

MEN 20748

JOÃO FLAVIO VELOSO SILVA

FUNGOS ENDOPARASITAS DE NEMATOIDES NA REGIÃO  
DE LAVRAS E SÃO SEBASTIÃO DO PARAISO:  
OCORRENCIA, CARACTERIZAÇÃO E POTENCIAL  
PARA O CONTROLE BIOLÓGICO

Dissertação apresentada à Escola Superior  
de Agricultura de Lavras, como parte  
das exigências do Curso de Pós-Gradua-  
ção em Agronomia, área de concentração  
em Fitopatologia, para  
obter o título de "Mestre".

LAVRAS

DEPARTAMENTO

DE AGRICULTURA

DE SÃO PAULO

JOÃO FLAVIO VELOSO SILVA

FUNGOS ENDOPARASITAS DE NEMATÓIDES NA REGIÃO DE LAVRAS E SÃO SEBASTIÃO DO PARAÍSO: OCORRÊNCIA, CARACTERIZAÇÃO E POTENCIAL PARA O CONTROLE BIOLÓGICO

Trabalho apresentado à Escola Superior de Agricultura de Lavras, como parte das exigências do Curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fitopatologia, sob a orientação do Professor Dr. Márcio



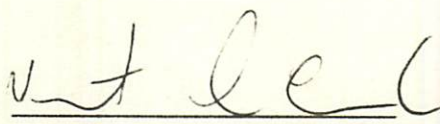
1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10

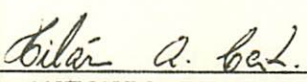
Lavras, 1990

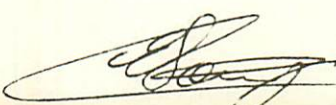
1990

FUNGOS ENDOPARASITAS DE NEMATOIDES NA REGIAO DE LAVRAS  
E SAO SEBASTIAO DO PARAISO: OCORRENCIA, CARACTERIZACAO  
E POTENCIAL PARA CONTROLE BIOLOGICO

APROVADA

  
VICENTE PAULO CAMPOS

  
HILARIO ANTONIO DE CASTRO

  
PAULO ESTEVAO DE SOUZA

A seu Ze, Paizin,  
e a Dona Dite, Mãezinha,  
com eterna gratidão...

DEDICO

A Vicente Paulo Campos

OFEREÇO



## AGRADECIMENTOS

Inicialmente, visto que tudo começou com eles, devo agradecer a meus pais pela grande ajuda e compreensão. Também é imprescindível agradecer aos sábios conselhos e profunda amizade de Vicente Paulo Campos, meu orientador em todos os sentidos.

Pela ajuda no Laboratório, obrigado Helô Leite. Rose, minha memória, obrigado de todo coração. Márcia, obrigado pelo carinho.

Obrigado também à Escola Superior de Agricultura de Lavras; à CAPES pela concessão da bolsa de estudos e a FINEP pelo financiamento do projeto.

Obrigado ao pessoal do Departamento de Fitossanidade da ESAL, aos músicos da Cachoeirinha e a todos que contribuíram...

## SUMARIO

	Pag.
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISAO DE LITERATURA.....	03
3. MATERIAL E METODOS.....	17
3.1. Ocorrência, isolamento, identificação e caracterização morfológica de fungos endoparasitas na região de Lavras e São Sebastião do Paraíso.....	17
3.1.1. Obtenção e manutenção do nematóide-isca ( <i>Panagrellus redivivus</i> ) e <i>Caenorhabditis elegans</i> ..	17
3.1.2. Obtenção de <i>Xiphinema</i> sp.....	17
3.1.3. Isolamento de fungos endoparasitas de nematóides..	18
3.1.3.1. Técnica da centrifugação (BARRON, 1969) modificada.....	18
3.1.3.2. Técnica do funil de Baerman (GIUMA & COOKE, 1972) modificada.....	18
3.1.4. Identificação das espécies de fungos endoparasitas de nematóides isolados de diferentes ecossistemas na região de Lavras e São Sebastião do Paraíso....	20

3.2. Efeito da temperatura na capacidade parasitária de <i>Haptaglossa heterospora</i> Drechsler 1940 "in vitro".....	21
3.3. Capacidade parasitária de <i>Haptaglossa eterospora</i> Drechsler, 1940 a diferentes espécies de nematóides "in vitro".....	22
4. RESULTADOS E DISCUSSAO.....	25
4.1. Ocorrência, isolamento, identificação de fungos endoparasitas na região de Lavras e São Sebastião do Paraíso.....	25
4.2. Caracterização das espécies de fungos endoparasitas de nematóides isolados em diferentes ecossistemas na região de Lavras e São Sebastião do Paraíso.....	29
4.2.1. <i>Catenaria</i> sp.....	29
4.2.2. <i>Haptaglossa heterospora</i> Drechsler 1940.....	33
4.2.3. <i>Harposporium anguillulae</i> Lohde 1874 (Karling, 1938).....	36
4.2.4. <i>Harposporium bysmatosporum</i> Shephed, 1955.....	39
4.2.5. <i>Harposporium crassum</i> Shepherd, 1965.....	41
4.2.6. <i>Harposporium helicoides</i> Drechsler, 1940.....	43
4.3. Efeito da temperatura na capacidade parasitária de <i>Haptaglossa heterospora</i> Drechsler 1940, "in vitro".....	46
4.4. Capacidade parasitária de <i>Haptaglossa heterospora</i> Drechsler 1940 em várias espécies de nematóides, "in vitro".....	48
5. CONCLUSOES.....	54
6. RESUMO.....	55
7. SUMMARY.....	57
8. REFERENCIA BIBLIOGRAFICA.....	59

## LISTA DE TABELAS

TABELA	Pag.
1 - Fungos endoparasitas isolados de nematóides a partir de de amostras de solo da região de Lavras e São Sebastião do Paraíso. ESAL - Lavras - MG 1990.....	27
2 - Frequência de 06 espécies de fungos endoparasitas de nematóides em solos sob florestas, olericultura e culturas perenes na região de Lavras e São Sebastião do Paraíso. ESAL - Lavras - MG 1990.....	28



LISTA DE FIGURAS

- |   | Pág. |
|---|------|
| <p>Figura 1 - Fotomicrografia de <i>Xiphinema</i> sp. parasitado por <i>Catenaria</i> sp. A: Visão geral do nematóide parasitado (100 x) mostrando os esporângios do fungo no interior do seu corpo. B: Detalhe (400 x), do esporângio. C: Esporos encistados nas aberturas naturais do nematóide. ESAL - Lavras MG - 1990.....</p>   | 31   |
| <p>Figura 2 - Desenho esquemático de nematóides parasitados por <i>Catenaria</i> sp. A: esporângios no interior do nematóide parasitado, B: tubos de evacuação do esporângio, C: esporos uniflagelados nadando em direção ao novo hospedeiro, D: esporos encistados nas aberturas naturais do novo hospedeiro. ESAL - Lavras MG - 1990.....</p>   | 32   |
| <p>Figura 3 - A: Fotomicrografia de <i>Panagrellus redivivus</i> parasitado por <i>H. heterospora</i> mostrando os esporângios do fungo no interior do seu corpo (400 x). B: Desenho esquemático de nematóides parasitados por <i>H. heterospora</i>. a: esporângio. b: partículas infectivas do fungo sob a cutícula do nematóide. c: zoosporos inicialmente esféricos, atingindo o formato rombóide típico. Te: Tubo de evacuação. ESAL - Lavras MG - 1990.....</p>                 | 35   |
| <p>Figura 4 - Fotomicrografia de A: <i>Panagrellus redivivus</i> parasitado por <i>Harposporium anguillulae</i> (400x) mostrando o conidióforo e conídios externos ao corpo do nematóide infectado. B: desenho esquemático do nematóide parasitado por <i>H. anguillulae</i>. a: clamidosporo formado nas hifas localizadas no interior do nematóide. b: fiálides (células conidiogênicas). c: esporos. d: hifa vegetativa no interior do nematóide. ESAL - Lavras MG - 1990.....</p> | 38   |

- Figura 5 - A: Fotomicrografia de *Panagrellus redivivus* parasitado por *Harposporium bysmatosporum* mostrando o conidióforo e as hifas assimilativas (400 x) B: fotomicrografia em maior aumento (1000 x) mostrando o conidióforo com as fiálides (a) e os esporos típicos (b). C: desenho esquemático mostrando a infecção de *Panagrellus redivivus* por *H. bysmatosporum*. a: esporo. b: fiálides. c: hifas assimilativas. ESAL - Lavras MG - 1990..... 40
- Figura 6 - A: Fotomicrografia de *Panagrellus redivivus* parasitado por *Harposporium crassum* mostrando o conidióforo, as fiálides e os esporos (400 x). B: desenho esquemático de *Panagrellus redivivus* parasitado por *H. crassum*. a: clamidosporo formado nas hifas assimilativas. b: fiálides. c: esporos. ESAL - Lavras MG - 1990..... 42
- Figura 7 - A: Fotomicrografia de *Panagrellus redivivus* parasitado por *Harposporium helicoides* (400 x), mostrando os conídios e conidióforos. B: desenho esquemático de *Panagrellus redivivus* parasitado por *H. helicoides*. a: clamidosporo. b: fiálides. c: esporo. ESAL - Lavras MG - 1990..... 45
- Figura 8 - Efeito da temperatura no parasitismo de *Haptaglossa heterospora* a *Panagrellus redivivus* expressa em % de infecção. ESAL - Lavras MG - 1990..... 48
- Figura 9 - Parasitismo de *Haptaglossa heterospora* a *Ditylenchus dipsaci*, *Panagrellus redivivus*, *Caenorhabditis elegans*, *Meloidogyne exigua* e *M. incognita* durante 10 dias à temperatura de 23-25°C. ESAL - Lavras, M.G. 1990..... 49
- Figura 10 - Parasitismo de *Haptaglossa heterospora* em nematóides da espécie *Meloidogyne incognita*. Observa-se esporângios de diferentes tamanhos em fileira simples. ESAL - Lavras, MG. 1990..... 50
- Figura 11 - Parasitismo de *Haptaglossa heterospora* em nematóides da espécie *Meloidogyne exigua*. Observam-se esporângios de diferentes tamanhos em fileira simples. ESAL - Lavras, MG. - 1990..... 51

Figura 12 - Parasitismo de *Haptaglossa heterospora* em nematóides da espécie *Ditylenchus dipsaci*. Observam-se esporângios em fileiras duplas ou triplas. ESAL - Lavras, MG. 1990..... 52

Figura 13 - Parasitismo de *Haptaglossa heterospora* nas espécies de nematóides:  
A: Em *Caenorhabditis elegans*  
B: Em *Panagrellus redivivus*  
Observam-se esporângios grandes. ESAL - Lavras, MG. 1990..... 53

## 1. INTRODUÇÃO

Os nematóides fitoparasitas são responsáveis por grandes perdas na produção agrícola, principalmente em regiões tropicais e sub tropicais. De acordo com pesquisa de SASSER (1989), 12,3% da produção agrícola mundial é perdida anualmente. Segundo o mesmo autor a perda monetária anual, se consideradas todas as culturas, excede 100 bilhões de dólares.

Para o controle de fitonematóides tem-se utilizado principalmente, nematicidas e variedades resistentes ou tolerantes. Estas medidas têm encontrado algumas restrições nas suas aplicações, sob determinadas circunstâncias. Os nematicidas apresentam o grande inconveniente de deixar resíduos tóxicos no meio ambiente, além de aumentar os custos de produção. A obtenção de variedades resistentes ou tolerantes apresenta alguns dificuldades como a resistência específica, muito comum nos vegetais, e o grande antagonismo entre rusticidade e as características agronômicas desejáveis (NOVARETTI, 1986). Por outro lado o uso da rotação de culturas no controle de fitonematóides é questionável por razões econômicas e de especificidade do mercado. Desta forma necessitam-se de



alternativas no controle destes patógenos, surgindo, por conseguinte, o controle biológico.

Os fitonematóides possuem muitos inimigos naturais, como vírus, riquetsias, bactérias, outros nematóides, tardígrados, ácaros, turberlárias, insetos e fungos, exercendo tais organismos, na natureza, algum controle sobre a população destes patógenos. Os fungos que atacam nematóides têm sido apontados como organismos promissores no controle destes patógenos, constituindo uma das prioridades atuais nas pesquisas no Brasil. Os fungos nematófagos são separados em dois grupos conforme a sua forma de parasitismo aos nematóides. Os fungos ectoparasitas apresentam mecanismos de captura de nematóides, como anéis, podendo ser constritivos ou não, hifas ou bulbos adesivos. Por outro lado os fungos endoparasitas utilizam esporos para infectar os nematóides, constituindo num grupo bastante promissor no controle biológico, por escapar à competição por outros fungos de solo.

Embora esta área de pesquisa tenha alcançado grandes avanços em outros países, o mesmo não aconteceu no Brasil, necessitando-se de estudos básicos sobre a caracterização e a potencialidade destes organismos no controle de fitonematóides. Desta forma objetivou-se neste trabalho:

1. Isolar, identificar, caracterizar morfológicamente e determinar a ocorrência de fungos endoparasitas.

2. Avaliar o efeito da temperatura na capacidade parasitária do fungo endoparasita *Haptaglossa heterospora* "in vitro".

3. Avaliar o potencial destes fungos no controle dos nematóides das galhas (*Meloidogyne* sp).

4. Preparar material básico de estudos de fungos endoparasitas de nematóides, servindo de subsídio a trabalhos posteriores no Brasil.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

O conhecimento dos fungos que atacam nematóides é bastante antigo. O primeiro fungo a ser descrito foi o ectoparasita *Arthrobotrys oligospora*, por Frenesius em 1852, sendo que sua capacidade predatória foi observada somente em 1870 por Woronin. Em 1888, num trabalho clássico, Zopf descreveu a ação das hifas adesivas deste fungo (DUDDINGTON, 1962). Já a primeira espécie de fungo endoparasita, pertencendo ao gênero *Harposporium*, foi descrita em 1874 por Lohde (DUDDINGTON, 1962). Este gênero possui o maior número de espécies parasitas de nematóides, além de ser o mais frequentemente encontrado.

