-	-	-	-	-
2	-	4	-	-	2	1	1	-	-	-
3	-	5	2	-	-	1	-	1	-	1
4	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1
5	2	-	-	1	-	2	1	-	-	-
6	1	3	-	1	-	1	-	3	-	-
7	2	-	1	1	-	1	-	3	-	-
8	2	-	-	2	1	2	-	-	-	-
9	1	-	-	1	1	3	-	1	-	-
10	-	-	-	2	2	1	-	1	-	2
TOTAL	8	15	3	8	7	13	2	9	-	4

+A - anel simples

++B - anel do tipo apresentado nas figuras 1a e 1b.



(a) Anéis hifais observados após 24 horas da adição de larvas do nematóide *Rotylenchulus reniformis* (320x).



(b) Anéis hifais observados após 48 horas da adição de larvas do nematóide *Rotylenchulus reniformis* (320x).

Tabela 6 - Estruturas de captura formadas pelo isolado nº 9 após 24 horas da adição do nematóide *Rotylenchulus reniformis*. Adição efetuada decorridas 48 horas de cultivo do fungo a 28°C.

CAMPOS OBSERVADOS	Placas														
	1			2			3			4			Controle		
	A <sup>+</sup>	B <sup>++</sup>	C <sup>+++</sup>	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
1	1	-	1	-	1	15	1	-	1	2	-	3	-	2	1
2	3	3	-	1	2	14	-	-	21	-	-	31	-	-	-
3	1	2	-	-	1	3	-	1	8	3	-	13	-	-	-
4	-	-	4	-	2	1	2	-	1	-	1	4	-	2	-
5	-	1	1	-	2	1	-	-	7	-	3	12	-	1	1
6	2	3	-	1	-	8	1	1	-	1	2	13	-	1	-
7	3	1	-	1	-	1	-	2	3	-	1	24	-	-	2
8	-	1	-	1	-	2	-	-	4	1	-	-	-	-	-
9	2	1	-	1	2	1	2	-	-	4	2	-	-	1	-
10	1	2	-	1	-	-	-	1	1	3	1	-	-	-	-
TOTAL	13	14	6	6	10	46	6	5	46	14	10	100	-	7	4

+A - anel simples

++B - anel do tipo apresentado na figura 2

+++C - "knobs" adesivos do tipo apresentado na figura 3

Tabela 7 - Estruturas de captura formadas pelo isolado n° 9 após 48 horas da adição do nematóide *Rotylenchulus reniformis*. Adição efetuada decorridas 48 horas de cultivo do fungo a 28°C.

CAMPOS OBSERVADOS	Placas														
	1			2			3			4			Controle		
	A <sup>+</sup>	B <sup>++</sup>	C <sup>+++</sup>	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
1	-	2	-	1	5	28	-	-	10	3	1	6	-	-	3
2	2	-	3	-	-	35	1	-	4	-	4	2	-	1	-
3	1	1	1	-	1	1	-	-	3	1	-	-	-	2	1
4	-	2	-	-	-	6	-	1	-	-	2	1	-	-	1
5	2	5	-	-	2	5	-	-	1	2	2	-	-	-	-
6	-	2	-	-	2	4	-	2	-	2	-	-	-	1	2
7	1	1	-	-	3	3	-	3	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	6	-	1	-	1	1	-	-	3	-	-	1	-
9	1	1	-	-	1	-	1	-	-	1	-	-	-	-	-
10	-	2	-	-	2	-	1	-	-	3	1	-	-	-	-
TOTAL	7	16	10	1	17	82	4	7	18	12	13	9	-	5	7

