

SAMARA BELÉM COSTA

**ISOLAMENTO DE FUNGOS ASSOCIADOS AO NEMATÓIDE DE CISTO DA SOJA
E PATOGENICIDADE DESSES ISOLADOS EM FÊMEAS
DE *Heterodera glycines* E *Meloidogyne* spp.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Fitossanidade para obtenção do título de "Mestre".

Orientador

Prof. VICENTE PAULO CAMPOS



**LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
1996**

Ficha Catalográfica preparada pela Seção de Classificação e Catalogação da Biblioteca Central da UFLA

Costa, Samara Belém

Isolamento de fungos associados ao nematóide de cisto da soja e patogenicidade desses isolados em fêmeas de *Heterodera glycines* e *Meloidogyne* spp. / Samara Belém Costa. -- Lavras : UFLA, 1996.

31 p. : il.

Orientador: Vicente Paulo Campos.

Dissertação (Mestrado) - UFLA.

Bibliografia.

1. Soja - Doença. 2. Nematóide. 3. Fungo fitopatígeno. 4. Bactéria. 5. Parasitismo. 6. *Heterodera Glycines*. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-633.3494

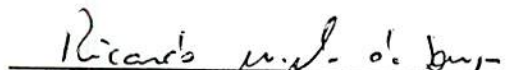
SAMARA BELÉM COSTA

ISOLAMENTO DE FUNGOS ASSOCIADOS AO NEMATÓIDE DE CISTO DA SOJA
E PATOGENICIDADE DESSES ISOLADOS EM FÊMEAS
DE *Heterodera glycines* E *Meloidogyne* spp.

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Fitossanidade para obtenção do título de "Mestre".

APROVADA em 30 de agosto de 1996


Prof^ª Maria Amélia dos Santos


Prof. Ricardo Magela de Souza


Prof. Vicente Paulo Campos
(Orientador)

Ao meu pai

Luiz Aurélio

DEDICO

Às minhas irmãs Andréa e Aurélia

Meu Irmão Luiz Francisco

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

À Deus pela força para mais esta conquista;

À Universidade Federal de Lavras pela oportunidade concedida;

À Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro;

Ao Professor Vicente Paulo Campos que me acolheu como orientada contribuindo para minha formação profissional;

Aos pesquisadores do Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo, Nicésio Filadelfo Sanssen de Almeida Pinto, Carlos Roberto Casela, Alexandre Ferreira da Silva, Fernando Tavares Fernandes, Jamilton Pereira dos Santos e aos técnicos Osni Alves da Silva, Clóvis Geraldo Ribeiro, Frederico Vicente de Oliveira e Avelar, Ronaldo Geraldo Braga e Antonio do Espírito Santo Nebias pelo sempre apoio e amizade;

À Heloisa Leite e Cleber Maximiniano pela contribuição contínua no desenvolvimento dos trabalhos;

Ao Professor Rubem Delly Veiga pela amizade e ajuda nas análises estatísticas.

Aos professores, funcionários e colegas do Departamento de Fitossanidade pela convivência no decorrer do curso;

À todos, que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão deste trabalho;

À Bráulio Lâmega Resende, com quem tive a felicidade de compartilhar estes anos.

BIOGRAFIA

SAMARA BELÉM COSTA, filha de Luiz Aurélio Castro Costa e Telma Belém Costa (in memorian), nasceu na cidade de Manaus, no estado do Amazonas, à 04 de março de 1967.

Diplomou-se em Agronomia pela Universidade Federal do Amazonas (FUA) no ano de 1990.

Foi bolsista de Iniciação Científica no Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA), na área de Fitopatologia, no período de 1991 à 1992.

Em 1993 foi estagiária do Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo - CNPMS, em Sete Lagoas-MG, na área de Fitopatologia - Patologia de Sementes e Entomologia - Controle Biológico de Pragas de Grãos Armazenados.

Em fevereiro de 1994, iniciou o curso de Mestrado no Departamento de Fitossanidade da Universidade Federal de Lavras (UFLA), na área de Fitopatologia, linha de pesquisa Controle Biológico de Nematóides. Concluiu-o em agosto de 1996.

SUMÁRIO

| | |
|--|------|
| LISTA DE TABELAS | vi |
| LISTA DE FIGURAS | viii |
| RESUMO | ix |
| ABSTRACT..... | x |
| | |
| 1 INTRODUÇÃO | 1 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA | 3 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS | 7 |
| 3.1 Isolamento e identificação de fungos associados à cistos de <i>Heterodera glycines</i> | 7 |
| 3.2 Produção de fêmeas de <i>H. glycines</i> em hidroponia | 9 |
| 3.2.1 Montagem do sistema hidropônico | 9 |
| 3.2.2 Germinação e crescimento de plântulas de soja, e inoculação de <i>H. glycines</i> | 11 |
| 3.2.3 Coleta e incubação de fêmeas de <i>Heterodera glycines</i> | 12 |
| 3.3 Parasitismo de fungos isolados de cistos de <i>Heterodera glycines</i> | 13 |
| 3.3.1 Análise da patogenicidade em fêmeas, ovos e J ₂ de <i>Heterodera glycines</i> | 13 |

| | |
|--|----|
| 3.3.2 Análise de patogenicidade em fêmeas de <i>Meloidogyne</i> spp. | 14 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 15 |
| 4.1 Isolamento e identificação de fungos associados à cistos de <i>Heterodera</i> <i>glycines</i> | 15 |
| 4.2 Produção de fêmeas de <i>H. glycines</i> em hidroponia | 18 |
| 4.3 Parasitismo de fungos isolados de cistos em fêmeas de <i>H. glycines</i> e <i>Meloidogyne</i> spp. | 20 |
| 5 CONCLUSÕES | 25 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 26 |
| APÊNDICE | 30 |

LISTA DE TABELAS

| Tabela | | Página |
|---------------|---|---------------|
| 1 | Fungos mais comuns encontrados em ovos, massas de ovos ou cistos de nematóides heteroderídeos | 4 |
| 2 | Fungos isolados de cistos de <i>Heterodera glycines</i> , em diferentes municípios, nos estados de Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso do Sul, Paraná | 16 |
| 3 | Freqüência da ocorrência de fungos em cistos de <i>Heterodera glycines</i> em: 1) Nova Ponte (MG), 2) Iraí de Minas (MG), 3) Chapadão do Sul (MS) e 4) Chapadão do Céu (GO) | 17 |
| 4 | Produção de fêmeas de <i>Heterodera glycines</i> em 16 plantas de soja cv. Cristalina cultivadas em hidroponia após três avaliações . | 19 |

LISTA DE FIGURAS

| Figura | | Página |
|--------|--|--------|
| 1 | Sistema hidropônico para a produção de fêmeas de <i>Heterodera glycines</i> empregadas nos testes de patogenicidade de isolados fúngicos | 10 |
| 2 | Parasitismo de fungos isolados de cistos de <i>H. glycines</i> e <i>Meloidogyne</i> spp. A) Não parasitado. B) <i>H. glycines</i> parasitado por <i>Fusarium oxysporum</i> . C) <i>Meloidogyne</i> spp. parasitado por <i>Fusarium oxysporum</i> . D) <i>Meloidogyne</i> spp. parasitado por <i>Dactylaria</i> sp. E) <i>Meloidogyne</i> spp. parasitado por <i>Paecilomyces lilacinus</i> | 21 |
| 3 | Parasitismo de fungos isolados de cistos de <i>Heterodera glycines</i> em fêmeas de <i>Meloidogyne</i> spp. | 24 |

RESUMO

COSTA, Samara Belém. Isolamento de fungos associados ao nematóide de cisto da soja e patogenicidade desses isolados em fêmeas de *Heterodera glycines* e *Meloidogyne* spp. Lavras: UFLA, 1996. 31p. (Dissertação - Mestrado em Fitopatologia)

Foram isolados e identificados a partir de cistos de *Heterodera glycines* colhidos nas localidades: Lavras (MG), Iraí de Minas (MG), Nova Ponte (MG), Chapadão do Céu (GO), Chapadão do Sul (MS) e Londrina (PR), as seguintes espécies fúngicas: *Fusarium solani*, *F. oxysporum*, *Gliocladium viride*, *Scytalidium* sp., *Dactylaria* sp., *Penicillium* sp., *Eurotium repens*, *Paecilomyces lilacinus* e *P. variotii*. *Fusarium solani* e *F. oxysporum* ocorreram em todas as amostras analisadas. Vinte e cinco a sessenta por cento dos cistos analisados continham *Fusarium* spp. o que representou 5-15 vezes a freqüência de cistos parasitados com outros fungos. Um sistema hidropônico foi testado para a produção de fêmeas de *H. glycines* livres de fungos e bactérias para uso em testes de patogenicidade de fungos isolados de cistos de *H. glycines*. Fungos e bactérias ocorreram em fêmeas produzidas em hidroponia, entretanto, o sistema desenvolvido rendeu 48,54% de fêmeas de

* Orientador: Vicente Paulo Campos. Membros da Banca: Maria Amelia dos Santos e Ricardo Magela de Souza.