Drechsler dedicou grande parte da sua vida ao estudo dos fungos nematófagos, descrevendo várias espécies novas e publicando valiosos trabalhos no período de 1933 a 1975, contribuindo grandemente para o conhecimento destes organismos (BARRON, 1977). DUDDINGTON (1957), também contribuiu muito, através de extensa revisão sobre o assunto, onde mostra que os fungos que atacam nematóides não são meramente curiosidade científica, mas sim organismos que ocorrem em muitos tipos de

solos e que possuem grande potencial para utilização no controle biológico de fitonematóides.

Os fungos nematófagos de nematóides podem ser divididos em dois grandes grupos quanto à localização das hifas no hospedeiro: os ectoparasitas e os endoparasitas. Os ectoparasitas desenvolvem estruturas de captura de nematóides, incluindo órgãos adesivos e anéis, capazes ou não de realizar constrição quando em contato com o corpo do nematóide. A substância adesiva pode cobrir toda a superfície da hifa ou pode estar restrita a órgãos de captura caracterizados como ramificações, bulbos ou malhas. Os fungos deste grupo possuem extenso crescimento vegetativo no solo.

Contrastando com os ectoparasitas, os fungos endoparasitas não desenvolvem hifas vegetativas externamente ao nematóide parasitado, ocorrendo, em algumas espécies, a formação de tubos de evacuação, para os fungos inferiores, ou conidióforos e conídios para os fungos superiores.

Os endoparasitas encontram-se em diversas classes de fungos. Incluem-se nas seguintes classes, entre outras, as espécies: em Chytridiomycetes, *Catenaria anguillulae* e *Catenaria vermicola*; em Oomycetes, *Haptaglossa heterospora* e *Myzocyttium humicola*; em Zygomycetes, *Meristacrum asterospermum*; em Deuteromycetes, *Meria coniospora*, e diversas espécies do gênero *Harposporium*. Também espécies de *Pythium* e *Phytophthora* têm sido observadas parasitando nematóides (DUDDINGTON, 1962).

A infecção por fungos endoparasitas inicia-se unicamente pelo esporo, sem o auxílio de outras estruturas. Há uma grande variação morfológica dos esporos entre as espécies.



Existem esporos que se aderem ao corpo de nematóide com posterior penetração; aqueles que são ingeridos pelos nematóides, germinando no esófago; e aqueles que, pela ação de flagelos, locomovem-se até o hospedeiro, penetrando através de aberturas naturais, ou mesmo diretamente através da cutícula (BARRON, 1977). Os esporos dos fungos endoparasitas possuem adaptações e especializações para parasitar os nematóides. Alguns fungos inferiores produzem esporos móveis que parecem possuir tropismo positivo em relação ao nematóide. Esporos de *Catenaria anguillulae* acumulam-se com maior frequência nas aberturas naturais dos nematóides, devido à liberação de exsudados, que produzem um gradiente químico (MANKAU, 1980). Entretanto em *Xiphinema* spp. a penetração através dos poros da cutícula é mais frequente (JAFFEE, 1986). A maioria dos esporos imóveis produzidos pelos fungos endoparasitas possui propriedades adesivas, podendo se aderir instantaneamente no nematóide em movimento (MANKAU, 1980). JANSSON & NORDBRING-HERTZ (1983) observaram que os esporos do fungo endoparasita *Meria coniospora* aderiram na região cefálica de fêmeas e machos bem como na cauda de machos do nematóide de vida livre *Panagrellus redivivus*, indicando que os sítios de adesão localizam-se especificamente nos órgãos quimiosensores do nematóide. Em nematóides fitoparasitas, entretanto, a adesão de esporos de *Meria coniospora* ocorreu em toda extensão da cutícula, indicando haver diferenças na composição da cutícula entre nematóides fitoparasitas e de vida livre (JANSSON & NORDBRING-HERTZ, 1983). Os mesmos autores mostraram que o ácido siálico, localizado nas papilas dos nematóides de vida livre e distribuído sobre toda

cutícula dos nematóides fitoparasitas, assume um papel importante no processo de adesão dos conídios. JANSSON et alii (1985a) observaram que, para a germinação do esporo de *M. coniospora*, após sua adesão no nematóide, é imprescindível que a cutícula esteja ligada à epiderme viva. Segundo tais autores, este mesmo fato foi observado também por Nordbring-Hertz et alii (1984), citado por JANSSON et alii (1985a), em se trabalhando com o fungo ectoparasita *Arthrobotrys oligospora* e espécimes mortos do nematóide *Panagrellus redivivus*. JANSSON et alii (1985a), acreditam que a cutícula associada à epiderme viva, desencadeia o processo de indução do enzima colagenase no esporo de *M. coniospora*. Esta enzima é responsável pela degradação da camada primária da cutícula do nematóide, a qual é composta por colágeno.

Os esporos dos fungos endoparasitas que iniciam o processo de infecção no esôfago dos nematóides, após a sua injeção, possuem adaptações morfológicas interessantes. Um grande número de espécies possuem esporos côncavos-convexos, helicoidais, filiformes, etc. A morfologia do esporo, peculiar para cada espécie, tem um significado decisivo para o sucesso biológico da espécie, ajudando-o a se alojar na cavidade bucal ou esôfago do hospedeiro. Esporos de *Harposporium anguillulae* possuem o formato côncavo-convexo, sendo que as extremidades dos mesmos não se situam em um mesmo plano, facilitando a sua penetração por entre as fibras do músculo esofágiano do hospedeiro. Frequentemente o micélio de *Harposporium anguillulae* forma clamidosporos dentro do corpo do nematóide parasitado. Este fato ocorre em infecções velhas, quando algumas células da hifa



tornam-se pigmentadas e com a parede espessa. Os clamidiosporos têm a função de resistir às condições adversas do meio ambiente, produzindo novos conídios quando as condições tornarem-se favoráveis (BARRON 1977).

Outro processo de adaptação de conídio ocorreu, em *Haptaglossa heterospora*. Este fungo endoparasita produz esporos imóveis, em zoosporangios situados dentro do nematóide parasitado, que são liberados para o meio exterior através de pequenos tubos de evacuação (MANKAU, 1980). Os esporos, inicialmente esféricos, sofrem uma série de modificações tornando-se rombóides. Quando o nematóide se aproxima do esporo, pressionando a película de água, ocorre a injeção da partícula infectiva, na forma de partículas cilíndricas, que se alojam entre a hipoderme e o integumento do hospedeiro onde germinam (BARRON, 1977).

A maioria dos fungos endoparasitas de nematóides é parasito obrigatório, dificultando a obtenção de culturas puras. Excessões podem ser encontradas entre os fungos Hyphomycetes endoparasitas, os quais podem crescer em culturas puras tais como as espécies dos gêneros *Acrostalagmus*, *Harposporium* e *Meria*, bem como entre os fungos endoparasitas que formam zoosporos, os quais podem, com dificuldades, ser cultivados em cultura pura, como por exemplo os gêneros *Catenaria*, *Myzocyttium* e *Haptaglossa* (MORGAN-JONES & RODRIGUES-KABANA, 1987).

BRICKLEBANK & COOKE (1969), observaram que *Nematoctonus haptocladus* e *N. concurrens* cresceram bem na presença de glicogênio e quitina, polissacarídeos que abundam nos nematóides.

Os mesmos autores observaram também que as duas espécies de *Nematoctonus* surpreendentemente cresceram bem na presença de celulose e amido, e não possuem requerimento especial para vitaminas. Resultados similares foram observados por COOKE (1977) em se trabalhando com *Harposporium anguillulae*, indicando que este fungo também pode crescer na presença de vários carboidratos, incluindo polissacarídeos. Estes resultados indicam que a fisiologia dos fungos endoparasitas deve ser bastante diferente daquela dos 'fungos ectoparasitas, pois todas as espécies ectoparasitas estudadas requerem tiamina, e algumas vezes biotina, para o crescimento (Cooke, 1968, citado por BRICKLEBANK & COOKE, 1969). COOKE (1977) sugere que os fungos endoparasitas, em razão da sua inabilidade em competir com outros microorganismos de solo, não se especializaram nutricionalmente, o mesmo não acontecendo com os ectoparasitas. O pequeno crescimento micelial externo ao nematóide parasitado pode estar relacionado com a baixa capacidade de competição dos fungos endoparasitas.

Os fungos endoparasitas ocorrem em todos os tipos de solos, tanto nos cultivados quanto nos naturais (BARRON, 1977). Algumas espécies possuem uma distribuição geográfica mais ampla, como *Harposporium anguillulae*, *Meria coniospora* e *Catenaria anguillulae* (BARRON, 1977).

A maioria dos estudos sobre a ocorrência de fungos endoparasitas de nematóides foi realizada em regiões temperadas. Segundo BUCARO (1983), a diversidade de espécies destes organismos é maior em regiões tropicais. A autora identificou, em poucas amostras procedentes de El Salvador, maior diversidade de



espécies de fungos ectoparasitas e endoparasitas de nematóides, se comparado a resultados obtidos em regiões temperadas.

Existem vários métodos de isolamentos de fungos endoparasitas de nematóides à partir de amostras de solo. Para a extração de endoparasitas, o método deve ser específico para o grupo já que o pujante crescimento micelial e a agressividade dos fungos ectoparasitas podem impedir a infecção dos nematóides-isca por fungos endoparasitas (BARRON, 1977). Segundo McCulloch (1977) citado por BUCARO (1983), o método de extração também pode contribuir para o recolhimento de maior número de espécies. Inicialmente os fungos endoparasitas e ectoparasitas foram isolados através da técnica de espalhamento de solo, desenvolvida por Drechsler em 1941 (BARRON, 1977). Desta forma adicionava-se às placas de Petri, contendo o meio Agar-fubá, um material orgânico rico em nematóides de vida livre, promovendo desta forma a sequência natural dos eventos biológicos envolvidos na degradação da matéria orgânica, aumentando portanto a densidade populacional dos nematóides de vida livre e dos fungos ectoparasitas e endoparasitas destes organismos presentes na amostra. Este método contudo privilegiou o surgimento de ectoparasitas, mais agressivos, em detrimento aos endoparasitas, entretanto, permitiu a observação dos eventos biológicos em ambiente bem mais próximo ao natural. BARRON (1977) modificou tal técnica adicionando à placa de petri com o meio Agar-fubá ou ágar-água 2%, uma grande quantidade de nematóides-isca e 0,5-1g de solo ou material orgânico. A semelhança do método anterior, neste método modificado as placas foram também examinadas diariamente com o auxílio do microscópio estereoscópio, e os

nematóides parasitados retirados para a identificação do fungo. Contudo esta técnica modificada ainda possui o inconveniente de suprimir o aparecimento de fungos endoparasitas.

BARRON (1969) desenvolveu a técnica de centrifugação diferencial, a qual se baseou no fato de que os esporos das espécies de fungos endoparasitas de nematóides são menores e mais leves se comparados àqueles das espécies de fungos ectoparasitas. Os fungos foram recuperados a partir do "pelet" obtido através da centrifugação, dicionando-se nematóides-isca. O desenvolvimento desta técnica facilitou o estudo de fungos endoparasitas e ectoparasitas de nematóides, possibilitando a quantificação destes organismos no solo (DACKMAN et alii, 1987). Entretanto, esta técnica ainda apresenta algumas limitações, pois não recolhe os esporos dos fungos inferiores. Portanto os fungos das classes Chytridiomycetes, Oomycetes e Zygomycetes não são extraídos do solo utilizando-se a referida técnica (BARRON, 1977).

A técnica do funil de Baermann foi proposta por GIUMA & COOKE (1974) para o estudo dos fungos endoparasitas, permitindo a inspeção de populações de nematóides (BARRON, 1977). O funil de Baermann é comumente empregado por nematologistas para recolher nematóides a partir de amostra de solo. A utilização desta técnica para o estudo dos endoparasitas baseou-se no fato de que, na natureza os nematóides que se encontram nos primeiros estágios da infecção podem migrar através do papel poroso, da amostra de solo depositada na parte superior do funil para a água. Tais nematóides são recolhidos, juntamente com uma alíquota de água e inspeccionados diariamente. Aqueles que demonstrarem sinais do parasita são retirados para a identificação do agente causal.

Este método permite o recolhimento de grande número de espécies de fungos endoparasitas (BARRON, 1977).

Existem possibilidades de sucesso na utilização prática de fungos endoparasitas no controle de fitonematóides. De fato KERRY & CRUMP (1977) observaram algumas espécies de fungos parasitando fêmeas e ovos de diversas espécies de nematóides formadores de cistos, em condições naturais, onde *Verticillium clamydosporium* foi a espécie encontrada com maior frequência. Segundo tais autores *V. clamydosporium* pode atacar ovos de nematóides em todos os estágios de desenvolvimento. Em laboratório, ovos contendo larvas do segundo estágio foram destruídos por *V. clamydosporium* em quatro dias a 19°C quando inoculado em meio ágar-água, (KERRY & CRUMP, 1977).

KERRY (1980) constatou a presença do fungo endoparasita *Nematophthora gynophila* parasitando grande número de fêmeas e ovos de nematóides no sul da Inglaterra. *N. gynophila* infectou fêmeas de nematóides através dos esporos biflagelados quando estas se encontravam nas raízes da planta, (KERRY, 1980). O autor comprovou, após vários testes utilizando-se formalina, que o fungo *N. gynophila* reduziu naturalmente a população do nematóide *Heterodera avenae*. Quando o solo foi tratado com formalina, a qual eliminou o fungo, a população do nematóide aumentou significativamente. A umidade do solo constitui condição limitante, já que os zoosporos produzidos por *N. gynophila* necessitam de água para se locomoverem até o hospedeiro. O efeito da umidade foi constatado em vasos. Naqueles com a umidade normal ocorreu maior taxa de parasitismo quando comparado com aqueles com déficit hídrico (KERRY et alii, 1980).

KERRY & MULLEN (1981) estudaram a patogenicidade dos fungos endoparasitas *Nematophthora gynophila*, *Catenaria auxiliaris* e uma espécie não identificada, a algumas espécies de nematóides. Todas as espécies dos fungos testadas parasitaram fêmeas do nematóide *Heterodera glycines*. *N. gynophila* foi encontrada parasitando ovos de *Meloidogyne acronea*, sendo esta a primeira observação do parasitismo deste fungo em nematóides não pertencentes ao gênero *Heterodera* (KERRY & MULLEN, 1981). *Meloidogyne javanica* e *M. incognita* não foram parasitadas pelas espécies dos fungos testados, pois as fêmeas destas espécies de nematóides encontravam-se protegidas por se localizarem dentro de galhas formadas no sistema radicular da planta hospedeira. Desta forma *Meloidogyne acronea* foi parasitada porque, em raízes de sorgo, as fêmeas ficam expostas (KERRY & MULLEN, 1981).

