

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**AGENTES MICROBIANOS NO CONTROLE DE NEMATÓIDES E  
FUNGOS FITOPATOGÊNICOS DE SOJA E SUA  
COMPATIBILIDADE COM AGROQUÍMICOS**

HENRIQUE TEIXEIRA NUNES

Engenheiro Agrônomo

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Maio de 2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**AGENTES MICROBIANOS NO CONTROLE DE NEMATÓIDES E  
FUNGOS FITOPATOGÊNICOS DE SOJA E SUA  
COMPATIBILIDADE COM AGROQUÍMICOS**

Henrique Teixeira Nunes

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Monteiro

Co-orientador: Prof. Dr. Alan William Vilela Pomella

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Microbiologia Agropecuária.

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Junho de 2008

Nunes, Henrique Teixeira  
N972a Agentes microbianos no controle de nematóides e fungos  
fitopatogênicos de soja e sua compatibilidade com agroquímicos  
/ Henrique Teixeira Nunes. -- Jaboticabal, 2008  
xiii, 77 f. : il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de  
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2008

Orientador: Antonio Carlos Monteiro

Banca examinadora: Clélia Aparecida Lunes Lopera, Ely Nahas,  
Marineide Mendonça Aguilera, Margarete Camargo

Bibliografia

1. Soja-controle biológico de nematóides. 2. Fungos fitopatogênicos  
de solo. 3. Fungos nematófagos. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de  
Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 633.34:631.467

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço  
Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**HENRIQUE TEIXEIRA NUNES** – nascido em 02 de agosto de 1967, em Patos de Minas – MG. Graduiu-se em Agronomia pela UFV/Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG, em dezembro de 1989. Em 2004 obteve o Título de Mestre em Agronomia (Economia Agrária) no Departamento de Economia, Administração e Sociologia da ESALQ/USP – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo. Foi professor da Unioeste – Universidade Estadual do Paraná, - Marechal Cândido Rondon – PR nas disciplinas de Economia, Teoria Econômica e Economia Brasileira, além de coordenador do Programa “Bom Emprego” em convenio com o Banco do Estado do Paraná (Banestado), coordenador do Projeto Índices de Preços da Cesta Básica da UNIOESTE, em convênio com a Associação Comercial e Industrial de Marechal Cândido Rondon (ACIMACAR) e coordenador do Projeto Pedagógico de Implantação do Curso de Agronomia da UNIOESTE - Marechal Cândido Rondon. Em 2003 foi estagiário do Laboratório de Nematologia da FCAV/UNESP - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, da Universidade Estadual Paulista - Jaboticabal – SP na área de controle biológico de nematóides com fungos nematófagos. Em 2004 ingressou como aluno regular do curso de Doutorado em Microbiologia Agropecuária na mesma universidade. Atualmente é produtor rural, professor da SESPA – Sociedade de Ensino Superior de Patos de Minas – Patos de Minas – MG, nas disciplinas de Fundamentos de Agronegócios, Cadeias Produtivas no Agronegócio, Estatística, Economia e Métodos Quantitativos e diretor da empresa HT Carbon, em Patos de Minas – MG.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Monteiro pela valiosa orientação, disponibilidade e amizade;

Ao Prof. Dr. Alan Willian Vilela Pomella pela sessão do Laboratório de Biocontrole Farroupilha Ltda e áreas rurais da empresa Sementes Farroupilha Ltda para a realização dos ensaios;

Ao Prof. Dr. Jaime Maia dos Santos pela primeira acolhida em Jaboticabal e todo o suporte técnico oferecido;

À Prof. Dra. Maria Amélia dos Santos pelo processamento de amostras e orientações;

Aos professores Clélia Aparecida Lunes Lopera, Ely Nahas, Marineide Mendonça Aguilera, Margarete Camargo, Roberto Alves de Oliveira, Eliana Gertrudes Macedo Lemos, Ruben Pablo Schocken-Iturrino pela participação nas bancas examinadoras, e valiosas correções e sugestões;

À Edna, Rosângela, Assis e todos os amigos do Laboratório de Microbiologia;

A minha namorada Eliane Ribeiro Cardoso pela compreensão, ajuda, carinho e amor;

Ao pessoal do laboratório de Nematologia, China, Sandra, André, Pedro e Dalton por toda ajuda;

À minha família Gogóia, Anizeu, Luciana e Fernanda pelo carinho e apoio;

Ao “seu” Nilton e família por toda ajuda e amizade;

Aos colegas de pós-graduação das áreas de Microbiologia Agropecuária e Nematologia Agrícola;