H. glycines livres de fungos e bactérias. Testes "in vitro" foram realizados para observação de parasitismo de *F. oxysporum* em fêmeas de *H. glycines* em soja cultivada em hidroponia, e de *F. solani*, *F. oxysporum*, *Paecilomyces variotii*, *Gliocladium viride*, *Paecilomyces lilacinus* (2 isolados) e *Dactylaria* sp. (2 isolados) em fêmeas de *Meloidogyne* spp. *F. oxysporum* parasitou, superficialmente, fêmeas de *H. glycines*, porém, apenas 1,10% do total de ovos das fêmeas infestadas. Fêmeas de *Meloidogyne* spp. foram parasitadas superficialmente e internamente por todos os fungos testados. Os ovos de fêmeas de *Meloidogyne* spp. parasitadas, tiveram graus diferentes de parasitismo. Maior parasitismo de ovos de *Meloidogyne* spp. ocorreu com os fungos *Paecilomyces lilacinus* (2 isolados) e com *Fusarium solani*. Hifas fúngicas foram observadas emergindo de ovos de fêmeas de *Meloidogyne* spp. parasitadas.

ABSTRACT

ISOLATION OF SOYBEAN CYST NEMATODE FUNGI AND PATHOGENICITY OF ISOLATES ON FEMALES OF *Heterodera glycines* AND *Meloidogyne* spp.

Fusarium solani, *F. oxysporum*, *Gliocladium viride*, *Scytalidium* sp., *Dactylaria* sp., *Penicillium* sp., *Eurotium repens*, *Paecilomyces lilacinus* and *P. variotii* were isolated and identified from cysts of *Heterodera glycines* of soybean (*Glycine max*) from samples of Lavras (MG), Iraí de Minas (MG), Nova Ponte (MG), Chapadão do Céu (GO), Chapadão do Sul (MS) and Londrina (PR). *Fusarium solani* and *F. oxysporum* were found in all cyst samples. Twenty five to sixty percent of the cysts had *Fusarium* spp which represented 5 to 15 times the frequency of cyst with others fungi. A hydroponic system was tested for the production of *H. glycines* females free of fungi and bacterias to be used on pathogenicity tests of fungi isolated from *H. glycines* cysts. Contaminated fungi and bacterias were found in females hydroponic produced, however, the hydroponic system yielded 48,54% of *H. glycines* females free of those contaminants. The parasitism of *F. oxysporum* in *H. glycines* females produced in hidroponic cultivated soybean, and of *F. solani*, *F. oxysporum*, *Paecilomyces variotii*, *Gliocladium viride*, *Paecilomyces lilacinus* (two isolates) and *Dactylaria* sp. (two isolates) in females of *Meloidogyne* spp. was "in vitro" studied. *F. oxysporum*

parasitized females of *H. glycines*, superficially but, only 1,10% of the total eggs of the infested females was parasitized. *Meloidogyne* females were superficially and internally parasitized by all tested fungi. The eggs of parasitized *Meloidogyne* females had different degrees of parasitism. *Paecilomyces lilacinus* (two isolates) and *F. solani* had greater parasitism on *Meloidogyne* eggs. Fungus hyphae were observed emerging from eggs of parasitized *Meloidogyne* spp. females.

1 INTRODUÇÃO

Os nematóides pertencentes à família Heteroderidae são responsáveis por grandes perdas na produção agrícola mundial (Lordello, 1988). Dentre eles, destaca-se o nematóide de cisto da soja (*Heterodera glycines*) que causa uma das mais graves doenças da soja no nosso país (Borkert et al., 1994). As perdas nessa cultura, devido aos nematóides, vão de insignificantes a 100% dos grãos colhidos. Porém, em Mato Grosso, Minas Gerais e Goiás as perdas devido ao ataque do nematóide de cisto, variaram de 20 a 80% em 1993, com prejuízos estimados em mais de um bilhão de dólares (Mendes, 1993).

O melhor controle do nematóide de cisto da soja recomendado aos produtores brasileiros tem sido a rotação de culturas com plantas não hospedeiras (Tihohod e Santos, 1993); preconizando assim a diminuição do nível de inóculo na lavoura pela citada tática. O inóculo, contudo, diminuirá a medida que os cistos forem sendo destruídos, expondo os ovos aos rigores das condições ambientais.

A supressão de populações do nematóide dos cistos por inimigos naturais no campo, tem sido observada em muitas localidades, caracterizando os solos como supressivos (Kerry e Crump, 1977; Kerry, 1980; Morgan-Jones e Rodriguez-Kábana, 1987). Essa supressividade em solos infestados com *H. glycines* ainda está sendo investigada em nosso país.

Ênfase tem sido dada ao isolamento e identificação de fungos que parasitam o cisto de *H. glycines* no campo (Morgan-Jones e Rodriguez-Kábana, 1981; Gintis, Morgan-Jones e Rodriguez-Kábana, 1983); porém, a eficácia desses fungos na redução populacional do nematóide de cisto no campo também ainda está sendo investigada. Além disto, problemas ainda existem na obtenção de fêmeas ou cistos não infestados para utilização em testes de patogenicidade desses fungos. Desta forma, objetivou-se neste trabalho:

1. Isolar e identificar os fungos associados aos cistos de *Heterodera glycines*;
2. Produzir fêmeas pré-encistadas de *Heterodera glycines*, livres de fungos e/ou bactérias;
3. Testar o parasitismo de fungos isolados a partir de cistos de *Heterodera glycines*, em fêmeas e ovos de *Heterodera glycines* e *Meloidogyne* spp.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O conhecimento científico sobre fungos associados a ovos, fêmeas ou cistos de nematóides do gênero *Heterodera* iniciou com Kuhn citado por Chen et al. (1994) que na época relatou o parasitismo do fungo *Tarichium auxiliarum* (hoje *Catenaria auxiliarum* [Kuhn] Tribe), em fêmeas de *Heterodera schachtii*. Mais tarde, Goffart também citado por Chen et al. (1994) isolou *Cylindrocarpon destructans* (Zinssmeister) Scholten, de cistos de *Heterodera avenae* na Alemanha. Posteriormente, vários fungos têm sido isolados de ovos, fêmeas ou cistos de nematóides por diversos pesquisadores (Willcox e Tribe, 1974; Morgan-Jones e Rodriguez-Kábana, 1981; Clovis e Nolan, 1983; Morgan-Jones e Rodriguez-Kábana, 1984).

Esses trabalhos têm em diversas partes do mundo se avolumado nas duas últimas décadas conforme revisão de publicações feitas por Morgan-Jones e Rodriguez-Kábana (1987), e Chen et al. (1994). Os fungos mais freqüentes isolados de ovos, fêmeas, massas de ovos ou cistos de Heteroderidae estão listados na Tabela 1.

No Brasil, Silva, Piza e Carneiro (1993), isolaram *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *Gliocladium* sp. e *Stagonospora* sp. de cistos de *Heterodera glycines*.