DHAWAN (1985) estudou o modo de infecção e ciclo de vida de *Catenaria vermicola* em larvas de *Heterodera avenae*. De acordo com o autor, a natureza polifágica deste fungo foi responsável pela sua perpetuação na natureza. Esporos de resistência e zoosporangios no interior dos ovos do nematóide permitiram a sobrevivência de *Catenaria vermicola* em condições adversas (DHAWAN, 1985).

Fungos endoparasitas que formam zoosporos também foram encontrados parasitando *Xiphinema rivesi* e *Xiphinema americanum* (JAFFEE, 1986). *Catenaria anguillulae* foi mais frequentemente encontrada, embora o autor não tenha observado o parasitismo em nematóides da ordem Tylenchida. Boosalis & Mankau (1965) citados por JAFFEE (1986) observaram que nematóides da ordem Dorylaimida foram mais susceptíveis a fungos que formam zoosporos do que



aqueles da ordem Tylenchida. *Lagenidium caudatum*, *Aphanomyces* sp, *Lepitogonia* sp e *Catenaria anguillulae*, observados parasitando *X. americanum* e *X. rivesi*, possuem um grande número de hospedeiros (JAFFEE, 1986).

GIUMA & COOKE (1974) testaram o potencial do fungo *Nematoctonus concurrens* e *N. haptocladus* para a utilização em controle biológico de nematóides fitoparasitas. Os esporos germinam formando órgãos adesivos que se fixam aos nematóides matando-os rapidamente. Segundo o autor, compostos nematotóxicos são secretados, os quais são responsáveis pela rápida morte dos hospedeiros. Observou-se que após a penetração e colonização do nematóide pelas hifas do fungo, ocorreu o desenvolvimento de hifas externas, que produziram os esporos adesivos. Estas hifas também podem capturar nematóide, já que possuem regiões adesivas (GIUMA E COOKE, 1974). Este processo se assemelha à forma de captura de nematóides por fungos ectoparasitas. Assim fungos do gênero *Nematoctonus* possuem características de endoparasitas e ectoparasitas. GIUMA & COOKE, (1974) observaram que a adição de esporos de *Nematoctonus* ao solo não estéril para o controle de nematóides não mostrou resultados satisfatórios devido a severos efeitos líticos e micostáticos induzidos por outros fungos de solo. Cooke (1968) citado por KERRY (1980) demonstrou a pequena chance de uma espécie ectoparasita alienígena de se estabelecer em um solo, pois esta teria que colonizá-lo rapidamente, competindo com fungos saprófitas e antagonistas. Os autores comprovaram esta afirmação adicionando esporos de *Nematoctonus* e nematóides a um solo estéril, obtendo assim ótimo controle da população de nematóides (GIUMA & COOKE, 1974).

EAYRE et alii (1987), demonstraram que *Hirsutella rhossiliensis* suprimiu, em casa de vegetação, o crescimento da população do nematóide *Criconebella xenoplax* em plântulas de pessegueiro. Entretanto não foi obtida a redução da população deste nematóide a níveis abaixo do limiar de prejuízo.

JANSSON et alii (1985b), estudaram o efeito do fungo endoparasita *Meria coniospora* em algumas espécies do nematóide do gênero *Meloidogyne*. Sabe-se que *Meria coniospora* infecta um grande número de espécies de nematóides através de esporos adesivos. Ao contrário da maioria dos fungos endoparasitas, que são parasitos obrigatórios, *Meria coniospora* cresce facilmente em meios comuns de laboratório, produzindo grande quantidade de esporos (JANSSON et alii, 1985b). Em vasos, os autores constataram uma significativa redução de galhas causadas por *Meloidogyne javanica* quando foram adicionados esporos acima da concentração de  $10^5$  conídios/250 cm<sup>3</sup> de solo. A introdução do fungo no solo foi feita por adição de nematóides da espécie *Panagrellus redivivus* infectados ou por adição de esporos, sendo que não houve diferenças entre os dois métodos no parasitismo de *Meloidogyne javanica*. A redução do número de galhas causadas por *Meloidogyne incognita* pelo fungo *M. coniospora* foi estatisticamente igual ao tratamento com o nematicida Aldicarbe, na concentração de 15 mg i.a./250 cm<sup>3</sup> de solo. Segundo os autores, em solos não estéreis o efeito de *M. coniosporos* foi levemente menor do que em solos estéreis, indicando um possível envolvimento de propriedades fungistáticas do solo (JANSSON et alii 1985b).

Desconhecem-se trabalhos visando o controle biológico de fitonematóides utilizando-se o fungo endoparasita *Haptaglossa heterospora*, bem como trabalhos relativos ao efeito da temperatura sobre a capacidade parasitária deste fungo, fator que pode limitar a distribuição geográfica da espécie.

### 3. MATERIAL E METODOS

3.1. Ocorrência, isolamento, identificação e caracterização morfológica de fungos endoparasitas na região de Lavras e São Sebastião do Paraíso.

3.1.1. Obtenção e manutenção do nematóide-isca *Panagrellus redivivus* e *Caenorhabditis elegans*

*Panagrellus redivivus* e *Caenorhabditis elegans* foram obtidos do laboratório de Nematologia da Universidade de Bonn (Alemanha Ocidental). Tais nematóides foram multiplicados em placas de Petri, com o meio Miluvit 0,3% (cereal utilizado na alimentação de crianças) em ágar 2% e esterilizado a 120°C por 20 minutos. As placas foram mantidas a 20°C.

3.1.2. Obtenção de *Xiphinema* sp.

Coletou-se amostra de solo sob mata pertencente ao Departamento de Engenharia Florestal da ESAL, a qual foi suspensa



em água e agitada por 10 minutos. Em seguida passou-se a suspensão em peneiras de 0,810mm e 0,149mm e os nematóides que ficaram retidos na peneira de 0,149mm, foram mantidos em geladeira para a realização dos ensaios.

### 3.1.3. Isolamento de fungos endoparasitas de nematóides

Foram coletadas 15 amostras de solo em diferentes ecossistemas. Do total, 5 foram obtidas de mata natural, 5 de culturas perenes (café e citros) e 5 em solos com atividades olerícolas.

A extração de esporos de fungos endoparasitas em cada amostra de solo foi feita utilizando-se a técnica de centrifugação diferencial (BARRON, 1969) e a do funil de Baerman, proposta por GIUMA & COOKE (1974). Utilizou-se as 2 técnicas diferentes em cada amostra devido à limitação da primeira no recolhimento de fungos inferiores (classes Chytridiomicetes, Oomycetes e Zygomycetes) (BARRON, 1977). Modificações na técnica de centrifugação diferencial e do funil de Baerman foram feitas para a adaptação de equipamentos.

#### 3.1.3.1. Técnica da centrifugação (BARRON, 1969) modificada

Amostra de 150g de solo foi suspensa em água, completando-se o volume para 350ml e agitada por 10 minutos. Em seguida passou-se em peneira de 0,810mm lavando-se o material retido com mais ou menos 500ml de água. O volume coletado de

aproximadamente 800ml foi passado na peneira de 0,250mm e o material retido lavado com 400ml de água. A suspensão obtida foi novamente agitada por 10 minutos e passada agora na peneira de 0,044mm, e os detritos lavados com 600 ml de água. O volume total coletado (aproximadamente 2.400 ml) foi centrifugado por 2 minutos a 680g. O sobrenadante foi coletado e novamente centrifugado a 1.172g por 1 hora. A seguir o precipitado obtido foi distribuído em forma de cruz, para facilitar a visualização dos nematóides parasitados, em placas de Petri com ágar-água 2%, empregando-se a câmara de fluxo laminar. Aproximadamente 5.000 nematóides-isca *Panagrellus redivivus* foram adicionados a cada placa de Petri e mantidos a 20°C. Observações sobre os nematóides parasitados foram realizadas durante 20 dias, a intervalos de 24 hs. Tais nematóides foram retirados e os fungos mantidos em população de *Panagrellus redivivus* para posterior identificação.

As modificações na técnica original constaram de alterações na velocidade e no tempo de centrifugação. BARRON (1969) utilizou 4400 rpm por 1 hora. Entretanto NICOLAY & SIKORA (1988) obtiveram ótimos resultados centrifugando a 4060g por 30 minutos.

#### 3.1.3.2. Técnica do funil de Baerman (GIUMA & COOKE, 1972) modificada

Amostra de solo de 200g foi agitada em 400ml de água, por 5 min. Em seguida a suspensão foi passada nas peneiras de 0,810, 0,250 e 0,037mm, lavando-as com água em abundância. O material retido na peneira de 0,037mm foi depositado em funil de

Baerman com água destilada. Após 48 horas recolheu-se uma aliquota de 10ml que foi concentrada por decantação, deixando-se 2 horas em repouso. Cinco ml do sobrenadante foi eliminado e o precipitado, juntamente com 5ml de água destilada, foi incubado a 20°C durante 4 dias. Observações foram feitas a intervalos de 24 horas. Os nematóides parasitados foram retirados para multiplicação do fungo em população do nematóide *Xiphinema* sp, uma vez que *Panagrellus redivivus* não se mostrou bom hospedeiro de *Catenaria* sp. Após a multiplicação dos fungos, procedeu-se então a identificação. Entretanto pelo método de GIUMA & COOKE (1974), a suspensão de nematóides obtida através do funil de Baerman em 10 g de solo foi concentrada em centrifuga a 1000rpm e suspensa em água destilada, para depois ser incubada por 4 dias. Após este período a suspensão foi novamente concentrada e adicionada a placas de Petri com ágar-fubá 2%. As placas mantidas à temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  foram observadas frequentemente para se identificar a espécie do fungo endoparasita presente.

#### 3.1.4. Identificação das espécies dos fungos endoparasitas de nematóides isoladas de diferentes ecossistemas da região de Lavras e São Sebastião do Paraíso

Observada a presença de fungo parasitando o nematóide foram então realizadas preparações microscópicas dos nematóides parasitados. Desta forma estes foram transferidos para uma lâmina contendo uma gota de Azul de Trepan mais Lactofenol e cobertos com laminula. Os bordos foram selados com Permunt e as lâminas

levadas ao microscópio para observações. De acordo com as estruturas reprodutivas procedeu-se a identificação utilizando a chave de classificação de COOKE & GODFREY (1964). De algumas estruturas foram obtidas fotomicrografias e desenhos esquemáticos.

### 3.2. Efeito da temperatura na capacidade parasitária de *Haptaglossa heterospora* Drechsler 1940, "in vitro"

O fungo endoparasita *Haptaglossa heterospora*, obtido a partir de amostra de solo sob café na região de Lavras MG, se mostrou eficaz no controle biológico de nematóides nos testes preliminares. Desta forma procurou-se estudar o efeito da temperatura sobre este fungo, obtendo-se assim informações importantes para implantação de outros testes. Este fungo foi mantido em cultura xênica, em *Panagrellus redivivus*, no meio ágar 2%. A obtenção e manutenção de *Panagrellus redivivus* estão descrito em 3.1.1.

O experimento foi desenvolvido em placas de Petri de 9cm de diâmetro contendo ágar-água na quantidade de 20ml por placa. Foram realizados seis tratamentos constando das seguintes temperaturas: 15°C, 20°C, 23°C, 25°C, 27°C e 30°C.

O inóculo foi produzido em 60 placas de Petri contendo uma camada de ágar-água 2% onde se colocaram inicialmente 4 *Panagrellus redivivus* infectados por *Haptaglossa heterospora*/placa. Em seguida adicionaram-se 3.000 nematóides *Panagrellus redivivus* não infectados/placa, que foram parasitados e mortos por *H. heterospora*. Os nematóides mortos liberaram



grande quantidade de esporos que cobriu uniformemente a superfície do ágar em todas as placas inoculadas. Desta forma o inóculo estava pronto para o ensaio. Para este ensaio utilizaram-se 3.000 nematóides *Panagrellus redivivus* não infectados, os quais foram novamente adicionados à cada placa de Petri. Em seguida separaram-se ao acaso 10 placas de Petri para cada tratamento (item 3.5.1) que foram distribuídas aleatoriamente nas incubadoras. A leitura dos nematóides parasitados foi feita a intervalos de 24 horas.

3.3. Capacidade parasitária de *Haptaglossa heterospora* Drecheler, 1940 a diferentes espécies de nematóides, "in vitro"

O fungo endoparasita *Haptaglossa heterospora* Dreschler, 1940, foi mantido como descrito em 3.2.

Os nematóides hospedeiros de *H. heterospora*, como *Panagrellus redivivus* (L.) Goodey e *Caenorhabditis elegans*, foram obtidos e multiplicados conforme descrito em 3.1.1.

Os nematóides fitoparasitas foram obtidos do Laboratório de Nematologia do Departamento de Fitossanidade da Escola Superior de Agricultura de Lavras MG.

*Meloidogyne incognita* (Kofoid and White, 1919) Chitwood, 1949, foi multiplicado em tomateiro Santa Cruz por 3 meses. Já *Meloidogyne exigua* Goeldi, 1887 foi multiplicado em cafeeiro Catuaí. *Ditylenchus dipsaci* (Kuhn, 1857) Filipjev, 1936, foi extraído de bulbos de alho "Lavinia" provenientes do norte do Paraná. Ovos de *Meloidogyne incognita* e *M. exigua* foram extraídos

a partir do tomateiro e cafeeiro, respectivamente, pesando-se 200 g de raiz com muitas galhas e picando-as em pedaços de 0,5 cm. Agitou-se durante um minuto em liquidificador com hipoclorito de sódio 0,5% e passou-se em peneiras de 0,074 e 0,001mm. (TAYLOR & SASSER, 1978). Os ovos foram coletados na peneira de 0,001mm e colocados em câmaras de eclosão. Após 48 horas as larvas foram coletadas e quantificadas com o auxílio do microscópio estereoscópio.