+A - anel simples

++B - anel do tipo apresentado na figura 2

+++C - "knobs" adesivos do tipo apresentado na figura 3

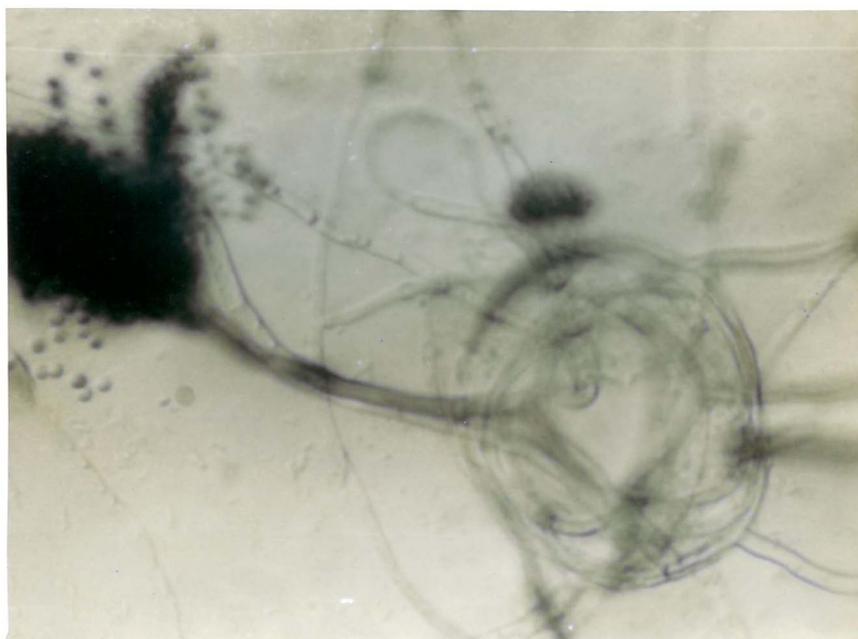


Figura 2 - Isolado nº 9. Anéis hifais observados após 24 horas da adição de larvas do nematóide *Rotylenchulus reniformis* (320 x).

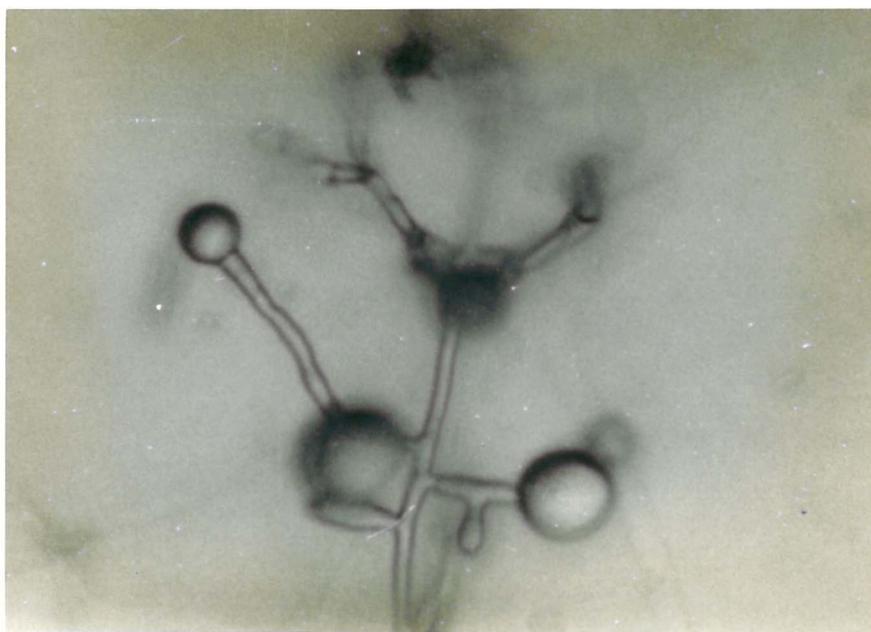


Figura 3 - Isolado nº 9 "knobs" adesivos formados em presença de larvas do nematóide *Rotylenchulus reniformis* (320 x).

### 5.5 - Teste de produção de toxinas

Excetuando-se os isolados formadores de estruturas de captura, os 22 restantes foram empregados em testes de produção de toxina, em que se utilizaram filtrados de cultura contra larvas do nematóide *Rotylenchulus reniformis*. Os resultados se acham na Tabela 8.