	Página
<b>RESUMO</b> .....	<b>vi</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>vii</b>
<b>I. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>II. OBJETIVOS</b> .....	<b>4</b>
2.1. Objetivos gerais .....	4
2.2. Objetivos específicos .....	4
<b>III. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>5</b>
3.1. Agentes Biológicos .....	5
3.2. Microrganismos Endofíticos e Antagonismo de Fungos Nematófagos a Fungos Patogênicos de Solo .....	9
3.3. Antagonismo de Fungos Nematófagos a Fungos Patogênicos de Solo...	10
3.4. Compatibilidade de Fungos Nematófagos a Agroquímicos .....	11
<b>IV. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>12</b>
4.1. Obtenção e Manutenção dos Agentes Biológicos de Controle.....	12
4.2. Obtenção dos Fungos Patogênicos de Solo.....	12
4.3. Obtenção do Inóculo de <i>Meloidogyne incognita</i> e <i>Heterodera glycines</i> .	13
4.4. Crescimento Micelial e Esporulação de <i>Paecilomyces lilacinus</i> e <i>Pochonia chlamydosporia</i> em dois substratos .....	16
4.5 Patogenicidade <i>in vitro</i> de <i>Paecilomyces lilacinus</i> e <i>Pochonia chlamydosporia</i> a Ovos de <i>Meloidogyne incognita</i> e <i>Heterodera glycines</i> ....	16
4.6 Compatibilidade dos Fungos Nematófagos e Nemix com Agroquímicos Utilizados na Cultura da Soja .....	17

<b>4.7 Antagonismo de <i>Pochonia chlamydosporia</i> e <i>Paecilomyces lilacinus</i> a <i>Fusarium solani</i> e <i>Rhizoctonia solani</i> .....</b>	<b>18</b>
<b>4.8. Potencial do Controle de <i>Meloidogyne incognita</i> Infectando Plantas de Soja em Casa de Vegetação .....</b>	<b>19</b>
<b>4.8.1. Tratamento de sementes .....</b>	<b>19</b>
<b>4.8.2 Plantio e infestação de <i>Meloidogyne incognita</i> .....</b>	<b>20</b>
<b>4.8.3. Aplicação em pós-emergência .....</b>	<b>20</b>
<b>4.8.4. Determinação do número de galhas, de ovos, de nematóides juvenis de <i>Meloidogyne incognita</i> presentes no sistema radicular e da matéria seca da raiz .....</b>	<b>21</b>
<b>4.8.5 Delineamento experimental e análise estatística .....</b>	<b>21</b>
<b>4.9. Controle de <i>Meloidogyne incognita</i> e <i>Heterodera glycines</i> com Fungos nematófagos e Nemix em Condições de Campo .....</b>	<b>21</b>
<b>4.10. Colonização de Raízes de Soja pelos Fungos Nematófagos e Nemix ....</b>	<b>25</b>
<b>V. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>26</b>
<b>5.1. Crescimento Micelial e Esporulação de <i>Paecilomyces lilacinus</i> e <i>Pochonia chlamydosporia</i> em dois substratos .....</b>	<b>26</b>
<b>5.2. Colonização de Raízes de Soja pelos Fungos Nematófagos .....</b>	<b>26</b>
<b>5.3 Patogenicidade <i>in vitro</i> de <i>Paecilomyces lilacinus</i> e <i>Pochonia chlamydosporia</i> a Ovos de <i>Meloidogyne incognita</i> e <i>Heterodera glycines</i> ....</b>	<b>28</b>
<b>5.4. Compatibilidade dos Fungos Nematófagos e Nemix com Agroquímicos Utilizados na Cultura da Soja .....</b>	<b>30</b>
<b>5.5. Antagonismo de <i>Pochonia chlamydosporia</i> e <i>Paecilomyces lilacinus</i> a</b>	