*Ditylenchus dipsaci* (Kuhn, 1857) Filipjev, 1936 foi extraído de bulbos de alho "Lavinia" provenientes do norte do Pará. Para sua extração três bulbos de alho foram descascados, colocados no liquidificador com 100 ml de água e agitados por 5 segundos. Todo o material foi passado em peneiras de 0,250 e 0,044mm. A massa dos bulbos ficou retida na peneira de 0,250mm e os nematóides na peneira de 0,044mm. Com jatos de água os nematóides foram retirados da peneira de 0,044mm e colocados em becker de 150 ml.

O Experimento foi desenvolvido em placas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo ágar-água 2% na proporção de 20 ml por placa. Foram realizados cinco tratamentos constando dos seguintes nematóides - hospedeiros nas concentrações por placa: 5000 *Panagrellus redivivus*, 5000 *Caenorhabditis elegans*, 2500 larvas do segundo estágio (L2) de *Meloidogyne incognita*, 3000 larvas do segundo estágio (L2) de *Meloidogyne exigua*, 1500 *Ditylenchus dipsaci*.

O inóculo foi obtido em 40 placas de Petri como descrito em 3.2.

Ao acaso separaram-se 8 placas para cada tratamento

onde foram adicionados os nematóides nas concentrações indicadas. As placas foram mantidas em estufa incubadora à temperatura de 23-25°C. A leitura do número de nematóides parasitados foi feita a intervalo de 24 horas. As observações sobre o ciclo de vida de *H. heterospora* foram feitas em intervalos de 3 horas, quando se obteve também fotografias.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

##### 4.1. Ocorrência, isolamento e identificação de fungos endoparasitas na região de Lavras e São Sebastião do Paraíso

Seis espécies de fungos endoparasitas de nematóides foram obtidos a partir de amostras de solo provenientes de diferentes ecossistemas do sul de Minas. A classificação destas espécies foi feita com o auxílio da chave de COOKE & GODFREY (1964) após as observações morfológicas e mensuração de algumas estruturas no microscópio de contraste de fase. Contudo não foi possível classificar *Catenária* sp. a nível de espécie.

*Catenaria* sp foi isolada utilizando-se a Técnica do Funil de Baerman modificada. As demais espécies foram isoladas utilizando-se a técnica da Centrifugação diferencial modificada.



TABELA 1 - Fungos endoparasitas isolados de nematóides a partir de amostras de solo da região de Lavras e São Sebastião do Paraíso. ESAL - Lavras - MG 1990.

Amostras	Ecossistema	Localidades	Fungos presentes
1	Floresta	Ijaci	<i>Harposporium anguillulae</i>
2	Floresta	Lavras	<i>Harposporium anguillulae</i>
3	Floresta	Lavras	<i>Catenaria</i> sp <i>Harposporium anguillulae</i>
4	Floresta	Carrancas	<i>Harposporium helicoides</i> <i>Harposporium bysmatosporum</i> <i>Harposporium anguillulae</i>
5	Floresta	Itumirim	<i>Catenaria</i> sp.
6	Cultura Perene (café)	Ingai	<i>Harposporium anguillulae</i> <i>Harposporium crassum</i>
7	Cultura Perene (café)	Lavras	<i>Harposporium crassum</i> <i>Harposporium bysmatosporum</i> <i>Haptaglossa heterospora</i>
8	Cultura Perene (citros)	Lavras	<i>Harposporium crassum</i>
9	Cultura Perene (café)	Lavras	<i>Harposporium crassum</i> <i>Harposporium bysmatosporum</i>
10	Cultura Perene (café)	São Sebastião do Paraíso	<i>Harposporium anguillulae</i>
11	Olerícolas	Lavras	<i>Catenaria</i> sp.
12	Olerícolas	Lavras	<i>Harposporium anguillulae</i>

Amostras	Ecossistema	Localidades	Fungos presentes
13	Olerícolas	Lavras	<i>Harposporium anguillulae</i> <i>Haptaglossa heterospora</i>
14	Olerícolas	São Sebastião do Paraíso	-
15	Olerícolas	São Sebastião do Paraíso	<i>Catenaria</i> sp. <i>Harposporium anguillulae</i>

Os ecossistemas estudados não afetaram a ocorrência de fungos endoparasitas, resultados que concordam com BARRON (1977) e BUCARO (1983).

Apesar da comparação das técnicas empregadas não constituir objetivo deste trabalho, observou-se, contudo, que a centrifugação diferencial modificada proporcionou o isolamento de maior número de espécies dos fungos endoparasitas dos nematóides do que o funil de Baerman. Esta observação não concorda com aquelas de BARRON (1977), quando comenta sobre o isolamento de maior número das espécies através da técnica do funil de Baerman. Utilizando-se esta técnica somente o fungo *Catenaria* sp. foi isolado, sendo que o restante das espécies foram isoladas através da centrifugação diferencial modificada, incluindo *Haptaglossa heterospora*, fungo inferior da classe Oomycetes. Contudo BARRON (1977), afirma que através do referido método não foi possível isolar fungos inferiores das (classes Oomycetes, Chytridiomycetes e Zygomycetes).

TABELA 2 - Frequência de 06 espécies de fungos endoparasitas de nematóides em solos sob florestas, olericultura e culturas perenes na região de Lavras e São Sebastião do Paraíso. ESAL - Lavras - MG 1990.

	Floresta	olerícolas	culturas perenes	total
<i>Catenaria</i> sp.	1	2	-	3
<i>Haptaglossa heterospora</i>	-	1	1	2
<i>Harposporium anguillulae</i>	4	3	2	9
<i>Harposporium bysmatosporum</i>	1	-	2	3
<i>Harposporium crassum</i>	-	-	4	4
<i>Harposporium helicoides</i>	1	-	-	1
Total	7	6	9	22

*Meria coniospora*, espécie de fungo endoparasita de nematóides, não foi isolada no presente trabalho, embora a referida espécie tenha sido isolada frequentemente por alguns pesquisadores (BARRON, 1977; GRAY, 1984). Entretanto no trabalho realizado por BUCARO (1983), em El Salvador, país também tropical, *M. coniospora* não foi isolada nas várias amostragens de solo realizadas. Talvez a intensa atividade microbiana nos solos amostrados possa ter suprimido o estabelecimento de *M. coniospora*. Dessa forma mais estudos em solos tropicais serão necessários para elucidar tal fato.

*Panagrellus redivivus* se mostrou um excelente nematóide-isca para fungos endoparasitas, o que concorda com a observação de GRAY ( 1983), quando relatou que grande número de espécies de fungos endoparasitas de nematóides parasitaram eficientemente *Panagrellus redivivus*.

4.2. Caracterização morfológica das espécies de fungos endoparasitas de nematóides isolados de diferentes ecossistemas na região de Lavras e São Sebastião do Paraíso.

4.2.1. *Catenaria* sp.

*Catenaria* sp pertence à classe Chytridiomycetes. Observações realizadas nos isolados obtidos a partir de amostras da região de Lavras e São Sebastião do Paraíso mostraram que os zoosporos produzidos por *Catenaria* sp. são diferenciados nos zoosporângios situados no interior do corpo do nematóide parasitado (Figura 1A) e escapam para o exterior através de um tubo de evacuação. Este tubo é curto, mas em condições de ressecamento pode se tornar comprido e tortuoso (BARRON, 1977). Os zoosporos observados nos isolados apresentaram-se uniflagelados, nadando através do tubo de evacuação, impulsionados pelo flagelo, para alcançar o exterior.

Observou-se também nos isolados trabalhados que os zoosporos de *Catenária* foram capazes de realizar movimentos direcionados ao hospedeiro e aglutinaram-se nas aberturas naturais (Figura 1C). De fato os exudatos liberados pelos

nematóides através das aberturas naturais (Boosalis & Mankau, 1965 citados por BARRON, (1977) produzem um gradiente químico que direcionam os zoosporos (BARRON, 1977). Uma vez alcançado o nematóide, tais zoosporos encistam-se preferencialmente nas aberturas naturais (MANKAU, 1980). JAFFEE (1986) observou, entretanto, que os zoosporos de *Catenaria anguillulae* encistavam-se principalmente próximo ao estilete e esôfago de *Xiphinema* sp. Nos isolados estudados observou-se a produção de esporângios alongados no interior do corpo do nematóide parasitado e hifas vegetativas conectando tais estruturas reprodutivas (Figura 1B). De fato BARRON (1977) relatou que após a formação do cisto o fungo produz um tubo germinativo que penetra no corpo do hospedeiro através de uma abertura natural ou mesmo diretamente através da cutícula. Hifas assimilativas crescem no interior do nematóide parasitado e produzem esporângios, separados por dois ou mais septos, onde os esporos são diferenciados (BARRON, 1977). A espécie de *Catenaria* estudada não parasitou *Panagrellus redivivus*. *Helicotylenchus* sp. foi parasitado somente quando se encontrava morto. Contudo foi agressiva no parasitismo de *Xiphinema* sp.

BARRON, 1977 isolou *Catenaria anguillulae* em 90% das amostras de solo recolhidas em Ontário-Canadá. Segundo o autor a referida espécie é bastante comum e possui ampla distribuição geográfica, parasitando grande número de nematóides.



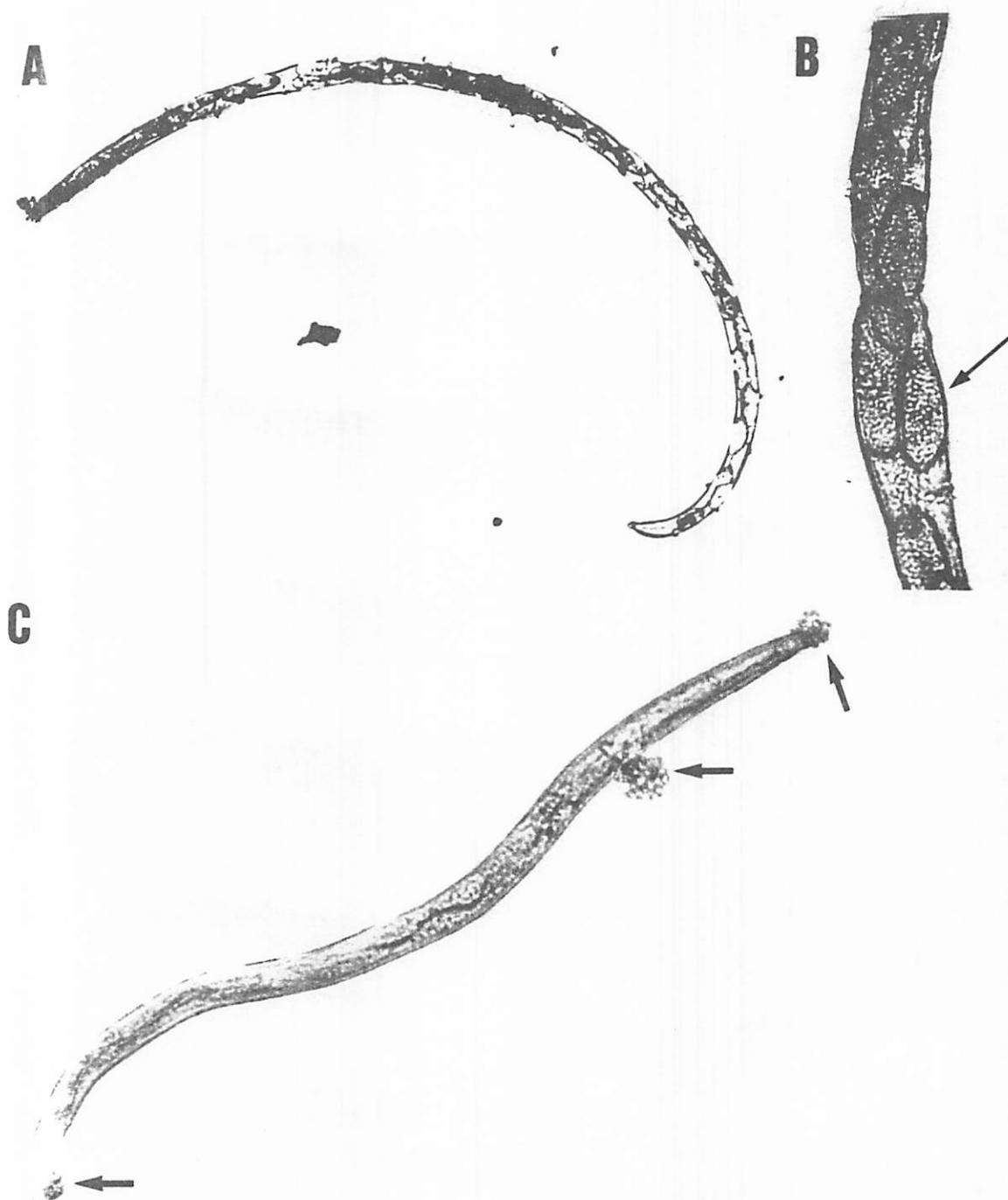


Figura 1 - Fotomicrografia de *Xiphinema* sp. parasitado por *Catenaria* sp. A: Visão geral do nematóide parasitado (100 x) mostrando os esporângios do fungo no interior do seu corpo. B: Detalhe (400 x), do esporângio. C: Esporos encistados nas aberturas naturais do nematóide. ESAL - Lavras MG - 1990.