Pela Tabela 8, verifica-se que os isolados, 2, 11, 12 e 23 produziram alguma toxina prejudicial ao nematóide. Assim sendo, o mesmo experimento foi repetido para apenas três dos quatro isolados que deram resultados positivos, pois constatou-se, que os isolados de números 2 e 23 pertenciam ao gênero *Aspergillus*, sendo a espécie *A. niger*. Os resultados obtidos constam na Tabela 9.

Fica evidente, pela Tabela 9, que as toxinas agem eficazmente sobre os nematóides, após 12 horas de contato com os mesmos.

### 5.6 - Experimento em casa de vegetação

No ensaio realizado em casa de vegetação, os fungos formadores de estruturas de captura e os produtores de toxinas foram adicionados ao solo. Decorridos 90 dias, cada uma das plantas foi arrancada e, seu sistema radicular, avaliado, segundo o quadro do item 4.11. Esta avaliação consta na Tabela 10.

Tabela 8 - Efeito de filtrados de cultura de 22 isolados sobre larvas do nematóide *Rotylenchulus reniformis*.

ISOLADOS Nº	TEMPO ( horas )			
	0	8	12	24
1	+	+	+	+
2	+	±	-	-
3	+	+	+	+
4	+	+	+	+
5	+	+	+	+
6	+	+	+	+
7	+	+	+	+
10	+	+	+	+
11	+	+	-	-
12	+	+	-	-
13	+	+	+	+
14	+	+	+	+
15	+	+	+	+
16	+	+	+	+
17	+	+	+	+
18	+	+	+	+
19	+	+	+	+
20	+	+	+	+
21	+	+	+	+
22	+	+	+	+
23	+	±	-	-
24	+	+	+	+
Controle (MC)	+	+	+	+
Controle(água destilada)	+	+	+	+

+ = 100% das larvas com movimento

± = cerca de 50% das larvas com movimento

- = 100% das larvas inertes

Tabela 9 - Efeito de filtrados de cultura dos isolados produtores de toxinas sobre larvas do nematóide *Rotylenchulus reniformis*.

ISOLADOS N°	TEMPO (horas)			
	0	8	12	24
2	+	±	-	-
11	+	+	-	-
12	+	+	-	-
Controle ( MC )	+	+	+	±
Controle (água destilada)	+	+	+	+

+ = 100% das larvas com movimento

± = cerca de 50% das larvas com movimento

- = 100% das larvas inertes

Tabela 10 - Notas concedidas aos sistemas radiculares de tomateiros, avaliados quanto à presença de galhas, segundo o quadro do item 4.11. Cinco fungos promissores foram ensaiados, visando redução do ataque de nematóides *Meloidogyne incognita*.

ISOLADOS Nº	NEMATÓIDES	B L O C O S		
		I	II	III
2	+	2	4	4
	-	1	1	1
8	+	3	5	4
	-	1	1	1
9	+	2	5	4
	-	1	1	1
11	+	3	4	5
	-	1	1	1
12	+	4	4	4
	-	1	1	1
I	+	5	5	3
	-	1	1	1

+ = presença de nematóides

- = ausência de nematóides

Para análise dos dados do presente experimento, utilizou-se o Teste de Friedman, segundo CAMPOS (1976). O valor do  $\chi^2$  obtido foi 2,61, que comparado com • da tabela (8,53 a 5% de probabilidade) é não significativo.

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1 - Classificação a nível de gênero dos isolados obtidos

Verifica-se, pela Tabela 2, uma predominância do gênero *Aspergillus*, pois dos 12 isolados, cinco pertencem a esse gênero, o que significa, em termos de porcentagem, cerca de 41,6%.

Dentre os fungos do referido gênero, constatou-se que dois (números 2 e 23) pertencem à espécie *A.niger*; o que foi de grande utilidade em testes posteriores, que tiveram por finalidade comprovar suas propriedades nematicidas, descritas por MANKAU (1969).