TABELA 1. Fungos mais comuns encontrados em ovos, massas de ovos ou cistos de nematóides heteroderídeos.

| Fungos | Nematóides | Citação |
|-------------------------------------|-------------------------|---|
| <i>Neocosmospora vasinfecta</i> | <i>H. glycines</i> | Meyer, Huettel e Sayre, 1990 |
| <i>Fusarium oxysporum</i> | <i>H. glycines</i> | Chen et al., 1994 e outros |
| <i>Paecilomyces lilacinus</i> | <i>G. rostochiensis</i> | Clovis e Nolan, 1983 e outros |
| | <i>H. glycines</i> | Chen et al., 1994 e outros |
| | <i>G. rostochiensis</i> | Clovis e Nolan, 1983 |
| | <i>M. arenaria</i> | Godoy, Rodriguez-Kábana e Morgan-Jones, 1982 |
| <i>Paecilomyces variotii</i> | <i>H. glycines</i> | Gintis, Morgan-Jones e Rodriguez-Kábana, 1983 |
| <i>Cylindrocarpon destructans</i> | <i>H. avenae</i> | Crump, 1987 e outros |
| <i>Catenaria auxiliaris</i> | <i>H. schachtii</i> | Willcox e Tribe, 1974 |
| <i>Verticillium chlamydosporium</i> | <i>H. glycines</i> | Stiles et al., 1993 |
| <i>Phoma chrysanthemicola</i> | <i>H. glycines</i> | Chen et al., 1994 e outros |
| <i>Gliocladium catenulatum</i> | <i>H. glycines</i> | Chen et al., 1994 |
| <i>Trichoderma polysporum</i> | <i>H. glycines</i> | Meyer, Huettel e Sayre, 1990 |
| <i>Scytalidium fulvum</i> | <i>H. glycines</i> | Gintis, Morgan-Jones e Rodriguez-Kábana, 1983 |
| <i>Corynespora cassiicola</i> | <i>H. glycines</i> | Carris e Glawe, 1986 |
| <i>Phialophora gregata</i> | <i>H. glycines</i> | Carris e Glawe, 1986 |

Isolados fúngicos de cistos e ovos de nematóides heteroderídeos podem ser patogênicos e/ou saprófitas, podendo assim, ocasionalmente, parasitar fêmeas sedentárias de nematóides e ovos (Bursnall e Tribe, 1974; Morgan-Jones e Rodriguez-Kábana, 1984).

Godoy, Rodriguez-Kábana e Morgan-Jones (1982) observaram variações na patogenicidade de *Paecilomyces lilacinus*, *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *Gliocladium roseum*, *G. catenulatum*, *Chaetomium indicum*, *Codinaea heteroderae*, *Neocosmospora vasinfecta*, *Phoma macrostoma*, *P. multirostrata*, *Stagonospora heteroderae*, *Verticillium lamellicola*, *V. leptobactrum* e *Thielavia*

terricola. Gintis, Morgan-Jones e Rodriguez-Kábana (1983), observaram que *P. lilacinus*, *P. variotii*, *V. chlamydosporium* e *V. lecanii*, isolados de cistos de *H. glycines* em soja, demonstraram capacidade em parasitar ovos deste nematóide. *Paecilomyces lilacinus* produz quitinase que provoca ruptura da membrana do ovo, permitindo a penetração da hifa no interior do mesmo, tornando a massa de ovos um bom meio de cultura (Jatala, 1986)

Chen et al. (1994) observaram parasitismo moderado de *P. lilacinus*, *F. oxysporum*, *F. solani*, *Neocosmospora vasinfecta*, *Arthrobotrys dactyloides*, *Exophiala pisciphila* e *Stagonospora heteroderae* em ovos de *H. glycines*.

Godoy, Rodriguez-Kábana e Morgan-Jones (1982), estudando o parasitismo de fungos isolados de cistos de *H. glycines*, observaram que *Verticillium leptobactrum* e *V. lamellicola* parasitaram 80 e 65% dos ovos de *H. glycines* respectivamente, enquanto que em ovos de *M. arenaria* o parasitismo foi de 98 e 85% respectivamente. Entretanto, *Chaetomium indicum*, *Neocosmospora vasinfecta*, *Fusarium solani*, *F. oxysporum* não parasitaram ovos de nenhum dos dois nematóides. *Phoma multirostrata* e *P. macrostoma* parasitaram mais de 30% dos ovos de ambas as espécies.

Freire e Bridge (1985), em experimentos conduzidos no Brasil, concluíram que *P. lilacinus* tem considerável habilidade no parasitismo de *M. incognita*, pois em meio ágar-água esta espécie infectou 52,5% de ovos.

Cuidados na definição de técnicas para isolamento de fungos parasitas de nematóides e para avaliação de parasitismo desses fungos em ovos e fêmeas podem garantir sucesso em trabalhos de pesquisa visando o controle biológico de fitonematóides (Kim e Riggs, 1991).

A dificuldade em se obter ovos, fêmeas ou cistos não parasitados por fungos ou bactérias para os testes de patogenicidade de isolados fúngicos obtidos de fêmeas e de cistos é o primeiro entrave nesse tipo de pesquisa. Zuckerman e Brzeski (1966), desenvolveram um sistema para produção de nematóides em raízes gnotobióticas. Dropkin, Helgeson e Upper (1969), obtiveram nematóides não infectados a partir de plantas infestadas com o nematóide das galhas plantadas em areia e fertilizadas com solução nutritiva. Lambert et al. (1992) produziram juvenis de *M. javanica* em plantas infestadas cultivadas hidroponicamente.

A necessidade na obtenção de culturas puras de nematóides, impõe ao pesquisador o exercício da criatividade e maior aprofundamento científico e técnico para obtenção de nematóides livres de fungos e bactérias para utilização em testes de patogenicidade de fungos isolados de cistos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Isolamento e identificação de fungos associados à cistos de *Heterodera glycines*

Amostras de solo de áreas infestadas com o nematóide de cisto da soja foram coletadas nos municípios de Iraí de Minas (MG), Nova Ponte (MG), Chapadão do Céu (GO), Chapadão do Sul (MS), acondicionadas em sacos plásticos e enviadas ao Laboratório de Nematologia do Departamento de Fitossanidade (DFS) da Universidade Federal de Lavras (UFLA) onde foram trabalhadas. Cistos de *Heterodera glycines* também foram recebidos do Centro Nacional de Pesquisa de Soja, Londrina-PR. Outra parcela de cistos foi coletada em solo de vasos com o nematóide multiplicando em soja na casa-de-vegetação do Laboratório de Nematologia do DFS-UFLA. Todas as amostras foram mantidas à temperatura de 8 a 10°C.

Cem centímetros cúbicos de solo coletados foram colocados em becker plástico juntamente com 600 ml de água e agitado com agitador mecânico por 3 minutos. A seguir, todo o conteúdo do becker foi vertido em peneiras de 20 sobre 60 mesh. Os resíduos retidos na peneira de 60 mesh foram coletados com jatos de água e acondicionados em vidros pequenos, para posterior observação ao microscópio

estereoscópico. Ao microscópio, os cistos de coloração marrom-claro foram identificados e retirados com estilete e pinça de ponta fina, e colocados em vidros de relógio.

Os cistos, tanto os extraídos do solo como já descrito, como aqueles recebidos da EMBRAPA de Londrina foram, então, desinfestados superficialmente com NaOCl (hipoclorito de sódio) 1% por 1 minuto e cloranfenicol 100 ppm, sendo a seguir, plaqueados em ágar-água 2% e incubados à temperatura constante de 20°C em câmara de incubação em turnos de 12 horas de luz por 12 horas de escuro, durante 7 dias.

Os fungos crescidos sobre os cistos foram transferidos para placas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo BDA (batata dextrose ágar). Após sucessivas repicagens obtiveram-se culturas puras para a identificação desses fungos. Nos trabalhos de identificação contou-se com a ajuda da Profª Maria Menezes da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Para estudar a freqüência de cistos parasitados pelos fungos, 20 cistos de cada amostra de 4 localidades (Nova Ponte-MG, Iraí de Minas-MG, Chapadão do Sul-MS, Chapadão do Céu-GO) foram desinfestados superficialmente e plaqueados isoladamente em placas de Petri com ágar-água e cultivados como descrito anteriormente. O número de cistos parasitados por cada gênero fúngico foi estimado, e calculado a porcentagem de cisto com cada fungo em relação a população total de cisto trabalhado.

3.2 Produção de fêmeas de *H. glycines* em hidroponia

3.2.1 Montagem do sistema hidropônico

A hidroponia foi a alternativa mais prática para a obtenção de fêmeas não infestadas por fungos ou bactérias para os testes de patogenicidade dos isolados obtidos como descrito em 3.1.

Para montagem do sistema, empregaram-se garrafas de 2 litros, plásticas, seccionadas nas duas extremidades. O fundo foi substituído por lâmina de isopor com um furo no centro de aproximadamente 3 cm de diâmetro, por onde a planta inoculada com o nematóide foi introduzida. Na extremidade superior seccionada, foi colado com cola de silicone vulcanizada, um funil de plástico pequeno, que recebeu um tubo de borracha com vedação por pinça Mohr por onde se trocava a solução nutritiva. As garrafas foram apoiadas em estrutura de madeira, tipo grade, com as mangueiras voltadas para baixo e a parte aérea das plantas tutoradas (Figura 1).

A oxigenação nas garrafas foi mantida através de um oxigenador de aquário, que por meio de tubos de plástico de 40 cm de comprimento produziam borbulhamento na solução nutritiva.