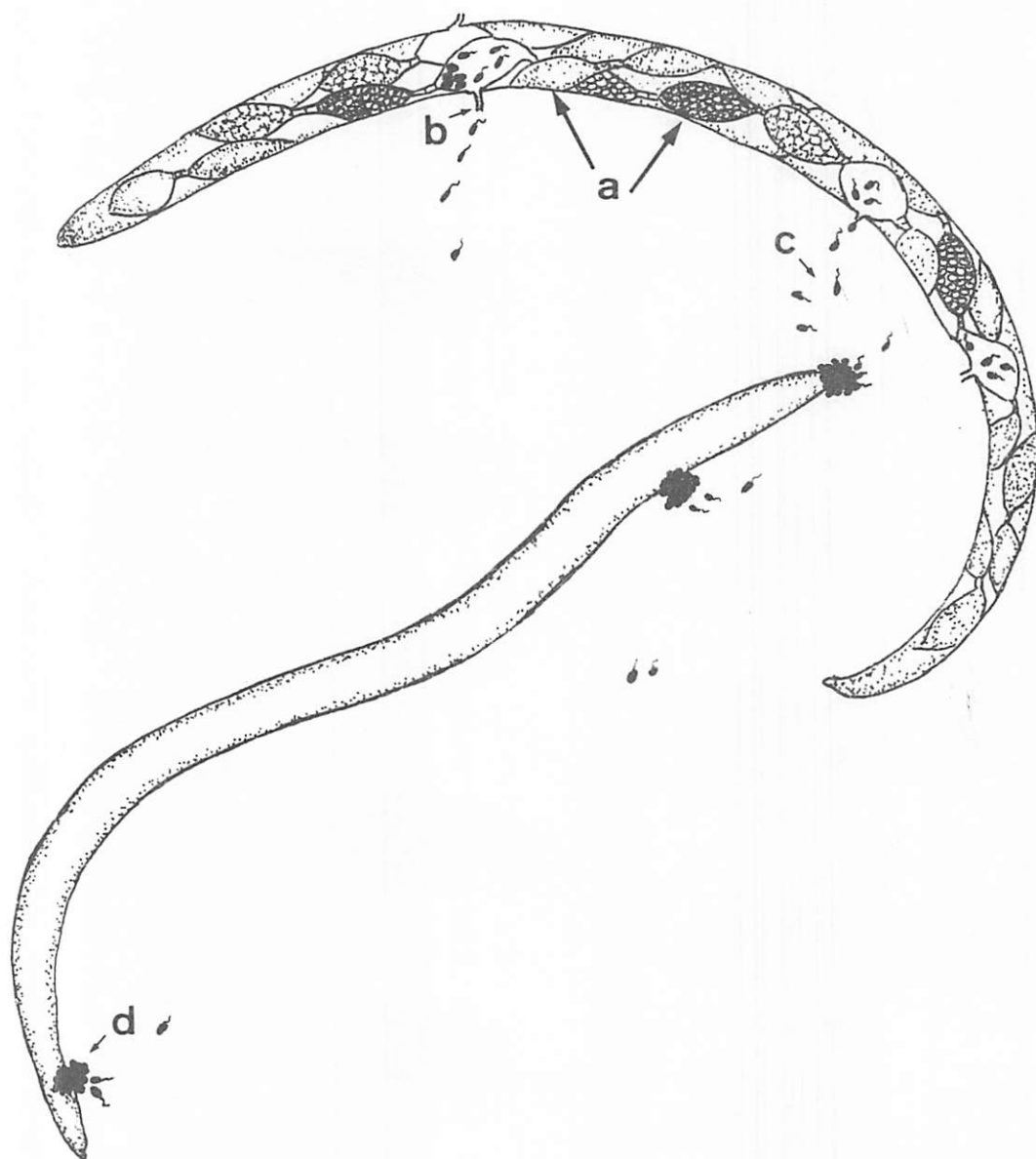


Figura 2 - Desenho esquemático de nematóides parasitados por *Catenaria* sp. A: esporângios no interior do nematóe parasitado, B: tubos de evacuação do esporângio, C: esporos uniflagelados nadando em direção ao novo hospedeiro, D: esporos encistados nas aberturas naturais do novo hospedeiro. ESAL - Lavras MG - 1990.

#### 4.2.2. *Haptaglossa heterospora* Drechsler 1940

Observações realizadas nos nematóides infectados colhidos na região de Lavras (Figura 3A) demonstraram que o fungo observado produz nestes hospedeiros um ou vários talos holocárpicos (Figura 2A) os quais liberam para o exterior esporos primários, imóveis e inicialmente cilíndricos (Figura 3Bc) através de pequenos tubos de evacuação. O esporo primário germina e produz o esporo secundário imóvel, com formato rambóide (Figura 3Bc). Dessa forma trata-se da espécie *Haptaglossa heterospora*, a qual possui uma ampla distribuição geográfica, ocorrendo em solos cultivados, sob florestas e mesmo em casa de vegetação (DAVIDSON & BARRON, 1973). Este fungo foi descoberto por Drechsler em 1940 parasitando uma grande quantidade de espécies de nematóides nos Estados Unidos da América. Entretanto a sua presença já foi observada na Inglaterra, Dinamarca e Canadá (Quebec) (DAVIDSON & BARRON, 1973). As observações morfológicas realizadas concordam com DAVIDSON & BARRON (1973). Tais autores comentam ainda que o esporo primário não se destaca do secundário, embora ocorra a migração do citoplasma do primeiro para o segundo. Em uma das extremidades do esporo secundário forma-se uma estrutura semelhante a uma língua, envolvida no processo de infecção. A forma de infecção de *H. heterospora* é bastante sofisticada. O nematóide em movimento pressiona o esporo primário, que faz com que o protoplasma localizado no esporo secundário seja descarregado, em forma de partícula infectiva, atingindo o nematóide (DAVIDSON & BARRON, 1973). Nos testes realizados com *H. heterospora* isolado na região de Lavras

observou-se que nematóides contorciam-se ao movimentarem-se quando colocados junto a uma grande quantidade de esporos deste fungo, sobre o meio ágar-água 2%. Observações mais detalhadas mostraram algumas partículas infectivas cilíndricas sob a cutícula dos nematóides (Figura 3Bc), concordando com observações de DAVIDSON & BARRON (1973).

O número de esporângios, ou talos holocárpicos, formados em cada nematóide parasitado, nos testes realizados no laboratório de nematologia do Departamento de Fitossanidade da ESAL, foi muito variado, podendo talvez estar relacionado com o número de infecções sofridas pelo nematóide. A maioria dos esporângios foi formada na região cefálica, onde parece ocorrer maior número de infecções. Observação também realizada por DAVIDSON & BARRON (1973).

*H. heterospora* não infectou ovos no interior de fêmeas de nematóides *Panagrellus redivivus* nem de *Caenorhabditis elegans* parasitados. Isto pode estar relacionado com a incapacidade deste fungo em degradar quitina, polissacarídeo presente na casca dos ovos de nematóides, justificando estudos neste sentido. A cutícula, constituída de quitina, também não foi degradada.

Desconhecem-se trabalhos sobre a viabilidade prática de *H. heterospora* no controle biológico de fitonematóides, entretanto este fungo parece apresentar alto potencial para este fim.

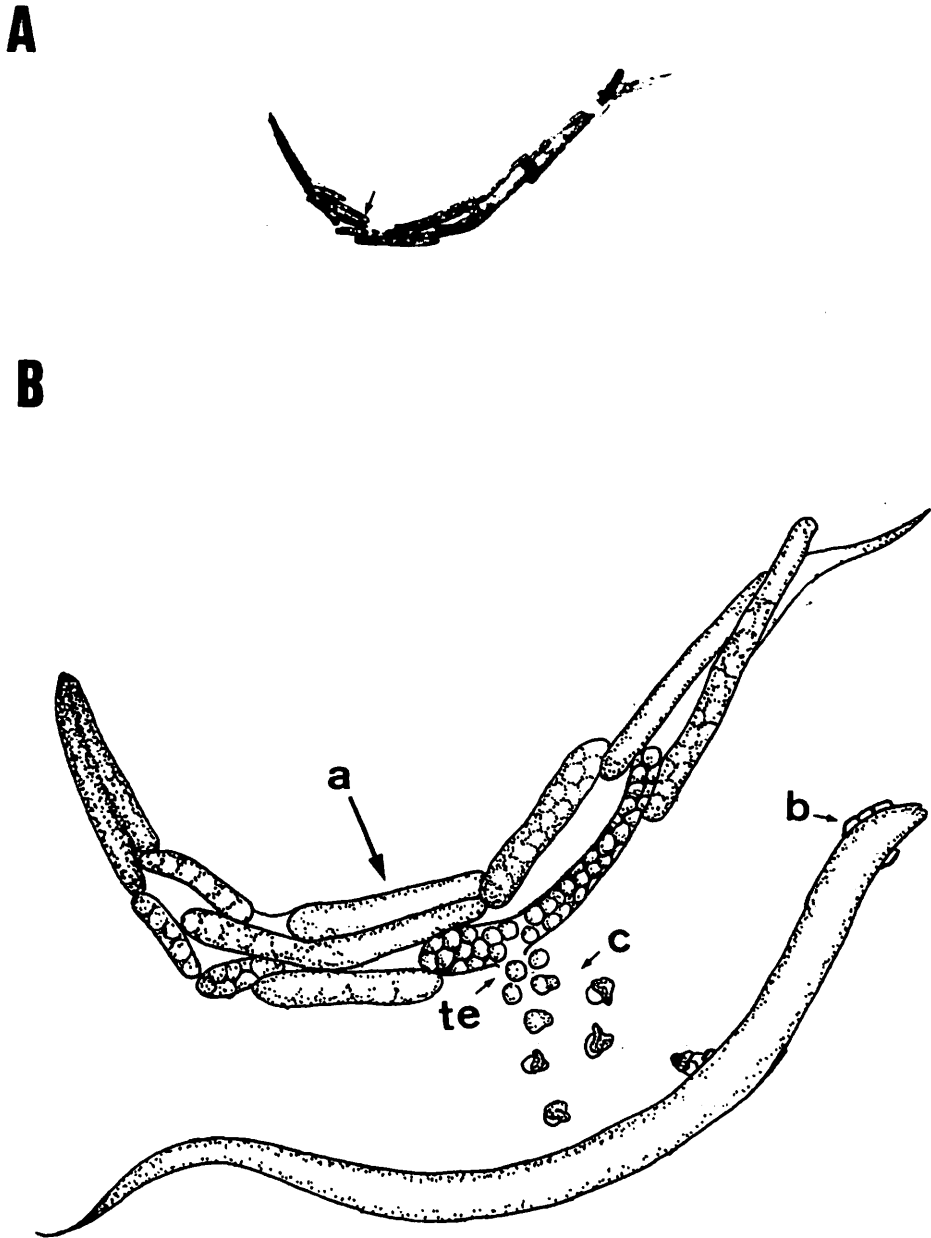


Figura 3 - A: Fotomicrografia de *Panagrellus redivivus* parasitado por *H. heterospora* mostrando os esporângios do fungo no interior do seu corpo (400 x). B: Desenho esquemático de nematóides parasitados por *H. heterospora*. a: esporângio. b: partículas infectivas do fungo sob a cutícula do nematóide. c: zoósporos inicialmente esféricos, atingindo o formato rombóide típico. Te: Tubo de evacuação. ESAL - Lavras MG - 1990.



4.2.3. *Harposporium anguillulae* Lohde, 1874 (Karling, 1938)

A espécie *Harposporium anguillulae* constatada no sul de Minas possui esporos de formato côncavo-convéxos, medindo 10-15 x 1-2 um (Figura 4Bc). Contudo BARRON (1977) relatou esporos com tamanho de 6-18 x 1-2 um. A partir de observações feitas nos nematóides parasitados por *H. anguillulae* constatou-se hifas assimilativas no interior do corpo do nematóide parasitado, concordando com afirmações de BARRON (1977). A partir destas hifas internas observou-se o crescimento de conidióforos, rompendo a cutícula do nematóide, e produzindo em diversos pontos as fiálides (células conidiogênicas) (Figura 4Bb), com os esporos côncavo-convéxos. BARRON (1977) relata que o processo de infecção tem início quando o nematóide injere o esporo que se aloja entre as fibras do músculo do esôfago. Tal alojamento é facilitado pelo formato do esporo e pelas extremidades afiladas do mesmo, situadas em planos diferentes. Em seguida o esporo produz um tubo germinativo a partir do centro do lado convexo, o qual rompe os tecidos do corpo do hospedeiro, iniciando o processo de colonização. O ciclo se completa quando os conidióforos rompem a parede do corpo do hospedeiro e produzem novos esporos. Segundo observações feitas a partir de isolados na região de Lavras e São Sebastião do Paraíso observou-se que após a produção de esporos, algumas células das hifas localizadas no interior do corpo do nematóide parasitado aumentam de volume, apresentando-se fortemente pigmentadas e com a parede espessa (Figura 4Ba), formando-se assim os clamidosporos. Segundo BARRON (1977), os

clamidosporos possuem a função de resistir às condições adversas e produzir novos esporos quando o ambiente estiver novamente favorável. Entretanto nas observações realizadas em isolados da região de Lavras e São Sebastião do Paraíso o número de clamidosporos produzidos em cada infecção por *Harposporium anguillulae* não foi tão elevado quanto aquele observado por BARRON (1977).

*Harposporium anguillulae* pertence a classe Deuteromycetes e possui ampla distribuição geográfica. Esta espécie de fungo endoparasita de nematóides é bastante agressiva, mas não infecta nematóides fitoparasitas, já que estes possuem modificações no aparelho bucal para formação do estilete, por onde se alimentam, e que impossibilitam a injeção do esporo de *Harposporium anguillulae*.