Observa-se ainda na Tabela 2, que os isolados de números 1 e 11 pertencem ao gênero *Helminthosporium*, cuja espécie *H. nodulosum* é citada por ALAM e col. (1973) como nociva a *Meloidogyne incognita*.

Deve-se salientar aqui, que dos 24 isolados, apenas 12 puderam ser classificados. É provável portanto, que entre os restantes existam gêneros muito conhecidos como nocivos a nematóides, como *Arthrobotrys*, e *Dactylella* (DRECHSLER, 1937).

## 6.2 - Isolamento de fungos da região externa e interna da raiz de feijão alado

Pela Tabela 3, verifica-se que dos quatro fungos isolados a partir de pedaços da região externa e interna da raiz de feijão alado, três (um do gênero *Aspergillus*, um *Penicillium* e um não identificado) foram também obtidos a partir de nematóides. Observa-se, ainda que o *Aspergillus niger* foi de ocorrência generalizada, seguindo-se o *Penicillium* que foi obtido em três dos isolamentos.

Com relação ao *Aspergillus niger*, MANKAU (1969) e ALAM e col. (1973) citam-no como ocorrendo em solo e em rizosfera de quiabo, respectivamente e como possuindo propriedades nematicidas.

## 6.3 - Formação de estruturas de captura

Para o isolado número 8 observou-se a formação de anéis após 24 horas da adição de nematóides (Tabela 4).

Nas placas controle houve a formação de alguns anéis, espontaneamente, pelo fungo, fato este também observado por SCHENCK e PRAMER (1975).

Comparando-se as Tabelas 4 e 5, verifica-se que o número de anéis formados após 24 e 48 horas da adição dos ne

matóides, permaneceu praticamente constante.

Para o isolado número 9, a Tabela 6 mostra, que decorridas 24 horas da adição de nematóides, ocorreu formação de anéis e de abundante número de "knobs" adesivos. Nas placas controle, algumas destas estruturas foram também espontaneamente formadas e seus números parecem permanecer constantes para as duas observações efetuadas.

Se as Tabelas 6 e 7 forem também comparadas, nota-se que enquanto o número de anéis permaneceu praticamente constante, o número de "knobs" variou muito para os campos observados.

Os fungos mais conhecidos como formadores de estruturas típicas de captura, pertencem a algumas espécies dos gêneros *Arthrobotrys*, *Dactylaria* e *Dactylella* (DRECHSLER, 1937) e *Monacrosporium* (MONSON e col. 1974). No presente trabalho, apenas um dos dois isolados formadores dessas estruturas pode ser classificado, constatando-se que nenhum dos gêneros acima foi representado, pois o isolado número 8 é um *Pestalotia*.

#### 6.4 - Testes para produção de toxinas

A Tabela 9 mostra, que filtrados dos isolados número 2, 11 e 12, *Aspergillus niger*, *Helminthosporium sp.* e *Fusarium sp.*, respectivamente, causaram imobilização das larvas do nematóide *Rotylenchulus reniformis*, após 12 horas de contato com as

mesmas.

Os resultados para *Aspergillus niger* concordam com aqueles conseguidos por ALAM e col. (1973), onde se utilizou o nematóide *Meloidogyne incognita* e com os de MANKAU (1969), onde foi empregado *Aphelenchus avenae*; porém, ensaios realizados por GIUMA e COOKE (1971) para esta mesma espécie de nematóide, não deram resultados positivos.

Segundo DESAI e col. (1972), a toxicidade de filtrados de cultura de *A. niger* se deve, provavelmente, ao ácido oxálico, ácido este, que pode ter sido responsável pela imobilização de nematóides, no presente trabalho.