Para impedir a penetração de luz e a incidência de organismos fotossintetizantes, as garrafas foram recobertas com papel alumínio, de modo que somente a parte aérea da planta recebesse luz natural.

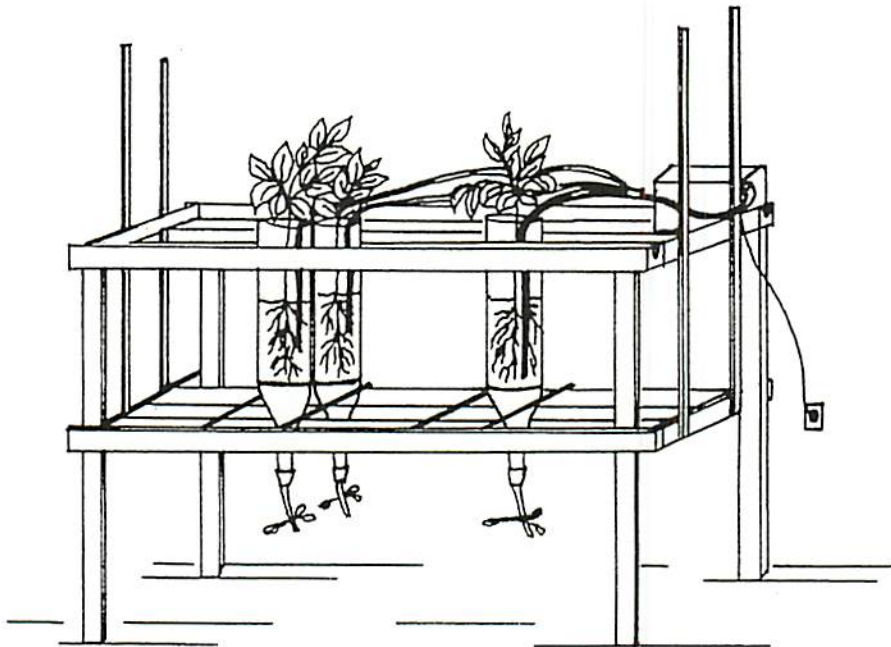


FIGURA 1. Sistema hidropônico para a produção de fêmeas de *Heterodera glycines* empregadas nos testes de patogenicidade de isolados fúngicos.

No preparo semanal de 4 litros da solução nutritiva completa, empregaram-se água filtrada e destilada mais: 24 ml de KNO_3 1 M; 16 ml de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1M; 8 ml de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 1M; 8 ml de $\text{Mg SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1M; 8 ml de Fe EDTA 20 mM; 8 ml de H_3BO_3 (3) 25 mM; 8 ml de $\text{Mn SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 2 mM; 4 ml de $\text{Zn SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2 mM e 1 ml da mistura de NaO Cl 50 mM + $\text{Cu SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,5 mM + H_2MoO_4 (85% Mo) 0,5 mM.

3.2.2 Germinação e crescimento de plântulas de soja, e inoculação de *H. glycines*

Sementes de soja da cultivar Cristalina foram envolvidas em rolos de papel previamente umedecidos e deixadas para germinar por 5 dias à temperatura constante de 25°C. Em seguida, foi feita a seleção das melhores plântulas que foram colocadas em vasos de plástico de 3 litros contendo apenas areia previamente autoclavada. Os vasos foram mantidos em ambiente isolado e irrigados em dias alternados com 20 ml da solução nutritiva por vaso, descrita em 3.2.1. Após uma semana foi feita nova seleção de plântulas, deixando-se apenas 3 delas por vaso. Foram utilizadas, inicialmente, 16 plântulas para a inoculação de juvenis do segundo estágio (J_2) de *Heterodera glycines*. Para isto foram extraídos e coletados cistos de coloração marrom-claro contendo muitos ovos em seu interior, que foram esmagados com o triturador de tecidos. Todo o conteúdo resultante foi derramado em peneira de 500 mesh e coletado em becker plástico através de jatos de água. Os ovos foram desinfestados superficialmente com NaOCl 0,5% durante 30 segundos e lavados a seguir, com água destilada, quando, então, foram colocados em câmaras de eclosão

montadas em placas de Petri e que receberam água destilada e solução de $ZnCl_2$ (cloreto de zinco) para ajudar na eclosão de ovos. Essas câmaras foram mantidas em BOD a temperatura de 24°C. A cada período de 24 horas, após o estabelecimento das câmaras de eclosão, foram coletados J_2 , os quais foram inoculados em 3 inoculações, em plântulas de soja com quatro semanas após o plantio nos vasos, totalizando 8.000 a 11.000 J_2 inoculados/vaso.

Seis dias após a última inoculação, as plântulas inoculadas foram retiradas dos vasos cuidadosamente e as raízes lavadas em água destilada para remoção da areia. A seguir, as raízes foram imersas em NaOCl 0,5% por 30 segundos e novamente lavadas. As plântulas assim inoculadas foram colocadas nas garrafas, preparadas como descrito anteriormente e pela abertura na lâmina de isopor da parte superior adicionou-se solução nutritiva até a altura de 2/3 do recipiente. A cada 5 dias trocou-se a solução nutritiva abrindo-se a pinça Mohr e repondo-a pela parte superior.

As plântulas inoculadas foram mantidas em temperatura ambiente no Laboratório de Nematologia. Esse ensaio foi conduzido no período de outono-inverno.

3.2.3 Coleta e incubação de fêmeas de *Heterodera glycines*

Após 15 dias da transferência das plântulas inoculadas para o sistema, foi então observado o sistema radicular das mesmas no microscópio estereoscópico, verificando a presença ou não de fêmeas de *Heterodera glycines*. Constatada a presença de fêmeas ainda com coloração branca-amarelada, as mesmas foram

quantificadas e retiradas, e colocadas em frascos de vidro esterilizados e com água destilada. As plantas sem fêmeas retornavam para o sistema hidropônico. A seguir, as fêmeas obtidas, foram desinfestadas com NaOCl 0,5% por 30 segundos mais cloranfenicol à 100 ppm, plaqueadas em ágar-água, incubadas em câmara de incubação por turnos de 12 horas de luz por 12 horas de escuro, à temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 4 dias para a constatação do parasitismo de algum fungo ou bactéria. Desta forma, as fêmeas estariam em condições de uso no teste de parasitismo dos fungos isolados em 3.1.

3.3 Parasitismo de fungos isolados de cistos de *Heterodera glycines*

3.3.1 Análise da patogenicidade em fêmeas, ovos e J₂ de *Heterodera glycines*

As fêmeas que não apresentavam contaminação por fungos ou bactérias foram utilizadas no teste para avaliação da patogenicidade de fungos isolados de cistos de *H. glycines*. Trabalhou-se inicialmente com o fungo *Fusarium oxysporum* que foi isolado e identificado conforme descrito em 3.1. Dez fêmeas foram colocadas em cada uma das 4 placas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo meio ágar-água. Em cada uma das três placas foi colocado um disco de 5 mm de diâmetro retirados das bordas da colônia do fungo *Fusarium oxysporum* previamente cultivado em meio BDA por 7 dias. Na quarta placa colocaram apenas fêmeas, sem o fungo. As placas foram seladas com rolopack e incubadas por 10 dias aproximadamente, em câmara de incubação em 12 horas luz por 12 horas de escuro à temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$.

Após este período, as fêmeas foram retiradas, observadas no microscópio estereoscópico e esmagadas em seguida com o auxílio de estilete esterelizado. Os ovos emergidos de cada fêmea foram observados cuidadosamente e estimados. Da mesma forma foram estimados aqueles parasitados pelo fungo e o número de juvenis do segundo estágio. Os ovos e juvenis de cada fêmea, em suspensão aquosa, foram colocados numa célula da placa de Elisa e mantidos por 15 dias em BOD à temperatura de 24°C. A oxigenação da suspensão aquosa foi mantida repondo-a com água batida em liquidificador por 30 segundos diariamente.

A cada 4 dias foram contados os J₂ eclodidos.

3.3.2 Análise da patogenicidade em fêmeas de *Meloidogyne* spp.

Neste ensaio foram utilizadas 320 fêmeas de *Meloidogyne* spp. e oito isolados fúngicos de cistos de *H. glycines* e identificados conforme descrito em 3.1: *Fusarium solani*, *F. oxysporum*, *Paecilomyces variotii*, *P. lilacinus* (2 isolados), *Dactylaria* sp. (2 isolados), *Gliocladium viride*. Os fungos foram crescidos em meio BDA (batata dextrose ágar) por 7 dias.