<b><i>Fusarium solani</i> e <i>Rhizoctonia solani</i> .....</b>	<b>30</b>
<b>5.6. Potencial do Controle de <i>Meloidogyne incognita</i> Infectando Plantas de Soja em Casa de Vegetação .....</b>	<b>33</b>
<b>5.6.1. Número de galhas de <i>Meloidogyne incognita</i> nas raízes da soja .....</b>	<b>33</b>
<b>5.6.2. Peso da matéria seca das raízes de soja .....</b>	<b>35</b>
<b>5.6.3. Número de ovos de <i>Meloidogyne incognita</i> nas raízes de soja .....</b>	<b>38</b>
<b>5.6.4. Número de juvenis de <i>Meloidogyne incognita</i> nas raízes de soja .....</b>	<b>40</b>
<b>5.7. Controle de <i>Meloidogyne incognita</i> e <i>Heterodera glycines</i> com Fungos nematófagos e Nemix em Condições de Campo .....</b>	<b>40</b>
<b>5.7.1. Experimentos Realizados na Fazenda Rio Brilhante (reboleira com <i>Meloidogyne incognita</i> .....</b>	<b>40</b>
<b>5.7.2. Experimentos Realizados na Fazenda São Francisco (reboleira com <i>Heterodera glycines</i> .....</b>	<b>43</b>
<b>VI. CONCLUSÕES .....</b>	<b>47</b>
<b>VII. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>48</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Aspecto geral dos vasos cultivados com soja em casa de vegetação.	14
Figura 2. Detalhe dos vasos cultivados com soja em casa de vegetação .....	15
Figura 3. Aspecto geral da área experimental cultivada com soja no Município de Coromandel – MG, 2008.....	24
Figura 4. Colonização de raízes de plantas proveniente de sementes de soja tratadas com <i>Pochonia chlamydosporia</i> , cultivadas em casa de vegetação ..	27
Figura 5. Ovo de <i>Meloidogyne incognita</i> colonizado por <i>Pochonia chlamydosporia</i> .....	29
Figura 6. Efeito dos fungos fitopatogênicos na emergência de plântulas de soja em solo estéril com 10 dias de idade após tratamento de sementes com agentes de biocontrole: PL: sementes tratadas com <i>Paecilomyces lilacinus</i> ; PC: sementes tratadas com <i>Pochonia chlamydosporia</i> , semeadas em solo inoculado com <i>Fusarium solani</i> ; PL+FS: sementes tratadas com <i>Paecilomyces lilacinus</i> , semeadas em solo inoculado com <i>F. solani</i> . Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Teste F para tratamentos: 5,09**; Desvio padrão: 0,77; C.V. (%): 9,80.	31
Figura 7. Efeito no número de plantas sadias após 30 dias de plantio em solo estéril provenientes de sementes de soja tratadas com agentes de biocontrole: PL: sementes tratadas com <i>Paecilomyces lilacinus</i> ; PC: sementes tratadas <i>P. chlamydosporia</i> ; RS: solo inoculado com <i>Rhizoctonia solani</i> ; FS: solo inoculado com <i>F. solani</i> . PL+RS: sementes tratadas com <i>Paecilomyces lilacinus</i> , semeadas em solo inoculado com <i>Rhizoctonia solani</i> ; PC+RS: sementes tratadas com <i>Pochonia chlamydosporia</i> ,	

semeadas em solo inoculado com *Rhizoctonia solani*; PL+FS: sementes tratadas com *Paecilomyces lilacinus*, semeadas em solo inoculado com *Fusarium solani*; PC+FS: sementes tratadas com *Pochonia chlamydosporia*, semeadas em solo inoculado com *Fusarium solani*. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Teste F para tratamentos: 12,86\*\*; Desvio padrão: 1,18; C.V. (%): 19,09. .... 32

Figura 8. Número de galhas de *Meloidogyne incognita* formadas nas raízes de soja após tratamento com os agentes biológicos e o agente químico, e inoculação do parasita. TEST: testemunha sem inoculação do nematóide e sem aplicação dos agentes de controle; TEST MEL: testemunha com inoculação de *Meloidogyne incognita*; PC TS: tratamento de sementes com *Pochonia chlamydosporia*; PL TS tratamento de sementes com *Paecilomyces lilacinus*; Nemix TS: tratamento de sementes com Nemix; Nemix TS+TPE: tratamento de sementes e aplicação em pós-emergência com Nemix; PLTS+TPE: tratamento de sementes e aplicação em pós-emergência com *Paecilomyces lilacinus*; Aldicarb: aplicação de Aldicarb em pós emergência; PCTS+TPE: tratamento de sementes e aplicação em pós-emergência com *Pochonia chlamydosporia*. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Teste F para blocos: 14,4\*\*; Teste F para tratamentos: 5,5\*\*; Desvio padrão: 2,40; C.V. (%): 36,7. .... 34

Figura 9. Peso da matéria seca das raízes de soja após tratamento com os

- agentes biológicos e o agente químico, e inoculação do parasita. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Teste F para blocos: 3,38\*\*; Teste F para tratamentos: 4,28\*\*; Desvio padrão: 0,47; C.V. (%): 16,3. .... 36
- Figura 10. Número de ovos de *Meloidogyne incognita* nas raízes de soja após tratamento com os agentes biológicos e o agente químico, e inoculação do parasita. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Teste F para blocos: 3,38\*\*; Teste F para tratamentos: 4,28\*\*; Desvio padrão: 0,47; C.V. (%): 16,3. .... 37
- Figura 11. Número de juvenis de *Meloidogyne incognita* nas raízes de soja após tratamento com os agentes biológicos e o agente químico, e inoculação do parasita em casa de vegetação. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Teste F para blocos: 0,35NS; Teste F para tratamentos: 13,18\*\*; Desvio padrão: 54,51; C.V. (%): 29,82. .... 39
- Figura 12. Número de juvenis de *Meloidogyne incognita* por 150 cc de solo sob cultivo de soja após tratamento com os agentes biológicos e o agente químico em área naturalmente infestada. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Teste F: 4,97\*\*; Desvio padrão: 148,81; C.V. (%): 32,09. PC: *Pochonia chlamydosporia*; PL: *Paecilomyces lilacinus*; TEST: Testemunha. .... 41
- Figura 13. Número de ovos e juvenis de *Meloidogyne incognita* nas raízes de soja após tratamento com os agentes biológicos e o agente químico, em