*Fusarium* sp. foi outro produtor de toxina; porém MANKAU (1969), utilizando *Fusarium* sp. e GIUMA e COOKE (1971), ensaiando *Fusarium oxysporum*, ambos contra *Aphelenchus avenae*, constataram a ineficiência destes fungos com relação ao referido nematóide.

Em se tratando do gênero *Helminthosporium*, tanto o isolado número 1 quanto o número 11 pertencem a esse gênero, no entanto, apenas este último surtiu efeito sobre os nematóides empregados. Isto pode ser explicado pelo fato deles, provavelmente, serem de espécies diferentes.

Quanto a esse gênero, ALAM e col. (1973) obtiveram imobilização de *Meloidogyne incognita*, pela espécie *H. nodulosum*.

Deve-se salientar aqui, que, tanto a espécie de

fungo quanto a de nematóide influem na resposta desses testes; assim sendo, uma melhor comparação seria feita, utilizando-se os dados de um experimento com as mesmas espécies de fungo e nematóide do presente trabalho.

#### 6.5 - *Ensaio em casa de vegetação*

Pela Tabela 10 observa-se que o isolado número 2 (*Aspergillus niger*) apresenta uma tendência em ser mais eficiente que os outros no controle do nematóide *Meloidogyne incognita* em tomateiro, apesar do teste empregado (Teste de Friedman) não ter acusado diferença entre os tratamentos. Isto pode ter sido consequência do pequeno número de repetições utilizado por tratamento. Em testes com tomate da variedade Marglobe, DESAI e col. (1972) já demonstraram a eficiência do *A. niger* contra o referido nematóide.

Convém salientar que o presente experimento serve de base para outras pesquisas nessa área e que um maior número de repetições é necessário quando se trabalha com dados subjetivos como estes.

Ainda fatores como: umidade do solo, teor de matéria orgânica, tamanho do inóculo, relações ecológicas no solo e planta hospedeira, podem interferir no sucesso do controle. Por exemplo: umidade excessiva reduz a atividade do fungo predador (SOPRUNOV, 1947) e a decomposição da matéria orgânica favorece muito os inimigos naturais dos nema-

tóides (LINFORD e col. 1938). Sabe-se ainda que embora haja fungos capazes de dizimar nematóides em condições de laboratório e muitos destes fungos sejam encontrados em várias regiões, pouco se conhece a respeito deles em condições naturais e sua atividade no solo é difícil de ser estabelecida (MANKAU, 1961). Finalmente com relação a planta hospedeira, o mesmo autor afirma, ainda, que o uso de fungos predadores, provavelmente, não surte efeito contra os nematóides em hospedeiros muito favoráveis, como tomate e quiabo, onde o potencial reprodutivo do parasita é muito grande. Assim é que LINFORD e YAP (1939) conseguiram resultados positivos, em abacaxí, com o fungo *Dactylella ellipsospora*, contra o nematóide formador de galha, pois contaram com um ponto favorável, que é o fato do sistema radicular dessa planta ser fibroso, portanto, menos suscetível ao ataque.

## 7. CONCLUSÕES

Pelos resultados obtidos, as seguintes conclusões puderam ser tiradas:

- a) Fungos de diversos gêneros puderam ser isolados a partir de nematóides, havendo predominância do gênero *Aspergillus*.
- b) Dois isolados (um do gênero *Pestalotia* e um não identificado), dos nove ensaiados, apresentaram estruturas de captura em testes de laboratório, em presença de nematóides. Mesmo na ausência destes, essas estruturas ocorreram, porém, em menor número.
- c) Filtrados de cultura de três isolados (*Aspergillus niger*, *Helminthosporium sp.* e *Fusarium sp.*) mostraram-se tóxicos a larvas do nematóide *Rotylenchulus reniformis*, após 12 horas de contato com as mesmas.

d) Ensaio em casa de vegetação, com os isolados formadores de estruturas de captura e com os produtores de toxina, mostrou que esses fungos não foram efetivos contra *Meloidogyne incognita* parasitando tomateiro. Muitos fatores podem ser responsáveis pela não efetividade deste último teste.