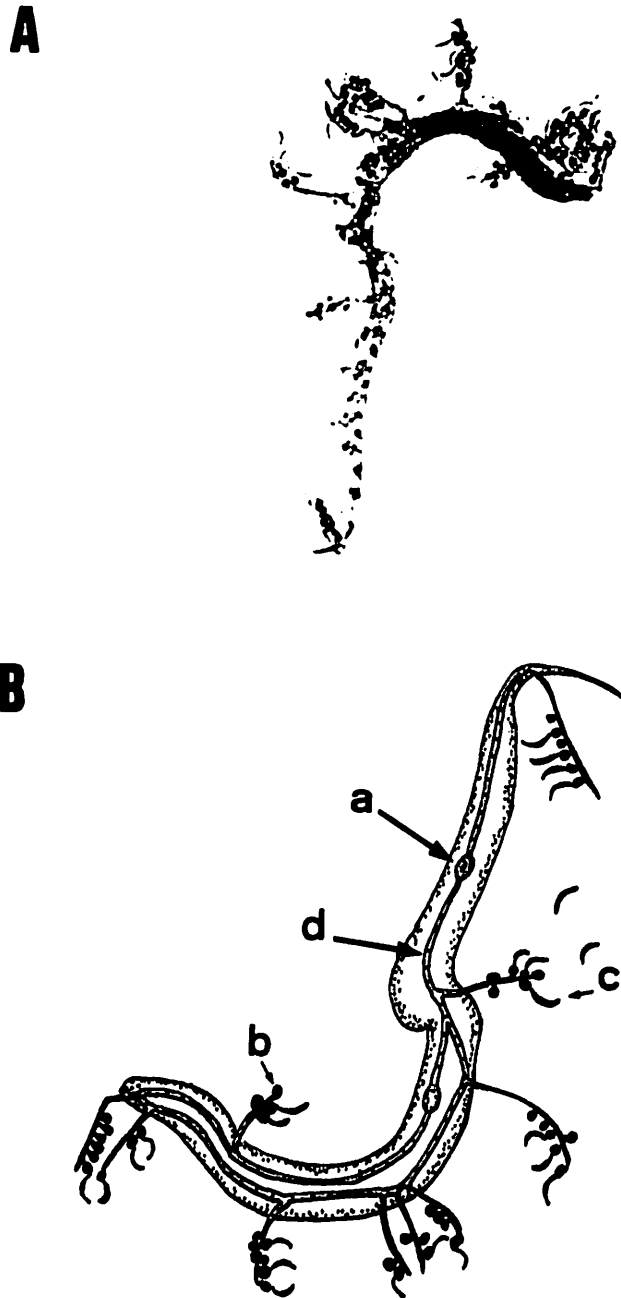


Figura 4 - Fotomicrografia de A: *Panagrellus redivivus* parasitado por *Harposporium anguillulae* (400x) mostrando o conidióforo e conídios externos ao corpo do nematóide infectado. B: desenho esquemático do nematóide parasitado por *H. anguillulae*. a: clamidosporo formado nas hifas localizadas no interior do nematóide. b: fiálides (células conidiogênicas). c: esporos. d: hifa vegetativa no interior do nematóide. ESAL - Lavras MG - 1990.

#### 4.2.4. *Harposporium bysmatosporum* Shephed, 1955

*Harposporium bysmatosporum* pertence a classe Deuteromycetes. Os esporos desta espécie isolada na região de Lavrasno mediram 4,5-5,0 x 0,8-2,1µm (Figura 5Ca), apresentando formato cilíndrico com uma das extremidades afilada, distinguindo portanto de *H. diceraeum*, que apresenta as duas extremidades afiladas. No interior do corpo do nematóide observa-se ainda hifas assimilativas (Figura 5Cc) produzindo conidióforos externos (Figura 5C) após o rompimento da cutícula. Nos conidióforos observam-se engrossamentos chamados fiálides ou células coniogênicas (Figura 5Cb) suportando esporos. Os conidióforos observados foram pequenos, porém com alta produção de conídios. BARRON (1977) relata que os esporos são responsáveis pelo início da infecção. Quando o nematóide injere o esporo, este se aloja no esófago e produz um tubo germinativo que invade os tecidos do hospedeiro. A agressividade de *H. bysmatosporum* foi menor que as demais espécies isoladas. Porém não foi observada a produção de clamidosporos.

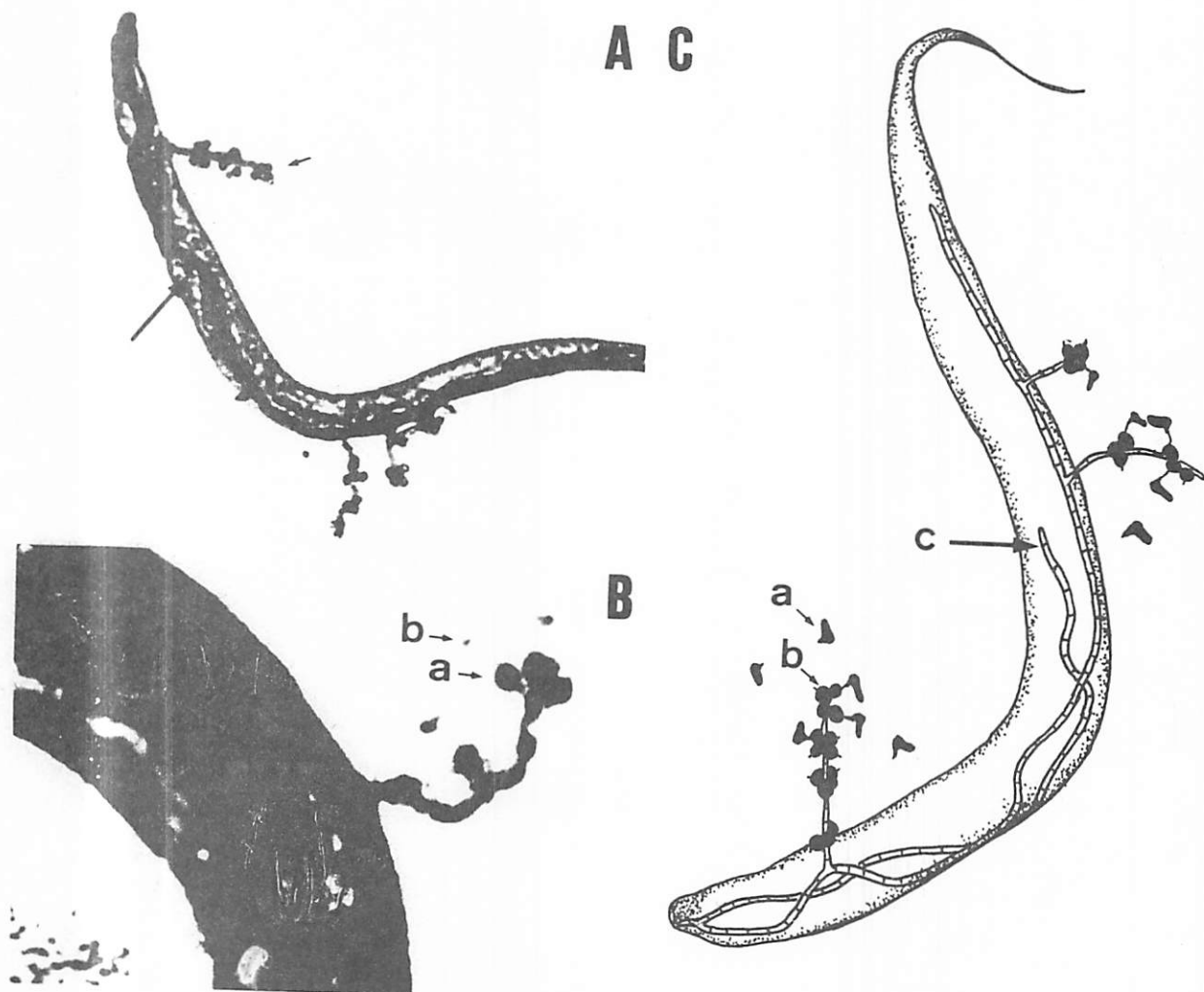


Figura 5 - A: Fotomicrografia de *Panagrellus redivivus* parasitado por *Harposporium bysmatosporum* mostrando o conidióforo e as hifas assimilativas (400 x) B: fotomicrografia em maior aumento (1000 x) mostrando o conidióforo com as fiálides (a) e os esporos típicos (b). C: desenho esquemático mostrando a infecção de *Panagrellus redivivus* por *H. bysmatosporum*. a: esporo. b: fiálides. c: hifas assimilativas. ESAL - Lavras MG - 1990.



#### 4.2.5. *Harposporium crassum* Shepherd, 1965

*Harposporium crassum* pertence à classe Deuteromycetes. Esta espécie se assemelha muito a *H. anguillulae* diferenciando-se apenas no tamanho do esporo: 18-20 x 1-2  $\mu$ m.

Nos isolados obtidos na região de Lavras observou-se o formato côncavo-convexos dos esporos de *H. crassum* (Figura 6Bc) mais acentuado do que aqueles produzidos por *H. anguillulae*. A infecção do nematóide inicia-se quando o esporo é ingerido, fixando-se entre os músculos do esôfago da vítima (BARRON, 1977). A germinação e colonização dos tecidos do hospedeiro é rápida. Observou-se ainda no isolado obtido hifas localizadas internamente ao corpo do nematóide parasitado e produção de conidióforos que romperam a cutícula produzindo em vários pontos, as fiálides (células conidiogênicas) (Figura 6A), e nestas os esporos. Em infecções velhas constatou-se a formação de clamidosporos a partir de algumas células das hifas internas ao nematóide parasitado (Figura 6Ba). Segundo BARRON (1977) a função do clamidosporo consiste em resistir às condições adversas do ambiente, produzindo novos esporos quando as condições se tornarem favoráveis (BARRON, 1977).

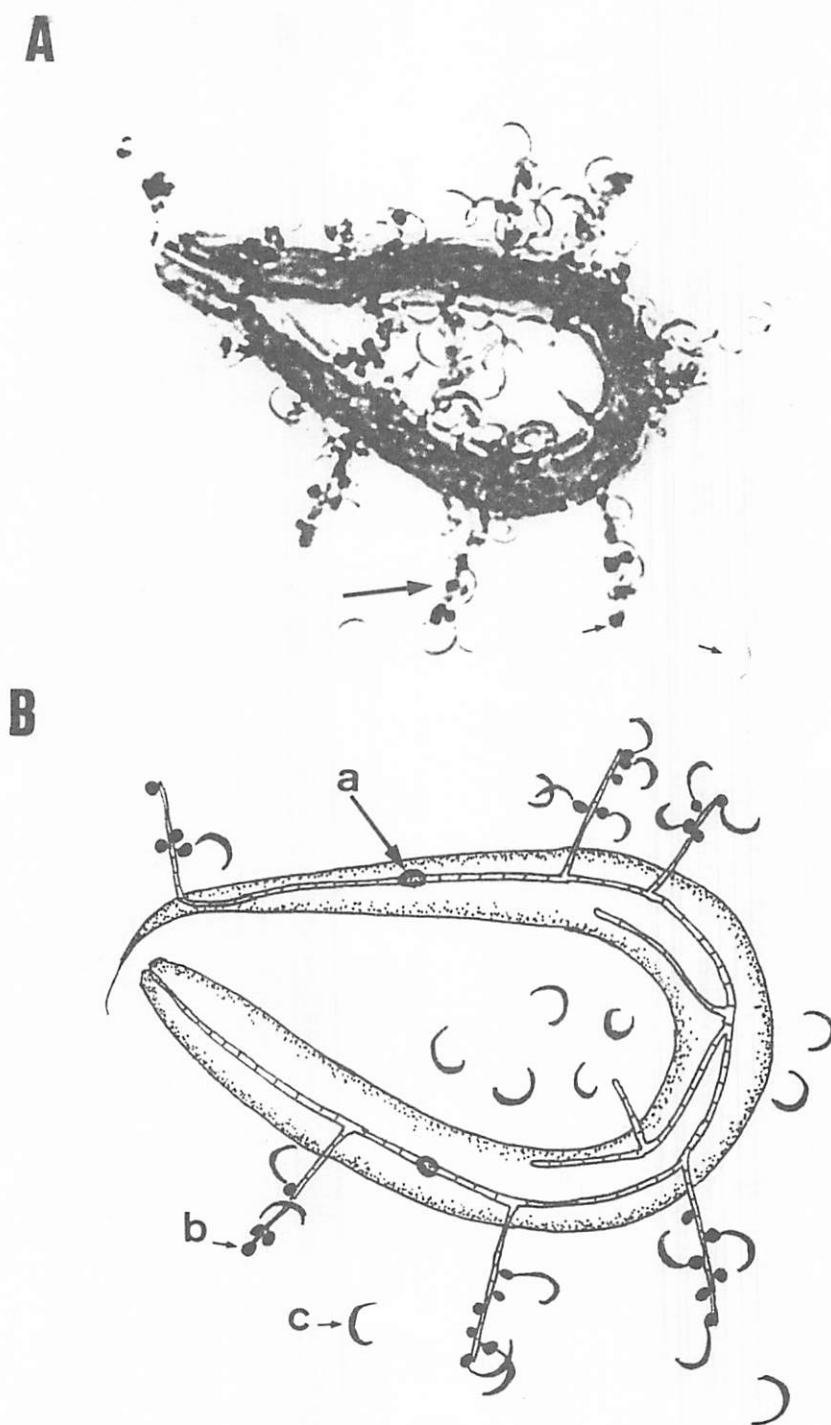


Figura 6 - A: Fotomicrografia de *Panagrellus redivivus* parasitado por *Harposporium crassum* mostrando o conidióforo, as fiálides e os esporos (400 x). B: desenho esquemático de *Panagrellus redivivus* parasitado por *H. crassum*. a: clamidosporo formado nas hifas assimilativas. b: fiálides. c: esporos. ESAL - Lavras MG - 1990.

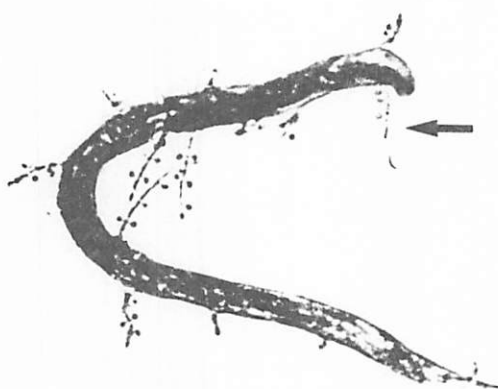
#### 4.2.6. *Harposporium helicoides* Drechsler, 1940

*Harposporium helicoides* pertence à classe Deuteromycetes produzindo esporos de 20-22 x 1-2 um de formato helicoidal, característica marcante da espécie, o que facilita a sua adesão no esôfago do hospedeiro (Figura 7Bc). Segundo BARRON (1977), o processo de infecção por *H. helicoides* inicia-se quando o nematóide injere o esporo, que se fixa no esôfago. Neste local o esporo produz o tubo germinativo, que rompe os tecidos do nematóide e inicia a colonização. Nos isolados de *H. helicoides* obtidos parasitando nematóides no sul de Minas observaram-se hifas assimilativas no interior do corpo do hospedeiro e conidióforos longos. Nos conidióforos encontram-se fiálides (células conidiogênicas) (Figura 7Bb) e os esporos são formados nas suas extremidades (Figura 7Bc).