- área naturalmente infestada sob cultivo de soja. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Teste F para blocos: 0,44NS; Teste F para tratamentos: 4,38\*\*; Desvio padrão: 1199,3,51; C.V. (%): 30,88. PC; *Pochonia chlamydosporia*; PL; *Paecilomyces lilacinus*; Testemunha; TEST. .... 42
- Figura 14. Número de juvenis de *Heterodera glycinis* no solo cultivado sob soja: PC: *Pochonia chlamydosporia*; PL: *Paecilomyces lilacinus*; TEST: Testemunha. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Teste F: 5,96\*\*; Desvio padrão: 248,1; C.V. (%): 26,01. .... 44
- Figura 15. Número de ovos e juvenis de *Heterodera glycinis* por grama de raízes de soja em área naturalmente infestada: PC: *Pochonia chlamydosporia*; PL: *Paecilomyces lilacinus*; TEST: Testemunha. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Teste F para blocos: 0,74NS; Teste F para tratamentos: 3,98\*; Desvio padrão: 50,26; C.V. (%): 19,53. .... 45
- Figura 16. Número de cistos totais de *Heterodera glycines* no solo cultivado com soja: PC: *Pochonia chlamydosporia*; PL: *Paecilomyces lilacinus*; TEST: Testemunha. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Teste F: 14,49\*; Desvio padrão: 11,58; C.V. (%): 20,04. .... 46

**AGENTES MICROBIANOS NO CONTROLE DE NEMATÓIDES E  
FUNGOS DE SOLO EM SOJA E SUA COMPATIBILIDADE  
COM AGROQUÍMICOS**

**RESUMO** – Nematóides de galhas e cisto, além de fungos de solo causadores de doenças constituem importante grupo de patógenos da cultura da soja, sendo o manejo integrado uma das principais medidas de controle visando a redução de perdas econômicas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia dos fungos *Paecilomyces lilacinus* e *Pochonia chlamydosporia* e de um produto comercial à base de *Bacillus sp.* e do nematicida químico Aldicarb no controle de *Meloidogyne incognita*, *Heterodera glycines*, *Fusarium solani* e *Rhizoctonia*

*solani* em soja, variedade M-SOY 6101, para o que foram feitos ensaios *in vitro*, em casa de vegetação e em campo. Foi também avaliada a produção dos fungos em dois substratos, sua compatibilidade com agroquímicos utilizados em soja e capacidade de colonização de raízes. Os fungos colonizaram satisfatoriamente grãos de arroz e milho. Também foram compatíveis a inseticidas baseados em Fipronil. *P. chlamydosporia* colonizou endofiticamente raízes de soja. Nenhum dos fungos, utilizados em tratamento de sementes inibiu a germinação ou causou tombamento em plântulas de soja, porém não foram eficientes em prevenir esta doença quando o substrato estava inoculado com *F. solani* e *R. solani*. Nos ensaios em casa de vegetação com infestação de plantas com *M. incognita* apenas aldicarb reduziu o número de juvenis no solo e ovos nas raízes, porém os tratamentos biológicos reduziram o número de ovos nas raízes, tendo *P. lilacinus* favorecido a manutenção do peso seco das raízes. Nos ensaios em campo, em 2 áreas naturalmente infestadas com *M. incognita* e *H. glycines*, somente Aldicarb se mostrou eficiente na redução do número de juvenis no solo e de juvenis e ovos de *M. incognita* e *H. glycines* nas raízes de plantas de soja. *P. chlamydosporia* foi o agente mais efetivo na redução do número de cistos de *H. glycines* no solo, tendo também os tratamentos com *P. lilacinus* e aldicarb reduzido significativamente estes inóculos.

**Palavras- chave:** controle biológico de nematóides, fungos fitopatogênicos de solo, fungos nematófagos

## BIOLOGICAL CONTROL AGENTS AGAINST NEMATODES AND SOILBORNE FUNGI IN SOYBEAN AND COMPATIBILITY WITH AGROCHEMICALS

**SUMMARY** – Root-knot, cyst nematodes, and soilborne fungi are considered important pathogens for soybean crop. The objective of this work was to evaluate the efficacy of the fungi *Paecilomyces lilacinus* and *Pochonia chlamydosporia*, a commercial product based on *Bacillus* sp. and aldicarb on the control of *Meloidogyne incognita*, *Heterodera glycines* Ichinohe, *Fusarium solani* and *Rhizoctonia solani* on soybean, cultivar M-SOY 6101. The experiments were conducted *in vitro*, in greenhouse and in the field. Mass production of the fungi on rice and millet was tested, as well as the compatibility of them with some chemical pesticides. The colonization of the soybean roots by the fungi tested was also evaluated. The fungi were able to colonize and sporulate on the grains tested. All of the biocontrol agents were compatible with the insecticide Fipronil. *P. chlamydosporia* was able to colonize endophytically soybean roots. There were no germination inhibition or dumping off caused by the fungi applied to the seeds, however they were not able to control the dumping off caused by *F. solani* and *R. solani* when the substrate was treated with these pathogens. In the green house trials when the substrate was treated with *M. incognita* only aldicarb reduced the number of juveniles in the soil and eggs in the roots, however the number of eggs in the roots was reduced by the biocontrol fungi. *P. lilacinus* was able to increase the root dry weight. In the field it was observed that at the 2 areas naturally infested with *M. incognita* and *H. glycines*, only Aldicarb was efficient to reduce the number of juveniles from the soil and juveniles and eggs of *M. incognita* e *H. glycines* in the soybean roots. *P. chlamydosporia* was the most effective fungus to reduce the number of *H. glycines* cists in the soil. *P. lilacinus* and aldicarb were also able to significantly reduce these propagules.