As fêmeas para esse teste foram previamente selecionadas quanto a ausência de fungos e bactérias contaminantes como descrito em 3.2.3. Essas fêmeas foram colocadas em placas de Petri de 9 cm de diâmetro seguido de disco do fungo-teste conforme descrito em 3.3.1. Seguiu-se, neste ensaio, a mesma metodologia descrita em 3.3.1, avaliando-se também o número total de ovos por fêmea, número de ovos parasitados pelo fungo-teste, bem como o número total de J₂ eclodido. Foi considerado parasitado o ovo em que se observaram hifas fúngicas emergindo da casca.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Isolamento e identificação de fungos associados à cistos de *Heterodera glycines*

Foi grande a diversidade de espécies fúngicas encontradas numa mesma amostra (Tabela 2). Porém, com predominância das espécies de *Fusarium* que ocorreram em 68% dos isolados obtidos. Na maioria dos locais amostrados, *Fusarium solani* e *Fusarium oxysporum* estavam associados a outros gêneros de fungos (Tabela 2). Morgan-Jones e Rodriguez-Kábana (1987) e Chen et al. (1994) encontraram espécies de *Fusarium* como os mais frequentes parasitos de cistos de *H. glycines*. No Brasil, espécies de *Fusarium* também já foram isolados de cistos de *H. glycines* por Silva, Piza e Carneiro (1993) em amostras oriundas de Nova Ponte (MG) e Campo Verde (MT).

Entre os demais fungos encontrados em cistos de *H. glycines* (Tabela 2), *Gliocladium* ocorreu em 2,6% das amostras e, coincidentemente naquelas do município de Nova Ponte (MG) onde Silva, Piza e Carneiro (1993), também o encontraram, podendo assim constituir-se em flora adaptada àquelas condições de solo e clima. *Paecilomyces* ocorreu em três localidades, sendo um fungo conhecido como parasita de ovos muito frequente em diversas culturas e localidades no Sul de

TABELA 2. Fungos isolados de cistos de *Heterodera glycines*, em diferentes municípios, nos estados de Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso do Sul, Paraná.

| Localidades | Espécies | Isolados (Nº) |
|--------------------|---|---------------|
| Lavras-MG | <i>Fusarium oxysporum</i> Schlecht | 3 |
| | <i>Fusarium solani</i> | 1 |
| Nova Ponte-MG | <i>Fusarium oxysporum</i> | 1 |
| | <i>Fusarium solani</i> | 2 |
| | <i>Paecilomyces variotii</i> Bain | 2 |
| | <i>Gliocladium viride</i> Matr. | 1 |
| Iraí de Minas-MG | <i>Fusarium solani</i> (Mart.) Sacc. | 5 |
| | <i>Fusarium oxysporum</i> | 2 |
| | <i>Scytalidium</i> sp. | 2 |
| | <i>Dactylaria</i> sp. | 2 |
| | <i>Paecilomyces lilacinus</i> (Thom) Samson | 1 |
| Chapadão do Céu-GO | <i>Dactylaria</i> sp. | 1 |
| | <i>Paecilomyces lilacinus</i> | 1 |
| | <i>Fusarium oxysporum</i> | 1 |
| | <i>Fusarium solani</i> | 1 |
| Chapadão do Sul-MS | <i>Fusarium solani</i> | 3 |
| | <i>Fusarium oxysporum</i> | 1 |
| Londrina-PR | <i>Fusarium solani</i> | 3 |
| | <i>Fusarium oxysporum</i> | 3 |
| | <i>Penicillium</i> sp. | 1 |
| | <i>Eurotium repens</i> (Anamorfo: <i>Aspergillus repens</i>) | 1 |

Minas Gerais (Ribeiro e Campos, 1993) e, de grande distribuição em solos de todo o mundo com maior frequência nos solos agriculturáveis (Domsch, Gams e Anderson, 1980). *Scytalidium* sp. e *Penicillium* sp. foram identificados em 5% e 2,6%, das localidades, respectivamente, concordando assim com Gintis, Morgan-Jones e Rodriguez-Kábana (1982) que os encontrou em baixo nível parasitando cistos de

H. glycines no estado da Carolina do Norte (EUA). Com baixa incidência foram ainda encontrados em cistos, *Dactylaria* sp. e *Eurotium repens*.

Uma vez observada a grande ocorrência de *Fusarium* nos cistos de *H. glycines*, decidiu-se estudar mais detalhadamente a freqüência da incidência desse fungo numa população maior de cistos. Desta forma, observou-se que, 25 a 60% dos cistos de *Heterodera glycines* obtidos de 4 localidades continham *Fusarium* spp. A freqüência da ocorrência de outros fungos (Tabela 3), variou bastante e foi bem menor do que aquela observada em *Fusarium*. Isto demonstra que as espécies de *Fusarium* constituem-se no maior componente da flora fúngica desses cistos nos locais amostrados.

TABELA 3. Freqüência da ocorrência de fungos em cistos de *Heterodera glycines* em:

- 1) Nova Ponte (MG), 2) Iraí de Minas (MG), 3) Chapadão do Sul (MS) e
4) Chapadão do Céu (GO).

| Fungos | Amostras | | | |
|--------------------------|----------|----|----|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 |
| <i>Fusarium</i> spp. | 50* | 60 | 45 | 25 |
| <i>Gliocladium</i> spp. | 5 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Paecilomyces</i> spp. | 0 | 5 | 0 | 5 |
| <i>Dactylaria</i> spp. | 0 | 5 | 0 | 5 |
| <i>Aspergillus</i> spp. | 0 | 5 | 0 | 5 |
| <i>Trichoderma</i> spp. | 0 | 10 | 0 | 15 |
| <i>Scytalidium</i> spp. | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Penicillium</i> spp. | 0 | 0 | 0 | 5 |

* Porcentagem de cistos parasitados em relação ao total trabalhado por amostra.

4.2 Produção de fêmeas de *H. glycines* em hidroponia

Das 16 plântulas de soja inoculadas, 5 delas não desenvolveram fêmeas adultas de *H. glycines* (Tabela 4) escapando assim da infecção por esse patógeno, talvez devido as condições de temperatura afetando a movimentação e penetração dos J₂, já que as plantas foram mantidas em condições ambientais de laboratório no período de outono-inverno. As 11 plantas restantes renderam 103 fêmeas. Fêmeas maduras ou pré-cistos foram produzidas a partir de 15 dias após a inoculação dos J₂ nas condições desse ensaio. O número de fêmeas ou pré-cisto por planta variou bastante chegando algumas plantas a produzir 4 vezes a média final (Tabela 4). Esse número poderá ser elevado aumentando a densidade de inóculo, os períodos de inoculação e melhorando as condições para o parasitismo desse nematóide (Wallace, 1968). A hidroponia também tem sido empregada com sucesso na produção de inóculo de *Meloidogyne javanica* em plantas de tomate (Lambert et al., 1992).

O parasitismo de fungos e bactérias nas fêmeas também ocorreu no sistema hidropônico. De 79 fêmeas estimadas aos 15 dias após a inoculação (1ª avaliação), 29 apresentaram parasitismo de fungos. Aos 30 dias após a inoculação, obtiveram-se 24 fêmeas, sendo 11 delas infectadas com fungos e todas as 24 fêmeas com bactérias, apesar de toda a assepsia seguida na instalação do sistema hidropônico. Aos 45 dias após a inoculação fez-se a última observação sem constatar nenhuma fêmea desenvolvida no sistema radicular tendo, por conseguinte, completado o ciclo, todos os J₂ que penetraram nas plântulas de soja. Neste estágio das plantas observou-se escurecimento das raízes. Portanto, conseguiu-se 48,54% de fêmeas produzidas sem parasitismo de fungos ou bactérias, chamadas assim de

fêmeas viáveis (Tabela 4), indicando a viabilidade do sistema para uso, quando se pretende obter fêmeas ou cistos para testes de patogenicidade isentos de fungos e bactérias. Maior porcentagem dessas fêmeas isentas de fungos e bactérias ocorreu nos primeiros 15 dias após a inoculação. O parasitismo de fêmeas de *H. glycines* utilizando-se técnica de cultivo monoxênico para a produção de inóculo de *Meloidogyne* spp. em sistema hidropônico, foi também observado por Lauritis, Rebois e Graney (1982), Ferris, Schneider e Semenov (1984) e Lambert et al. (1992).