## 8 - SUMMARY

Fungi isolated from *Meloidogyne incognita* and *M. javanica* were tested in laboratory for their capacity to produce specialized nematode traps and nematode toxins. The nematodes were obtained from roots of tomato (*Lycopersicon esculentum*), coffee (*Coffea arabica*) and winged bean (*Psophocarpus tetragonolobus*).

A total of 24 fungal isolates were obtained and 12 of them classified as belonging to the genera *Fusarium*, *Helminthosporium*, *Penicillium*, *Pestalotia* and *Aspergillus*, with predominance of the latter genus.

The fungi isolated from *M. javanica* on tomato roots were used to study occurrence of trap formation. One unidentified isolate and one belonging to the *Pestalotia* genus showed relatively frequent nematode trap formation in the presence of larvae of *Rotylenchulus reniformis*, although some trap formation also occurred in the absence of nematodes.

Culture filtrates of all fungal isolates, except those which formed traps, were used to study toxin production.

*Aspergillus niger*, *Helminthosporium* sp. and *Fusarium* sp. showed a toxic effect on the activity of the larvae of *R. reniformis*, as observed after 12 hours.

Greenhouse experiment with the trap and toxin producing fungi did not show any antagonistic effect on *M. incognita* in tomato.

## 9. LITERATURA CITADA

- ALAM, M.M., M.W. KHAN e S.K. SAXENA, 1973. Inhibitory effect of culture filtrates of some rhizosphere fungi of okra on the mortality and larval hatch of certain plant parasitic nematodes. *Indian J. Nematol.*, 3: 94 - 98.
- BARNETT, H.L., 1958. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. 3<sup>a</sup> ed. Minneapolis, Burgess Publishing Co., 218 p.
- BLACKBURN, F. e W.A. HAYES, 1963. A chemically defined medium for the cultivation of nematophagous Hyphomycetes. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, 46: 449 - 452.
- DESAI, M.V., H.M. SHAH e S.N. PILLAI, 1972. Effect of *Aspergillus niger* on root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Indian J. Nematol.*, 2: 210 - 214.
- DRESHSLER, C., 1937. Some Hyphomycetes that prey on free-living terricolous nematodes. *Mycologia*, 29: 447 - 552.
- DUDDINGTON, C.L., 1957. *The Friendly Fungi*. 1<sup>a</sup> ed. London, Faber and Faber, 188 p.
- DUDDINGTON, C.L., 1962. Predaceous fungi and the control of eelworms. In: CARTHY, J.D. e C.L. DUDDINGTON. "Viewpoint in Biology". 1<sup>a</sup> ed. London, Butterworths e Colimited, 290 p.

- DUDDINGTON, C.L., F.G.W. JONES e F. MORIARTY, 1956. The effect of predaceous fungus and organic matter upon the soil population of beet eelworm, *Heterodera schachtii* Schm. *Nematologica*, 1 : 345 - 348.
- FRESENIUS, G., 1852. Beitr. Mykol. n° 1 - 2. Apud D. PRAMER, 1964. Nematode - trapping fungi. *Science*, 144:382 - 388.
- GIUMA, A.Y. e R.C. COOKE, 1971 - Nematotoxin production by *Nematoctonus haptocladus* and *N. concurrens*. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, 56 : 89 - 94.
- GORLENKO, M.V., 1956. Predatory fungi and their utilization in nematode control. *Nematologica*, 1 : 147 - 150.
- KENNEDY, N. e J. TAMPION, 1978. A nematotoxin from *Nematoctonus robustus*. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, 70 : 140 - 141.
- LAWTON, J.R., 1957. The formation of constricting rings in nematode - catching Hyphomycetes grown in pure culture. *J. Exptl. Botany*, 8 : 50 - 57.
- LINFORD, M.B. e F. YAP, 1939. Root - knot nematode injury restricted by a fungus. *Phytopathology*, 29 : 596 - 609.
- LINFORD, M.B., F. YAP e J.M. OLIVEIRA, 1938. Reduction of soil populations of the root - knot nematode during decomposition of organic matter. *Soil Science*, 45: 127 - 140.