**Key words:** Biological control of nematodes, soilborne fungi, nematofagous fungi

## I. INTRODUÇÃO

Os nematóides constituem o grupo de pluricelulares mais abundantes no planeta (KIMPINSKI & STURZ, 2003). Geralmente são classificados segundo seu hábito nutricional. Dentre os grandes grupos de nematóides estão os fitonematóides, ou nematóides parasitas de plantas que causam perdas econômicas significativas em uma grande variedade de culturas. Estes organismos alimentam-se e reproduzem-se em plantas vivas, podendo migrar para a região rizosférica, para dentro das raízes, ou em direção à parte aérea. Em 1987, SASSER & FRECKMAN já havia estimado, perdas mundiais causadas por nematóides variando de 8 a 20%, com valor anual de 87 bilhões de dólares.

Para o manejo destes parasitas frequentemente se recorre ao controle químico que têm seu uso cada vez mais limitado por sua alta toxicidade, risco de contaminação ambiental, alto custo, baixa disponibilidade em países em desenvolvimento, ou baixa eficácia de controle após repetidas aplicações (DONG & HANG, 2006).

O Brasil é o maior exportador mundial de soja (*Glycine max* L. Merrill), liderando o ranking de setores exportadores do agronegócio, representou 19,5% em 2007. As exportações de grãos, farelo e óleo cresceram 22,3% de 2006 para 2007 (de US\$ 9,3 bilhões para US\$ 11,4 bilhões, com produção total de 53,3 milhões de toneladas (MAPA, 2008).

Dentre os nematóides-chave na cultura da soja encontram-se os nematóides de galha *Meloidogyne incognita* (KOFOID & WHITE) CHITWOOD e *M. javanica* (TREUB) CHITWOOD, principalmente, e o nematóide do cisto da soja (NCS) *Heterodera glycines* ICHINOHE.

Os nematóides do gênero *Meloidogyne* sp. possuem ampla distribuição geográfica e representam um dos principais problemas para a cultura da soja. Formam estruturas denominadas galhas no sistema radicular da planta interrompendo tanto os vasos condutores, xilema e floema ocasionando murcha das plantas durante os períodos mais quentes do dia, menor desenvolvimento das plantas, desfolha prematura,

sintomas de deficiência mineral, clorose, redução e deformação do sistema radicular, decréscimo da eficiência das raízes em absorver e translocar água e nutrientes e menor crescimento da parte aérea, culminando com menor produção, comprometendo ou até mesmo inviabilizando o cultivo em áreas com infestações mais severas (TIHOHOD, 2000). *M. incognita* geralmente é um sério problema em áreas cultivadas anteriormente com algodão ou café.

*Heterodera glycines* é um dos principais agentes que limitam a produção de soja no mundo (WRATHER, 1992). Até 1992, não havia sido detectado no Brasil a espécie *H. glycines* parasitando culturas de soja. Até então, nenhuma variedade comercial possuía resistência ao NCS. A partir desta data, o NCS dispersou rapidamente para os principais estados produtores de soja, devido a facilidade de agregação às sementes, aos implementos agrícolas, por pássaros, pelos ventos, pelo homem e outros meios (SILVA et al, 2006).

No Brasil já foram identificadas cerca de 50 doenças em soja causadas por diversos patógenos como bactérias, fungos, vírus e nematóides (GAZZONI & YORINORI, 1995). Estas doenças podem ser consideradas como um dos diversos fatores limitantes à obtenção de incrementos na produtividade média nacional, que poderia ser superior a 3.200 kg/ha caso fossem manejadas corretamente (ALMEIDA, 2001). Dentre os fungos de solo patogênicos à cultura, podem ser citados *Fusarium solani* f. sp. *glycines*, causador da podridão vermelha das raízes, doença que já é motivo de grande preocupação e perdas nas regiões onde já foram constatadas (FRONZA, 2003) e *Rhizoctonia solani*, fungo, pertencente ao grupo de anastomose 1 IA (AG-1 IA) que também é um dos patógenos mais importantes afetando a cultura da soja no Brasil, causando queima da folha e/ou mela em soja (BASSETO et al., 2006).