TABELA 4. Produção de fêmeas de *Heterodera glycines* em 16 plantas de soja cv. Cristalina cultivadas em hidroponia após três avaliações.

| Planta (Nº de ordem) | Total de Fêmeas | Fêmeas Viáveis* | %Fêmeas Viáveis* |
|-------------------------|--------------------|--------------------|---------------------|
| 1 | 31 | 20 | 64,51 |
| 2 | 2 | 0 | 0 |
| 3 | 0 | 0 | 0 |
| 4 | 0 | 0 | 0 |
| 5 | 13 | 8 | 61,53 |
| 6 | 0 | 0 | 0 |
| 7 | 1 | 0 | 0 |
| 8 | 6 | 2 | 33,33 |
| 9 | 10 | 2 | 20,00 |
| 10 | 5 | 1 | 20,00 |
| 11 | 23 | 12 | 52,17 |
| 12 | 0 | 0 | 0 |
| 13 | 3 | 1 | 33,33 |
| 14 | 3 | 2 | 66,67 |
| 15 | 6 | 2 | 33,33 |
| 16 | 0 | 0 | 0 |
| Total | 103 | 50 | 48,54% |

*Sem fungos ou bactérias como contaminantes.

Esse sistema aqui desenvolvido é de baixo custo, requer pouco espaço físico no laboratório e a produção de fêmeas pode ser incrementada aumentando-se a densidade de inóculo.

Além do uso aqui preconizado, esse sistema poderá fornecer nematóides para estudos moleculares, de nematicidas, e outros.

4.3 Parasitismo de fungos isolados de cistos em fêmeas de *H. glycines* e *Meloidogyne* spp.

Fusarium oxysporum parasitou superficialmente todas as fêmeas de *H. glycines* empregadas no teste. Observaram-se hifas vegetativas e reprodutivas aderidas às paredes do corpo das fêmeas e dos ovos. Das fêmeas parasitadas obtiveram-se 3.059 ovos, porém nem todos eles parasitados. Hifas emergindo dos ovos (Figura 2) ocorreram em 1,10% do total, considerado baixo parasitismo conforme Chen et al. (1994). Morgan-Jones e Rodriguez-Kábana (1987) consideraram *Fusarium oxysporum* como um colonizador de cistos e ovos, de baixo nível de parasitismo, encontrado frequentemente dentro dessas estruturas, podendo em alguns casos ser considerado como oportunista. Observaram ainda a ineficiência de alguns isolados de *Fusarium* sp. no controle de nematóides. Chen et al. (1994) consideraram *F. oxysporum* como um fungo de alta frequência em cistos de *H. glycines*, porém de parasitismo moderado. Mesmo nível de parasitismo também foi observado por Stirling e West (1991) em inoculações de *F. oxysporum* em cistos e ovos de diversos nematóides. Stiles et al. (1993), inocularam *F. oxysporum* em raízes antes inoculadas com J₂ de *Heterodera glycines* e não observaram redução no

parasitado por *Paecilomyces lilacinus*.

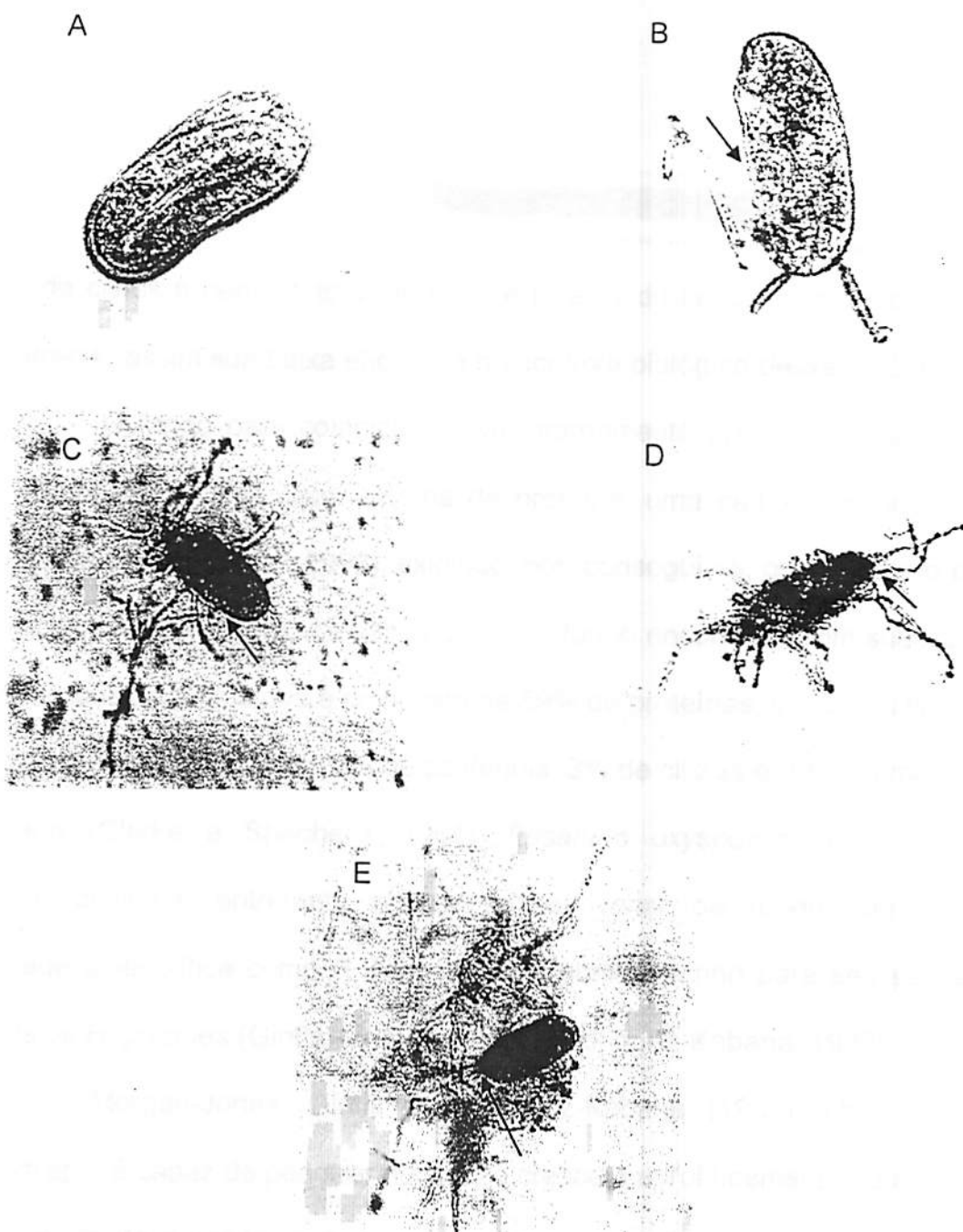


FIGURA 2. Parasitismo de fungos isolados de cistos, em ovos de *H. glycines* e *Meloidogyne* spp. A) Não parasitado. B) *H. glycines* parasitado por *Fusarium oxysporum*. C) *Meloidogyne* spp. parasitado por *Fusarium oxysporum*. D) *Meloidogyne* spp. parasitado por *Dactylaria* sp. E) *Meloidogyne* spp. parasitado por *Paecilomyces lilacinus*.

F. oxysporum não consiga romper a casca do ovo, a destruição da parede do cisto no campo deverá concorrer, principalmente, para a diminuição do período de proteção

número de cistos e nem no total de ovos e juvenis do segundo estágio por planta, demonstrando assim sua baixa eficiência no controle biológico desse patógeno.

O fungo para colonizar o ovo internamente precisará romper a casca que é composta de uma capa externa de proteína, uma camada quitinosa e uma membrana lipóide (Tihohod, 1993), exigindo, por conseguinte, que o mesmo produza quitinase. Uma vez penetrada a casca do ovo o fungo encontrará bom substrato para o seu crescimento pois o ovo é composto de 59% de proteínas, 9% de quitina, 7% de carboidratos, 7% de lipídeos, 3% de polifenóis, 3% de cinzas e 20% de material não hidrolizado (Clarke e Shepherd, 1964). *Fusarium oxysporum* e *F. solani* não produzem quitinase entretanto podem se aproveitar de fungos de solo com capacidade quitinolítica como *P. lilacinus* para abrir caminho para seu parasitismo, nos ovos de *H. glycines* (Gintis, Morgan-Jones, Rodriguez-Kábana, 1983).