Em infecções velhas, observaram-se algumas células das hifas localizadas no interior do nematóide parasitado com alterações, (Figura 7Ba) tornando-se pigmentadas e com a parede espessa. Estas células, denominadas clamidosporos possuem, segundo BARRON (1977), a função de resistir às condições adversas do ambiente e produzir novos esporos quando o ambiente se tornar favorável. Observou-se ainda nos nematóides parasitados que o número de clamidosporos produzidos nas infecções velhas foi bastante alto quando comparado a *Harposporium anguillulae*. Duddington, (1957), citado por BARRON (1977) observou esporos de *Harposporium helicoides* infectando nematóides após aderirem-se à cutícula do mesmo. Segundo o autor, os esporos de *H. helicoides* possuem uma substância adesiva em uma das extremidades do

conidio, a qual é responsável pela aderência do esporo à cutícula do nematóide. Este modo de infecção, contudo, não foi observado no presente trabalho.

A



B

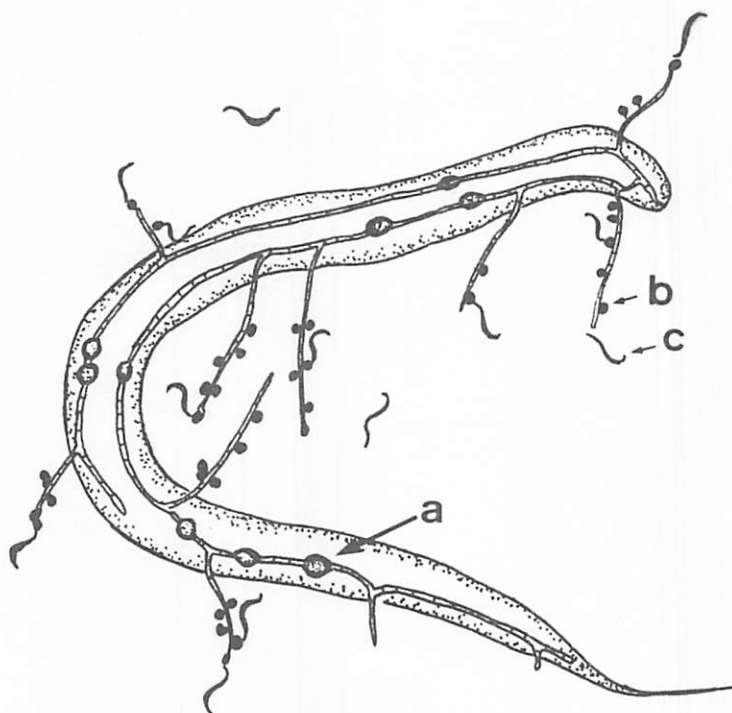


Figura 7 - A: Fotomicrografia de *Panagrellus redivivus* parasitado por *Harposporium helicoides* (400 x), mostrando os conídios e conidióforos. B: desenho esquemático de *Panagrellus redivivus* parasitado por *H. helicoides*. a: clamidospore. b: fiálides. c: esporo. ESAL - Lavras MG - 1990.



4.3. Efeito da temperatura na capacidade parasitária de *Haptaglossa heterospora* Drechsler, 1940, "in vitro"

*Haptaglossa heterospora* parasitou *Panagrellus redivivus* sob todas as temperaturas testadas (Figura 8). O parasitismo foi mais acentuado nas temperaturas de 23, 25 e 27°C. Na temperatura de 30°C ocorreu mortalidade de nematóides devido ao calor, o que impossibilitou a avaliação do teste a partir do segundo dia. O parasitismo foi menor e bastante similar nas temperaturas de 15 e 20°C. Porém no sétimo dia todos os nematóides estavam mortos em qualquer das temperaturas a que foram submetidos.

De acordo com os resultados observados, notou-se que os esporos de *H. heterospora* podem infectar os hospedeiros nas temperaturas de 15 a 30°C. Entretanto sob temperaturas baixas os nematóides tornaram-se mais lentos, diminuindo as chances de encontro com esporos de *H. heterospora* e, conseqüentemente, prolongando o período necessário para infecção e morte de toda a população de nematóides. Desta forma a temperatura no intervalo estudado parece não constituir fator limitante para o parasitismo, necessitando-se apenas o contato do hospedeiro com o esporo do fungo.

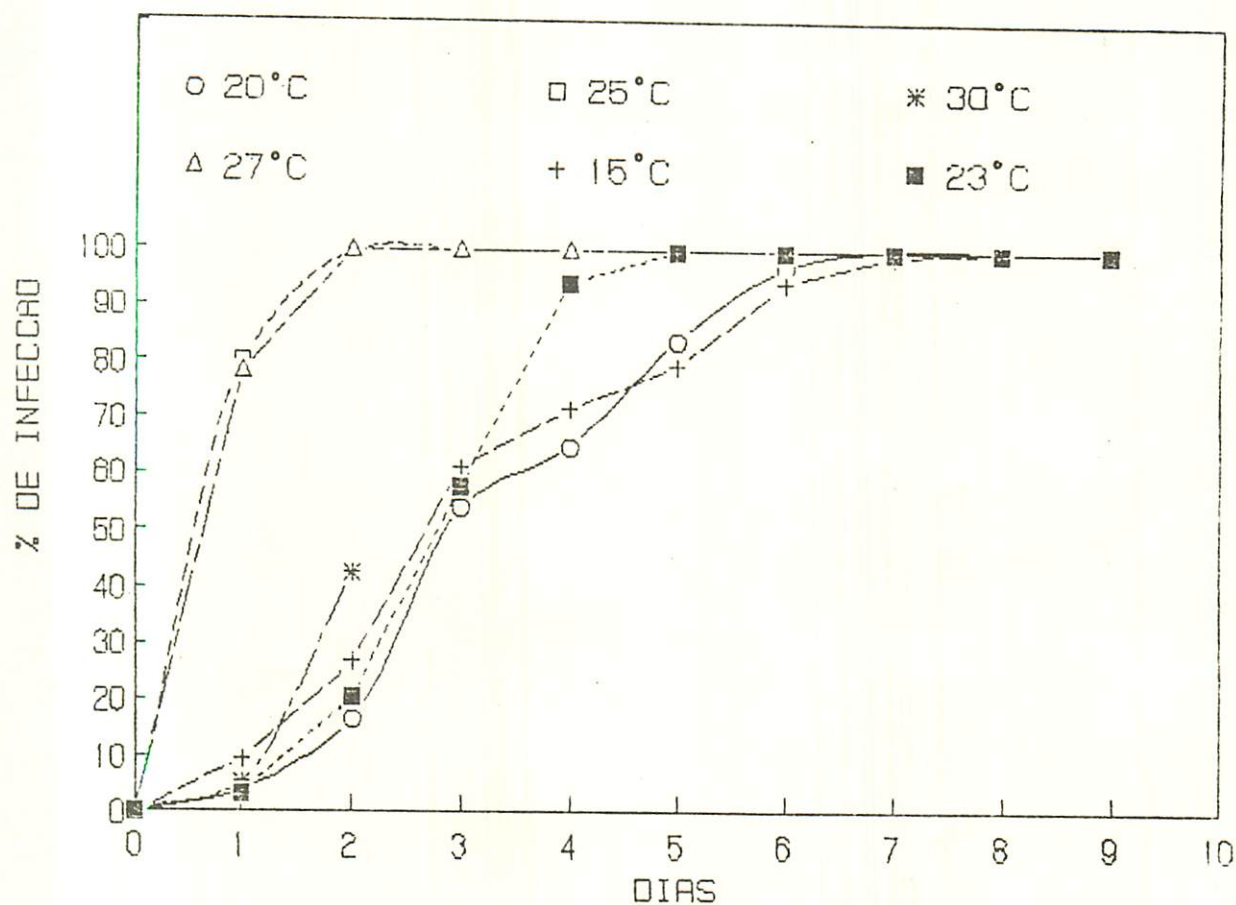


Figura 8 - Efeito da temperatura no parasitismo de *Haptaglossa heterospora* a *Panagrellus redivivus* expressa em % de infecção. ESAL - Lavras MG - 1990.

4.4. Capacidade parasitaria de *Haptaglossa heterospora* Drechsler 1940 a espécies de nematóides, "in vitro"

Todos as espécies dos nematóides testadas foram susceptíveis ao fungo endoparasita *Haptaglossa heterospora* (Figura 9), sendo toda a população extinta aos sete dias após a inoculação do fungo. Contudo em *Caenorhabditis elegans* (Figura 13A) a mortalidade foi mais rápida, possivelmente devido à sua maior mobilidade, o que aumentou a chance destes nematóides encontrarem esporos de *Haptaglossa heterospora* e se infectarem. Houve grande variação do tamanho e forma dos esporângios de *H. heterospora* dentro de uma mesma população de nematóides infectados. Os esporângios formados em *M. incognita* e *M. exigua* tinham aproximadamente a espessura do corpo do nematóide, e na maioria formavam uma fileira de esporângios com diferentes comprimentos (Figuras 10 e 11). Já em *Ditylenchus dipsaci* os esporângios foram produzidos em 2 a 3 fileiras dentro do corpo deste nematóide (Figura 12). Em *Panagrellus redivivus* e *Caenorhabditis elegans* formaram-se esporângios grandes e, geralmente, em fileira única (Figura 13).

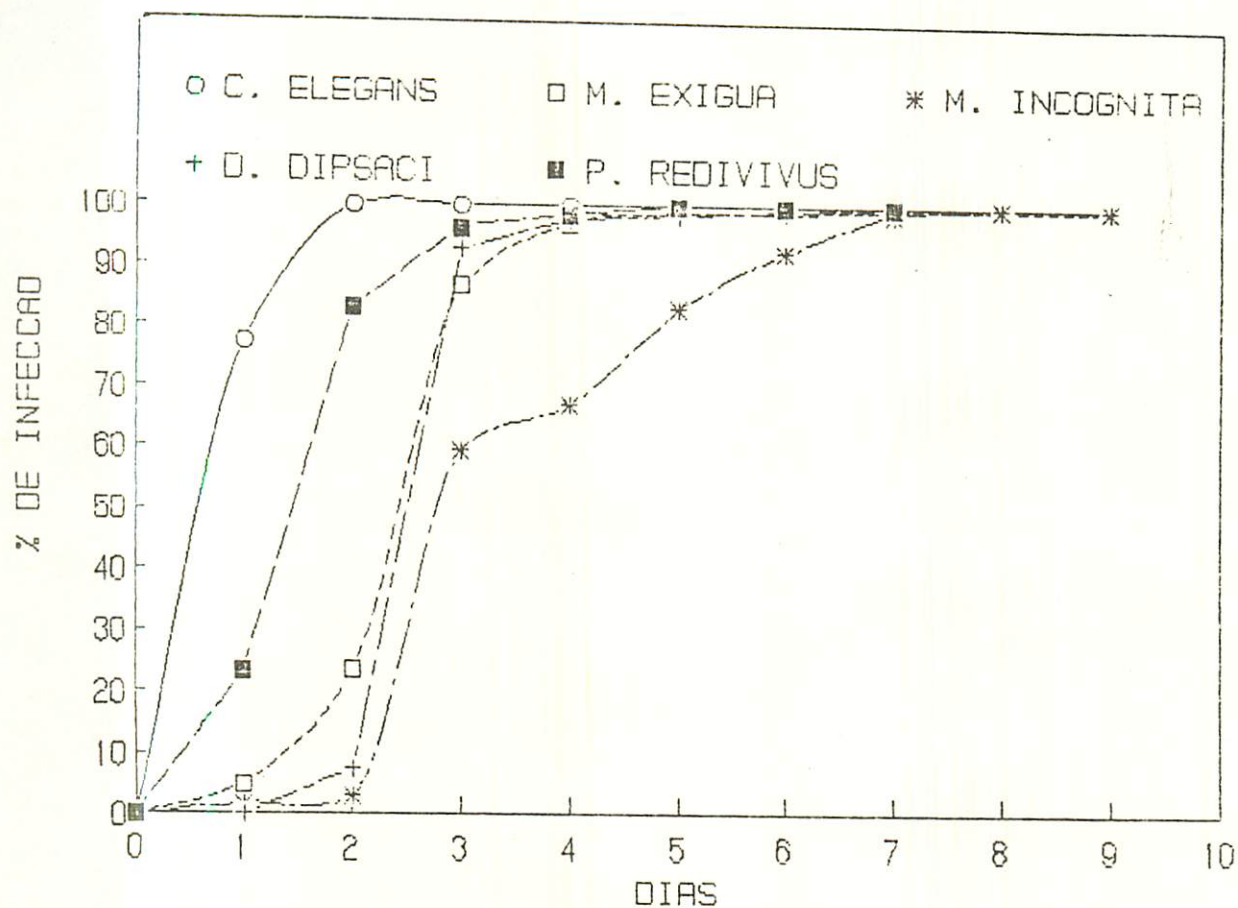


Figura 9 - Parasitismo de *Haptaglossa heterospora* a *Ditylenchus dipsaci*, *Panagrellus redivivus*, *Caenorhabditis elegans*, *Meloidogyne exigua* e *M. incognita* durante 10 dias à temperatura de 23-25°C. ESAL - Lavras, M.G. 1990.



Figura 10 - Parasitismo de *Haptaglossa heterospora* em nematóides da espécie *Meloidogyne incognita*. Observa-se esporângios de diferentes tamanhos em fileira simples. ESAL - Lavras, MG. 1990.