No manejo integrado de doenças e nematóides devemos utilizar várias estratégias combinadas, como medidas de exclusão, utilização de plantas antagonistas, controle químico, adubação verde, cultivares resistentes, rotação de culturas, pousio e controle biológico (BARKER & KOENNING, 1998). No caso do nematóide do cisto e galhas da soja onde não ocorre controle químico eficiente, o controle biológico assume muita importância (ARAÚJO et al., 2002).

O controle biológico apresenta uma série de vantagens em relação ao químico, pois não contamina, não desequilibra o meio ambiente e nem deixa resíduos, além de ser barato e de fácil aplicação (SOARES, 2006). Uma grande quantidade de organismos são capazes de repelir, inibir ou mesmo levar a morte dos fitonematóides. Mais de 200 inimigos naturais de fitonematóides têm sido reportados, dentre eles, fungos, bactérias, nematóides predadores e ácaros e outros (STIRLING, 1991). Dentre estes, os fungos têm se destacado. Cerca de 75% dos antagonistas identificados, são fungos que habitam normalmente o solo que podem ser parasitas de ovos, predadores de juvenis, adultos ou cistos, ou ainda produzirem metabólitos tóxicos aos nematóides (JATALA, 1986). Alguns fungos nematófagos também podem ser capazes de colonizar endofiticamente raízes de plantas e, além disso, controlarem doenças causadas por fungos de solo (MONFORT et al., 2005).

Também as bactérias do gênero *Bacillus*, principalmente *B. subtilis*, além de componentes da população microbiana do solo, rizoplano e filoplano, apresentam características atrativas para os estudos de controle biológico de doenças de plantas (NORONHA et al., 1995). Porém, para a comercialização desses antagonistas são necessárias muitas pesquisas preliminares, dado que sua performance em campo pode ser bastante inconsistente (DONG & ZHANG, 2006).

Em virtude do sério problema que os nematóides representam para as culturas agrícolas, novos estudos se fazem necessários para viabilizar o uso de estratégias integradas de manejo de nematóides e doenças.

## II. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivos gerais

Avaliar a eficácia de agentes de controle biológico de nematóides e de fungos fitopatogênicos de solo na cultura da soja, em condições similares à utilizada no cultivo mecanizado de campo, bem como a compatibilidade destes agentes com agroquímicos usualmente utilizados na cultura.

### 2.2. Objetivos específicos

- a) Avaliar a eficácia *P. chlamydosporia* e *P. lilacinus*, de um produto comercial à base de *Bacillus* (Nemix) no controle de *M. incognita* e *H. glycines* em soja, variedade M-SOY 6101.
- b) Avaliar o antagonismo dos fungos aos fitopatógenos de solo *Fusarium solani* e *R. solani*, causadores de tombamento em soja.
- c) Testar a compatibilidade dos agentes biológicos de controle com agroquímicos usualmente utilizados em plantios comerciais de soja.
- d) Verificar a capacidade dos fungos e das bactérias presentes no Nemix de colonizar endofiticamente raízes de soja.

### III. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. Agentes biológicos

Fungos nematófagos são fungos com capacidade de capturar, parasitar ou paralisar nematóides em qualquer estágio de seu ciclo de vida. Os fungos são divididos em grupos em função de seu modo de ação: ectoparasitas ou predadores, endoparasitas, parasitas de ovos e fêmeas e produtores de metabólitos tóxicos (JANSSON et al., 1997).

Os fungos predadores capturam nematóides móveis no solo com estruturas de captura ou armadilhas especializadas formadas ao longo do crescimento vegetativo das hifas. A morfologia e funcionalidade das armadilhas diferem em função da espécie do fungo, os quais podem ser divididos em quatro grupos principais, de acordo com o tipo de armadilha que apresentam: redes adesivas, nódulos adesivos, ramos adesivos e anéis constritores (AHREN & TUNLID, 2003). Estes fungos apresentam baixa especificidade de hospedeiros e podem ser mais ou menos especializados ou saprófitas no solo (PENSMARK et al., 1995).

Os fungos nematófagos endoparasitas não formam armadilhas, porém usam seus conídios que emitem suas estruturas para infectar os nematóides. Estes conídios podem ser móveis ou não. Muitos desses fungos são parasitas obrigatórios e passam sua vida vegetativa dentro de nematóides infectados, formando apenas os conídios fora do corpo do hospedeiro. No solo, eles sobrevivem basicamente por meio desses conídios. Normalmente têm mais especificidade que os predadores (JANSSON et al., 1997). Ovos e fêmeas de nematóides em estágios sedentários de vida podem ser infectados.