Morgan-Jones, Gintis e Rodriguez-Kábana (1981), observaram que *Fusarium* spp. é capaz de penetrar no cisto e crescer saprofiticamente no seu interior, mas deixando de parasitar o ovo, e que para invadirem os ovos é necessário um enfraquecimento predisposto por desordens fisiológicas causadas pelo próprio crescimento do fungo. Ainda segundo os autores, existe claramente uma associação entre o potencial de colonização dos patógenos como *Fusarium oxysporum* e *F. solani* e os cistos de *H. glycines*. Morgan-Jones e Rodriguez-Kábana (1981) sugeriram que *Fusarium oxysporum*, *F. solani* e *Neocosmospora vasinfecta* não são normalmente parasitas de ovos de nematóides mas existe um frequente acúmulo de hifas desse fungo dentro de cistos de *Heterodera glycines*. Entretanto mesmo que *F. oxysporum* não consiga romper a casca do ovo, a destruição da parede do cisto no campo deverá concorrer, principalmente, para a diminuição do período de proteção

dessa barreira a exposição dos ovos à água, possibilitando assim, a eclosão dos ovos em condições de ausência de hospedeiro o que reduziria rapidamente a população desse patógeno no campo.

Os fungos *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *Dactylaria* sp. (2 isolados), *Paecilomyces lilacinus* (2 isolados), *P. variotii* e *Gliocladium viride* isolados de cistos de *H. glycines* parasitaram superficialmente e internamente as fêmeas de *Meloidogyne*. Hifas fúngicas foram observadas emergindo dos ovos das fêmeas parasitadas (Figura 2) porém com nível de infestação diferenciado entre as espécies fúngicas testadas (Figura 3). Vários autores tem observado o parasitismo de *Paecilomyces lilacinus* em ovos de *Meloidogyne* (Jatala, Kaltenback e Bocangel, 1979, Dunnet et al., 1982; Morgan-Jones e Jones-Kábana, 1984; Carneiro e Gomes, 1993; Ribeiro e Campos, 1993). Esse fungo penetra através de pequenos poros formados na camada vitelínica e invadem os ovos de *Meloidogyne*, tornando-os intumescidos, como resultado de mudanças ultra-estruturais e de permeabilidade das camadas envoltórias do ovo (Morgan-Jones e Rodriguez-Kábana, 1984). Entretanto, Gintis, Morgan-Jones e Rodriguez-Kábana (1983), demonstraram a capacidade de *Paecilomyces variotii* em colonizar ovos de *Heterodera glycines*. Os ovos assim colonizados apresentavam-se frequentemente intumescidos e sem cor, alguns pareciam rachados, e outros continham glóbulos lipídicos. Godoy, Rodriguez-Kábana e Morgan-Jones (1982) observaram que isolados de *F. oxysporium* e *F. solani* foram capazes de parasitar ovos de *Meloidogyne arenaria* "in vitro".

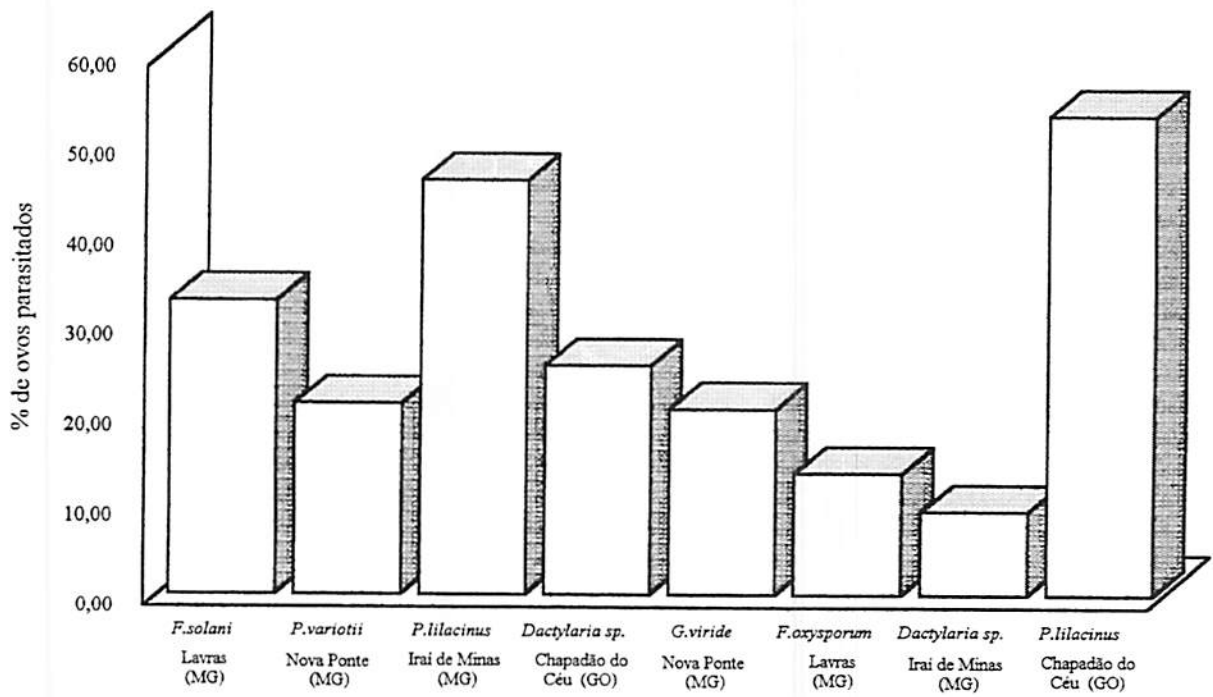


FIGURA 3. Parasitismo de fungos isolados de cistos de *Heterodera glycines* em fêmeas de *Meloidogyne* spp.

5 CONCLUSÕES

1. Foram isolados de cistos de *H. glycines* as seguintes espécies fúngicas: *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Gliocladium viñide*, *Eurotium repens*, *Dactylaria* sp., *Penicillium* sp., *Scytalidium* sp., *Paecilomyces lilacinus* e *P. variotii*.

2. *Fusarium oxysporum* e *F. solani* foram as espécies mais frequentes em cistos de *H. glycines*.

3. Obteve-se através do sistema hidropônico 48,54% de fêmeas isentas de fungos e/ou bactérias.

4. *Fusarium oxysporum* parasitou fêmeas de *H. glycines* e também os ovos das fêmeas parasitadas.

5. Maior parasitismo de ovos de *Meloidogyne* spp. foi observado com os fungos *Paecilomyces lilacinus* (2 isolados) e *Fusarium solani*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BORKERT, C.M.; YORINORI, J.T.; FERREIRA, B.S.C.; ALMEIDA, A.M.R.; FERREIRA, L.P.; SFREDO, G.J. Seja o doutor da sua soja. **Informações Agrônômicas**, Piracicaba, n.66, p.1-16, jun. 1994. (Arquivo do Agrônomo, 5).
- BURSNALL, L.A.; TRIBE, T.H. Fungal parasitism in cysts of *Heterodera* II. Eggs parasites of *H. schachtii*. **Transactions of the British Mycological Society**, Inglaterra, v.62, n.3, p.595-601, June 1974.
- CARNEIRO, R.M.D.G.; GOMES, C.B. Metodologia e testes de patogenicidade de *Paecilomyces lilacinus* e *Paecilomyces fumosoroseus* em ovos de *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v.17, p.66-75, 1993.
- CARRIS, L.M.; GLAWE, D.A. Isolation of the soybean pathogens *Corynespora cassicola* and *Phialophora gregata* from cysts of *Heterodera glycines* in Illinois. **Mycologia**, Bronx, v.78, n.3, p.503-506, May. 1986.
- CHEN, S.Y.; DICKSON, D.W.; KIMBROUGH, J.W.; Mc SORLEY, R.; MITCHELL, D.J. Fungi associated with females and cysts of *Heterodera glycines* in a Florida soybean field. **Journal of Nematology**, Iowa, v.26, n.2, p.296-303, June 1994.
- CLARKE, A.J.; SHEPHERD, A.M. Synthetic hatching agents for *Heterodera schachtii* and their mode of action. **Nematologica**, Leiden, v.10, p.431-453, 1964.
- CLOVIS, C.J.; NOLAN, R.A. Fungi associated with cysts, eggs and juveniles of the golden nematode (*Globodera rortochiensis*) in Newfoundland. **Nematologica**, Newfoundland, v.29, p.346-356, sept. 1983.
- CRUMP, D.H. Effect of time sampling, method of isolation and age of nematode on the species of fungi isolated from females of the *Heterodera schachtii* and *H. avenae*. **Revue de Nematologie**, Bondy, v.10, n.3, p.369-373, 1987.
- DOMSCH, K.H.; GAMS, W.; ANDERSON, T.H. **Compendium of soil fungi**. London: Academic Press, 1980. v.1, 859p.