- LORDELLO, L.G.E., 1976. *Nematóides das Plantas Cultivadas*. 3.<sup>a</sup> ed. São Paulo, Livraria Nobel S.A., 197 p.
- MANKAU, R., 1961. The use of nematode - trapping fungi to control root - knot nematodes. *Nematologica*, 6 : 326 - 332.
- MANKAU, R., 1968. Effect of nematocides on nematode-trapping fungi associated with the citrus nematodes. *Pl. Dis. Reprtr.* 52: 851-855.
- MANKAU, R., 1969. Toxicity of culture filtrates of *Aspergillus niger* to the mycophagous nematode, *Aphelenchus avenae*. *Phytopathology* (Abstr) 59 : 13.
- MANKAU, R., 1969. Nematicidal activity of *Aspergillus niger* culture filtrates. *Phytopathology*, 59 : 1170.
- MONOSON, H.L., A.G. GALSKEY, J.A. GRIFFIN e E.J. McGRATH, 1973. Evidence for and partial characterization of a nematode attraction substance. *Mycologia*, 65 : 78 - 85.
- MONOSON, H.L., A.G. GALSKEY e R. S. STEPHANO, 1974. Studies on the ability of various nematodes to induce trap formation in a nematode - trapping fungus, *Monacrosporium doedycoides*. *Nematologica*, 20 : 96 - 102.
- MONOSON, H.L. e M. RANIERI, 1972. Nematode attraction by an extract of a predaceous fungus. *Mycologia*, 64 : 628 - 631.
- MONTEIRO, A.R., 1970 - Dorylaimoidea de cafezais paulistas (Ne

- mata, Dorylaimida). Piracicaba, ESALQ/USP, 137 p.  
(Tese de Doutorado).
- OOSTENBRINK, M., 1960. Estimating nematode population by some selected methods. In : SASSER, J.N. e R. JENKINS, Coord. *Nematology fundamentals and recent advances with emphasis on plant parasites and soil forms*. Chapel Hill, Univ. North Carol. Press, p.85-102.
- PIMENTEL GOMES, F., 1973. *Curso de Estatística Experimental*. 5ª ed. São Paulo, Livraria Nobel S.A., 430 p.
- PONTECORVO, G., J.A. ROPER, L.M. HEMMONS, K.D. McDONALD e A.W. BUFTON, 1953. The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Advances in Genetics*, 5 : 141 - 238.
- PRAMER, D., 1959. Nemin : a morphogenic substance causing trap formation by predaceous fungi. *Science*, 129 : 966 - 967.
- PRAMER, D., 1964. Nematode - trapping fungi. *Science*, 144 : 382 - 388.
- SCHENCK, S. e D. PRAMER, 1975. The effects of volatile compounds from nematodes on trap formation by a nematode - trapping fungus. *Appl. Microbiol.*, 30 : 496 - 497.
- SOPRUNOV, F.F., 1947. The destruction of the infective larvae of nematodes by soil fungi. Apud M.V. GORLENKO, 1956. Predatory fungi and their utilization in nematode control. *Nematologica*, 1 : 147 - 150.
- SVESHNIKOVA, N.M. e E. KONDAKOVA, 1953. Não publicado. Apud

M.V. GORLENKO, 1956. Predatory fungi and their utilization in nematode control. *Nematologica*, 1 :147 - 150.

WORONIN, M., 1870. Abhandl Senckenberg Naturforsch Ges., 7 , 325. Apud D. PRAMER, 1964. Nematode - trapping fungi. *Science*, 144 : 382 - 388.

ZOPF, W., 1888. Nova Acta Leopoldiana, 52, 314. Apud D. PRAMER, 1964. Nematode - trapping fungi. *Science*, 144: 382 - 388.