Dentre os vários fungos nematófagos, os ovicidas ou oportunistas estão entre os mais promissores, tanto pela capacidade saprófita quanto pelo fácil crescimento *in vitro*. Para o controle de nematóides de galha podem ser muito eficientes, visto que a massa de ovos desses nematóides é compactada numa matriz gelatinosa em cada

fêmea, facilitando a colonização (BARRON, 1977). Dentre o grande número de fungos parasitas de ovos conhecidos, apenas *Pochonia chlamydosporia* (Goddard) Zare & Gams (sinonímia *Verticillium chlamydosporium*), e *Paecilomyces lilacinus* (Thom.) Samsom têm sido melhor estudados devido aos resultados promissores apresentados (ATKINS et al., 2003; JATALA et al., 1980).

*Paecilomyces lilacinus* pertence à classe Hyphomycetes. É um fungo parasito de ovos e cistos e trata-se de um oportunista com muito pouca especificidade de hospedeiros, embora os diferentes isolados em geral difiram na sua habilidade para parasitar os ovos e os cistos de diferentes espécies de nematóides (GOETTEL et al., 2001). Este fungo é um saprófita capaz de utilizar grande faixa de substratos (DOMSCH et al., 1980) e cresce bem às temperaturas entre 15 e 30 °C, com ótimo entre 25 e 30 °C. Sua adaptabilidade a uma ampla faixa de pH do solo torna-o um organismo competitivo em solos agricultáveis. Além disso, *P. lilacinus* é compatível com muitos fungicidas e nematicidas (VILLANUEVA & DAVIDE, 1983; JACOBS et al., 2003). Quando aplicado no solo o fungo se estabelece, cresce e dissemina-se rapidamente e, em curto período de tempo, torna-se a espécie dominante. Em testes de laboratório infectou ovos de *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood e destruiu os juvenis em curto espaço de tempo (JATALA, 1986), confirmando sua eficácia como agente do biocontrole.

O processo de infecção de ovos de *Meloidogyne* spp. por *P. lilacinus* inicia-se com o crescimento da hifa do fungo sobre a gelatina que recobre a massa de ovos do nematóide. A colonização dos ovos aparenta ocorrer pela simples penetração da parede do ovo por uma hifa individual, auxiliada por atividades mecânicas e/ou enzimáticas (JATALA, 1986). A protease serina produzida por *P. lilacinus* possui um papel importante na penetração do fungo através da cutícula dos ovos dos nematóides (BONANTS et al., 1995).

Após a penetração, em curto espaço de tempo, os ovos são completamente colonizados pelo fungo. O fungo penetra nos ovos de *Meloidogyne* spp. mais rapidamente que nos de *Globodera* spp. ou de *Nacobbus* spp. Várias pesquisas foram desenvolvidas e resultaram na obtenção de dados sobre o comportamento do fungo em

diversas localidades do mundo (JATALA, 1985). Segundo JATALA (1986), os resultados da aplicação de *P. lilacinus* a campo, em algumas fazendas no Peru, evidenciaram a eficácia do fungo no controle de *M. incognita* em diferentes culturas e também de *Tylenchulus semipenetrans* Cobb, em citros.

Culturas de *P. lilacinus* foram enviadas para pesquisadores em 46 países, através do International *Meloidogyne* Project (ESSER & EL-GHOLL, 1993), possibilitando a divulgação do conhecimento sobre o fungo. Um estudo evidenciou que as folhas de *Calotropis procera* (Aiton) Aiton adicionadas ao solo junto com *P. lilacinus* foram mais efetivas do que todos os outros materiais orgânicos usados de forma integrada, tendo como resultado o aumento do crescimento da planta, redução da população do nematóide e redução do número de galhas nas raízes, além do aumento do parasitismo do fungo sobre o nematóide (AHMAD & KHAN, 2004). Vários pesquisadores no Brasil têm estudado a eficácia desse fungo no biocontrole de nematóides, especialmente *Meloidogyne javanica* (CAMPOS, 1992; CARNEIRO & GOMES, 1993; RIBEIRO & CAMPOS, 1993; D'ANGIERI FILHO & CAMPOS, 1997).

*Pochonia chlamydosporia* também tem sido apontado como um agente de biocontrole de nematóides com expressivo potencial. O fungo é capaz de sobreviver na ausência do hospedeiro, visto que produz clamidósporos, o que o torna mais resistente a condições adversas do ambiente que outros, além de ser facilmente cultivado *in vitro*. É um parasito de ovos dos nematóides de cisto e dos formadores de galha (FREIRE & BRIDGE, 1985). Foi apontado como uma das principais causas do declínio de populações do nematóide de cistos dos cereais em monocultura na Inglaterra (KERRY et al., 1982). Pode reduzir as populações de nematóides em mais de 90% quando aplicado a campo (DELEIJ et al., 1993).