- DROPKIN, V.H.; HELGESON, J.P.; UPPER, C.D. The hypersensitive reaction of tomato resistant to *Meloidogyne incognita*: Reversal by cytokinins. **Journal of Nematology**, Iowa, v.1, p.55-61, 1969.
- FERRIS, H.; SCHNEIDER, S.M.; SEMENOFF, M.C. Distributed egg production functions for *Meloidogyne arenaria* in grape varieties and consideration of the mechanistic relationship between plant and parasite. **Journal of Nematology**, Iowa, v.16, n.2, p.178-183, Apr. 1984.
- FREIRE, F.C.O.; BRIDGE, J. Parasitism of eggs, female and juveniles of *Meloidogyne incognita* by *Paecilomyces lilacinus* and *Verticillium chlamydosporium*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.10, n.3, p.577-596, Oct. 1985.
- GINTIS, B.O.; MORGAN-JONES, G.; RODRIGUEZ-KÁBANA, R. Fungi associated with several developmental stages of *Heterodera glycines* from an Alabama soybean yield soil. **Nematropica**, Florida, v.13, n.2, p.181-200, 1983.
- GINTIS, B.O.; MORGAN-JONES, G.; RODRIGUEZ-KÁBANA, R. Mycoflora of young cysts of *Heterodera glycines* in North Carolina soils. **Nematropica**, Florida, v.12, n.2, p.295-303, 1982.
- GODOY, G.; RODRIGUEZ-KÁBANA, R.; MORGAN-JONES, G. Parasitism of eggs of *Heterodera glycines* and *Meloidogyne arenaria* fungi isolated from cysts of *H. glycines*. **Nematropica**, Florida, v.12, n.1, p.111-119, 1982.
- JATALA, P. Biological control of plant-parasitic nematodes. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.24, p.453-489, 1986.
- JATALA, P.; KALTENBACH, R.; BOCANGEL, M. Biological control of *Meloidogyne incognita acrita* and *Globodera pallida* on potato. **Journal of Nematology**, Iowa, v.11, n.2, p.303, 1979. (Abst.).
- KERRY, B.R. Biocontrol: Fungal parasites of female cyst nematodes. **Journal of Nematology**, Inglaterra, v.12, n.4, p.253-259, Out. 1980.
- 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, v.23, p.191-201, 1977.
- KIM, D.G.; RIGGS, R.D. Characteristics and efficacy of a sterile hyphomycetes (ARF 18), a new biocontrol agent for the *Heterodera glycines* and other nematodes. **Journal of Nematology**, Fayetteville, v.23, n.3, p.275-282, July 1991.
- LAMBERT, K.M.; TEDFORD, E.C.; CASWELL, E.P.; WILLIAMSON, V.M. A system for continuous production of root-knot nematode juveniles in hydroponic culture. **Phytopathology**, Davis, v.82, n.5, p.512-515, May 1992.

- LAURITIS, J.A.; REBOIS, R.V.; GRANEY, L.S. Technique for gnotobiotic cultivation of *Heterodera glycines* Ichinohe on *Glycine max* (L.) Merr. **Journal of Nematology**, Iowa, v.14, n.3, p.422-424, July 1982.
- LORDELLO, L.G.E. **Nematóide das plantas cultivadas**. 8.ed. São Paulo: Nobel, 1988. 314p.
- MENDES, M.L. O nematóide do cisto da soja. In: ARANTES, N.E.; MELO DE SOUZA, P.I. (Ed.). **Cultura da soja nos cerrados**. Piracicaba: POTAFOS, 1993. p.399-416.
- MEYER, S.L.F.; HUETTEL, R.N.; SAYRE, R.M. Isolation of fungi from *Heterodera glycines* and in vitro bioassays for their antagonism to eggs. **Journal of Nematology**, Beltsville, v.22, n.4, p.532-537, Oct. 1990.
- MORGAN-JONES, G.; RODRIGUEZ-KÁBANA, R. Fungi associated with cysts of *Heterodera glycines* in Alabama soil. **Nematropica**, Alabama, v.11, n.1, p.69-74, 1981.
- MORGAN-JONES, G.; GINTIS, B.O.; RODRIGUEZ-KÁBANA, R. Fungal colonization of *Heterodera glycines* cysts in Arkansas, Flórida, Mississippi and Missouri soils. **Nematropica**, Flórida, v.11, n.2, p.155-183, 1981.
- MORGAN-JONES, G.; RODRIGUEZ-KÁBANA, R. Species of *Verticillium* and *Paecilomyces* as parasites of cyst and root-knot nematodes. **Phytopathology**, Davia, v.74, n.5, p.831, May 1984.
- MORGAN-JONES, G.; RODRIGUEZ-KÁBANA, R. Fungal biocontrol for the management of nematodes. In: VEECH, J. DICKSON, D.W.; Eds., **Vistas on Nematology: a comemoration of the twenty-fifth aniversario of the Society of Nematologists**. Maryland: E.D. Painter Printting Co., 1987. p.94-99.
- RIBEIRO, R.C.F.; CAMPOS, V.P. Controle de *Meloidogyne javanica* por fungos parasitas de ovos. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v.17, p.193-203, 1993.
- SILVA, J.F.V.; PIZA, S.M.; CARNEIRO, R.G. Fungos associados a cistos de *Heterodera glycines* no Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, 17, Jaboticabal, 1993. **Resumos...** Jaboticabal: UNESP/Sociedade Brasileira de Nematologia, 1993. p.70.
- STILES, C.M.; GLAWE, D.A.; NOEL, G.R.; PATAKY, J.K. Reproduction of *Heterodera glycines* on soybean in nonsterile soil infested with cyst-colonizing fungi. **Nematropica**, Illinois, v.23, n.1, p.81-89. 1993.
- STIRLING, G.R.; WEST, L.M. Fungal parasites of root-knot nematode eggs from tropical and sub-tropical regions of Australia. **Australasian Plant Pathology**, South Perth, v.20, p.149-154, 1991.

- TIHOHOD, D. **Nematologia agrícola aplicada**. Jaboticabal: FUNESP, 1993. 372p.
- TIHOHOD, D.; SANTOS, J.M.dos. ***Heterora glycines*: Novo nematóide da soja no Brasil - detecção e medidas preventivas**. Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista, 1993. 21p. (Boletim, 04).
- WALLACE, H.R. The influence of aeration on survival and hatch of *Meloidogyne javanica*. **Nematologica**, Leiden, v.14, p.223-230, 1968.
- WILLCOX, J.; TRIBE, H.T. Fungal parasitism of cysts of *Heterodera*. I Preliminary investigations. **Transactions British Mycological Society**, Inglaterra, v.62, n.3, p.585-594, June 1974.
- ZUCKERMAN, B.M.; BRZESKI, M.W. Methods for the study of plant parasitic nematodes in gnotobiotic root culture. **Nematologica**, Leiden, v.11, p.453-466, 1966.

APÊNDICE

APÊNDICE 1

Parasitismo de fungos isolados de cistos de *Heterodera glycines* em ovos de *Meloidogyne* spp.

| Isolados fúngicos | Total de ovos* | Número de J ₂ ** | % de parasitismo* |
|-------------------------------|----------------|-----------------------------|-------------------|
| Testemunha | 34 | 1 | - |
| <i>Fusarium solani</i> | 27 | 0 | 32,62 |
| Testemunha | 11 | 0 | |
| <i>Paecilomyces variotti</i> | 15 | 0 | 21,17 |
| Testemunha | 41 | 0 | |
| <i>P. lilacinus</i> | 32 | 0 | 46,05 |
| Testemunha | 32 | 0 | |
| <i>Dactylaria</i> sp. | 35 | 0 | 25,41 |
| Testemunha | 49 | 0 | |
| <i>Glodadium viride</i> | 12 | 0 | 10,63 |
| Testemunha | 73 | 0 | |
| <i>Fusarium oxysporum</i> | 27 | 0 | 13,50 |
| Testemunha | 77 | 0 | |
| <i>Dactylaria</i> sp. | 22 | 1 | 9,33 |
| Testemunha | 19 | 0 | |
| <i>Paecilomyces lilacinus</i> | 27 | 0 | 53,40 |

* Média de 3 repetições.

**J₂ - Juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne* spp.