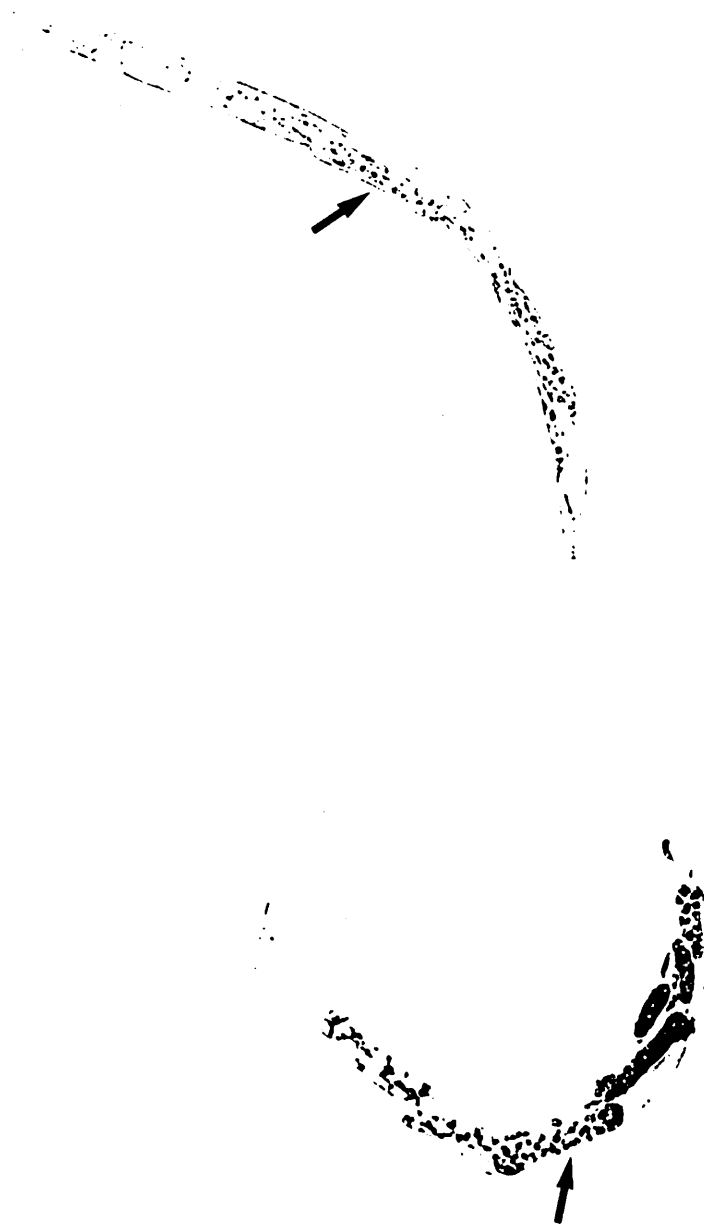


Figura 11 - Parasitismo de *Haptaglossa heterospora* em nematóides da espécie *Meloidogyne exigua*. Observam-se esporângios de diferentes tamanhos em fileira simples. ESAL-Lavras, MG. - 1990.





Figura 12 - Parasitismo de *Haptaglossa heterospora* em nematóides da espécie *Ditylenchus dipsaci*. Observam-se esporângios em fileiras duplas ou triplas. ESAL - Lavras, MG. 1990.

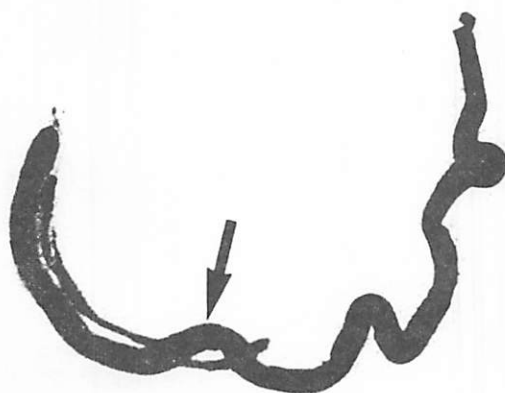
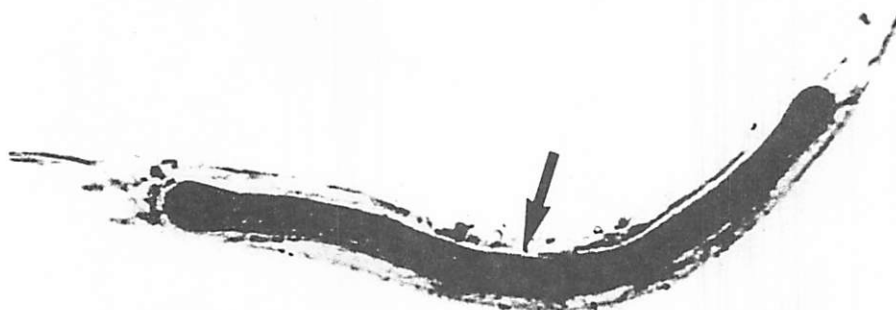
**A****B**

Figura 13 - Parasitismo de *Haptaglossa heterospora* nas espécies de nematóides:

A: Em *Caenorhabditis elegans*

B: Em *Panagrellus redivivus*

Observam-se esporângios grandes. ESAL - Lavras, MG. 1990.

## 5. CONCLUSÕES

Nas condições em que foi realizado o trabalho pode-se concluir:

- Constitui a primeira observação no Brasil das espécies dos fungos endoparasitas de nematóides, *Catenaria sp*, *Haptaglossa heterospora*, *Harposporium anguillulae*, *H. bysmatosporum*, *H. crassum* e *H. helicoides*.

- Os fungos endoparasitas de nematóides ocorreram em 93,3% das amostras.

- As espécies de fungos endoparasitas de nematóides do gênero *Harposporium* foram mais frequentes predominando *Harposporium anguillulae*.

- *Haptaglossa heterospora* possui alto potencial para utilização em controle biológico de fitonematóides.

- Os fitonematóides *Ditylenchus dipsaci*, *M. exagua*, *M. incognita* podem ser parasitados por *Harposporium heterospora*.

- *Haptaglossa heterospora* pode parasitar nematóides de 15 a 30°C ampla faixa de temperatura.

## 6. RESUMO

Foram trabalhadas 15 amostras de solo provenientes da região de Lavras e São Sebastião do Paraíso, com os objetivos de isolar e identificar as espécies de fungos endoparasitas de nematóides bem como avaliar o potencial destes fungos no controle biológico de nematóides fitoparasitas.

Do total das amostras, cinco foram colhidas em solos sob mata natural, cinco em solos sob culturas perenes e o restante em solos onde se desenvolvem atividades olerícolas. A extração de esporos foi feita através das técnicas de Centrifugação Diferencial e do Funil de Baerman, com modificações. Foram encontrados os fungos endoparasitas de nematóides: *Haptoglossa heterospora*, *Catenaria* sp., *Harposporium bysmatosporum*, *H. helicoides*, *H. crassum* e *H. anguillulae*, sendo predominante. No geral o número de espécies encontradas em solos cultivados e não cultivados foi similar.

Foram realizados testes "in vitro" onde se comprovou o parasitismo de *Haptoglossa heterospora* em várias espécies de nematóides, incluindo *Ditylenchus dipsaci*, *Meloidogyne exigua* e *M. incognita*. Outros testes "in vitro"

demonstraram o efeito da temperatura sobre a capacidade de parasitismo de *Haptoglossa heterospora*. A referida espécie infectou nematóides da espécie *Panagrellus redivivus* sob as temperaturas de 15, 20, 23, 25, 27 e 30°C, sendo que o parasitismo ocorreu com maior velocidade nas temperaturas de 23, 25 e 27°C.

## 7. SUMMARY

### OCCURRENCE OF ENDOPARASITIC FUNGI OF NEMATODES ON SOUTH OF MINAS GERAIS STATE, BRAZIL, AND ITS POTENCIAL ON THE CONTROL OF PLANT PARASITIC NEMATODES

Fifteen samples were collected from the south of Minas Gerais state. Five of them came from natural forest, 5 from perenial crops and the rest from vegetable fields. For the fungi spores extraction, the diferencial centrifugation technique and Baerman funnel with modifications were used. The objectives of the work were to: a) isolate and identify the endoparasitic fungi associated with nematodes, and b) avaliate its potential on the control of plant parasitic nematodes. Six endoparasitic fungi species were found: *Haptaglossa heterospora*, *Catenaria* sp, *Harposporium bysmatosporum*, *H. helicoides*, *H. crassum* e *H. anguillulae*. *H. anguillulae* was the most predominant species among the samples. The number of species found in cultivated and non-cultivated soils was similar. "In Vitro" tests were undergone to check the parasitism efficacy of *Haptaglossa heterospora* on several nematode species including: *Ditylenchus dipsaci*,



*Meloidoyne exigua* and *M. incognita*. The parasitism of *H. heterospora* was high on the referred plant parasitic nematodes. The effect of temperature on the parasitism capacity of *Haptaglossa heterospora* was also studied. *H. heterospora* infected *Panagrellus redivivus* in all tested temperatures: 15, 20, 23, 25, 27 and 30°C. However the rate of infection was greater at 23, 25 and 27°C.

## 8. REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

01. BARRON, G.L. Isolation and maintenance of endoparasitic nematophagous Hyphomycetes. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, 47: 1899-1902. Dec. 1969.
02. BARRON, G.L. *The Nematode-Destroying Fungi*. Topics in Microbiology. Guelph, Canadian Biological Publications 1977. 140p.
03. BRICKLEBANK, J.; COOKE, R.C. Utilization of polysacharides by two nematode-parasitic fungi. *Transactions British Mycological Society*, Cambridge, 52 (2):347-9. Apr. 1969.
04. BUCARO, R.D. Hongos nematofagos de El Salvador. *Revista de Biologia Tropical*, San Salvador, 31(1):25-28. 1983.
05. COOKE, R.C. & GODFREY, B.E.S. A key to the nematode-destroying fungi. *Transactions British mycological Society*. Cambridge, 47(1):61-74. Feb. 1978.

06. COOKE, R.C. *The Biology of Simbiotic fungi*. London, Sohn Wiley & Sons, 1977. 282p.
07. DACKMAN, C.; OLSSON, E.; JANSSON, H.-B.; LUNDGREN, B. & NORDBRING-HERTZ B. Quantification of predatory and endoparasitic nematophagous fungi in soil. *Microbial Ecology*, New York, 13: 89-93. 1987.
08. DAVIDSON, J.G.N & BARRON, G.L. Nematophagous fungi: *Haptaglossa*. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, 51:1317-24. Jul. 1973.
09. DHAWAN, S.C. Mode of infection and life cycle of *Catenaria vermicola* infecting juveniles of *Heterodera avenae*. *Indian Phytopathology*, New Deli, 38 (2):381-1. 1985.
10. DUDDINGTON, C.L. *The Friendly Fungi*. 1. ed. London, Faber and Faber. 1957. 188p.
11. DUDDINGTON, C.L. Predaceous Fungi and the Control of Eelworms. In: CARTHY, J.D. & DUDDINGTON, C.L. *Viewpoint in Biology*. Vol. I, London, Butterworths e Colimited. 1962. 290p.
12. EAYRE, C.G.; JAFFEE, B.A.; ZEHR, E.I. Suppression of the plant parasitic nematode *Criconemella xenoplax* by the nematophagous fungus *Hirsutella rhossiliensis*. *Plant Disease*, Washington, 71(2):832-834. Sept. 1987.

13. GIUMA, A.Y. & COOKE, R.C. Potential of *Nematoctonus* conidia for biological control of soil-borne phytonematodes. *Soil Biology and Biochemistry*, Elmsford, 6:217-220. 1974.
14. GRAY, N.F. Ecology of nematophagous fungi: *Panagrellus redivivus* as the target organism. *Plant and soil*, the Hague, 73:293-297. 1983.
15. GRAY, N.F. The effect of fungal parasitism and predation on the population dynamics of nematodes in the activated sludge process. *Annals of applied Biology*, London, 104:143-149. 1984.
16. JAFFEE, B.A. Parasitism of *Xiphinema rivesi* and *X. americanum* by zoosporic fungi. *Journal of Nematology*, DeLeon Springs, 18(1):87-93. Jan. 1986.
17. JANSSON, H.-B & NORDBRING-HERTZ, B. The endoparasitic nematophagous fungus *Meria coniospora* infects nematodes specifically at the chemosensory organs. *Journal of General Microbiology*, London, 129(4):1121-6. 1983.
18. JANSSON, H.B.; JEYAPRAKASH, A.; ZUCKERMAN, B.M. Differential adhesion and infection of nematodes by endoparasitic fungus *Meria coniospora* (Deuteromycetes). *Applied and Environmental Microbiology*, Amherst, 49(3):552-5. Mar. 1985a.

19. JANSSON, H.B.; JEYAPRAKASH, A.; ZUCKERMAN, B.M. Control of root-knot nematodes on tomato by the endoparasitic fungus *Meria coniospora*. *Journal of Nematology*, Deleon Springs, 17(3):327-9. July 1985b.
20. KERRY, B.R. & CRUMP, D.H. Observations on fungal parasites of females and eggs of the cereal cyst-nematode, *Heterodera avenae*, and other cyst-nematodes. *Nematologica*, Leiden, 23:193-201. 1977.
21. KERRY, B. Biocontrol: Fungal parasites of female cyst nematodes. *Journal of Nematology*, Deleon Springs, 12(4): 224-9. Oct. 1980a.
22. -----; CRUMP, D.H. & MULLEN, L.A. Parasitic fungi, soil moisture and multiplication of the cereal cyst nematode, *Heterodera avenae*. *Nematologica*, Leiden, 26:57-68. 1980b.
23. ----- & MULLEN, L.A. Research notes. Fungal parasites of some plant parasitic nematodes. *Nematropica*, Bradenton, 11(2):187-189. 1981.
24. MANKAU, R. Biocontrol: Fungi as nematode control agent. *Journal of Nematology*, Deleon Springs, 12(4):253-9. Oct. 1980.

25. MORGAN-JONES, G.; RODRIGUES-KABANA, R. Fungal biocontrol for the management of nematodes. In: VEECH, J. & DICKSON, D.W., Eds., *Vistas on Nematology*: a comemoration of the twenty-fifth aniversary of the Society of Nematologists. Maryland, E.D. Painter Printting Co., 1987. p.94-9.
26. NICOLAY, R. & SIKORA, R.A. Improved Techniques for the detection of nematophagous fungi and their activity againt target nematodes. *Revue de Nematology*, Paris, 11(1):115-116. 1988.
27. NOVARETTI, W.R.T. Controle Biológico de Nematóides Fitopatogênicos. In: REUNIAO SOBRE CONTROLE BIOLOGICO DE DOENÇAS DE PLANTAS, 1, Piracicaba, 1986. *Anais...* Campinas, Fundação Cargill, 1986. p.24-38.
28. SASSER, J.N. *Plant-Parasitic Nematodes: The Farmer's Hidden Enemy*. Raleigh, University Graphics, 1989. 115p.
29. TAYLOR, A.L. & SASSER, J.N. *Biology, identification and control of root knot nematodes (Meloidogyne species)*. North Caroline, International Meloidogyne project, 1978. 111pp.