KERRY & HIDALGO-DIAS (2004) desenvolveram um sistema de manejo integrado de controle de nematóides de galha em cultivos orgânicos baseado no uso de *P. chlamydosporia*. Este isolado está sendo produzido em massa em Cuba e comercializado com o nome de KlamiC<sup>®</sup>. GARCIA et al., (2004) e MORGAN-JONES et al. (1983) mencionaram que esse fungo preveniu a eclosão de juvenis de *Meloidogyne arenaria* (Neal) Chitwood colonizando os ovos do nematóide. Tanto a parede do ovo

quanto a cutícula do juvenil aparentam ser fisicamente impenetráveis, contudo, ocorreu a penetração de hifas do fungo as quais se desenvolvem endogenamente tanto em ovos quanto em juvenis. DELEIJ et al. (1993) constataram efeito sinérgico da aplicação de Aldicarb com *Verticillium chlamydosporium* (= *P. chlamydosporia*) para o manejo da população de *M. incognita*, obtendo 100 % de controle. Este estudo sinaliza com a possibilidade da utilização combinada de nematicidas com fungos nematófagos de modo a permitir a redução da quantidade de pesticida químico aplicada ao solo, sem comprometer ou até aumentando a eficácia do tratamento.

Entre os principais inimigos naturais, HALLMANN et al (2004) sugerem que as bactérias, notadamente as endofíticas, apresentam potencial para o controle de fitonematóides, principalmente endoparasitas. SIKORA & PADGHAM (2007) relataram redução de 40% na penetração e formação de galhas de *Meloidogyne graminicola* com inoculações de *Bacillus megaterium* nas raízes de arroz. Além disso, a colonização das raízes com esta bactéria diminuiu a migração do nematóide para a rizosfera em 60% e seus metabólitos reduziram em 60% a eclosão dos ovos.

KERRY (1987), STIRLING (1991) e SIKORA (1992) relataram que bactérias da rizosfera reduzem o nível de danos de nematóides com liberação de toxinas ou modificação dos exsudatos radiculares, sendo de fácil crescimento *in vitro*, além disso, podem ser aplicadas em tratamento de sementes. Porém, estes autores relataram certas desvantagens desses microrganismos como durabilidade curta, especificidade e pouco efeito na redução da multiplicação dos nematóides.

*H. glycines* tem sido relatado como um nematóide que causa sérios problemas para a cultura da soja. Vários grupos de organismos participam do controle deste fitonematóide através de predação, parasitismo e competição. Estes grupos taxonômicos incluem fungos, bactérias, vírus, rickettsias, protozoários, turbelários, tardígrados, anelídeos, ácaros, insetos, nematóides e plantas (STIRLING, 1991). Porém poucos desses organismos apresentam potencial efetivo de regular a população do nematóide. Segundo o autor, os fungos têm sido os mais promissores agentes de controle, além de algumas poucas bactérias. Os organismos mais frequentemente testados para o controle do nematóide do cisto são os fungos *P. lilacinus*, *P.*

*chlamydosporia*, *Lecanicillium lecanii*, *Hirsutella* spp., ARF18, *Fusarium* spp., poucas espécies de fungos nematófagos predadores, e as bactérias *Pasteuria* spp. e *Bacillus* spp. (CHEN et al., 2004). Alguns produtos biológicos para controle de *H. glycines* têm sido comercializados. O produto “Soybean Root Bio-Protectant” está sendo usado na China e em 1996 era aplicado em 12.000 ha (LIU et al., 1996). Este produto contém *P. lilacinus*, matéria orgânica, filtrado de plantas nematicidas e fertilizantes minerais que reduziu a população do nematóide e aumentou a produtividade (WANG et al., 1997). Outro produto biológico registrado nos Estados Unidos é o “DiTera<sup>®</sup>”, que contém filtrado de *Myrothecium verrucaria* produzido em meio líquido (WARRIOR et al., 1999).

### **3.2. Microrganismos Endofíticos e Antagonismo de Fungos Nematófagos a Fungos Patogênicos de Solo**

As interações não patogênicas entre plantas e microrganismos são conhecidas há muitos anos. Microrganismos endofíticos são aqueles que habitam o interior das plantas durante pelo menos um período do ciclo de suas vidas (AZEVEDO, 1998). No início dos anos setenta, microrganismos endofíticos eram considerados neutros, não causando danos ou benefícios às plantas, mas através dos conhecimentos adquiridos, sabe-se atualmente que esses microrganismos em muitos casos desempenham um papel importante na proteção da plantas contra predadores e patógenos (AZEVEDO et al., 2000). Dentre os mecanismos pelos quais fungos endofíticos controlam ataques de insetos e outras pragas e doenças incluem a produção de toxinas que influênciam estes compostos nas plantas e animais, e como sua produção pode ser afetada por condições genéticas e ambientais.

BORDALLO et al. (2002) sugerem que, desde que os fitonematóides atacam tecido radiculares, a colonização destes tecidos por fungos nematófagos pode ser uma grande vantagem no controle biológico de nematóides, somente se os fungos tiverem potencial como agentes de biocontrole. Pelos resultados obtidos por estes autores, foi constatada a capacidade de colonização radicular de *Arthrobotrys oligospora* e *P. chlamydosporia* em plantas de cevada e tomate, indicando que estes fungos colonizam

endofiticamente tanto monocotiledôneas quanto dicotiledôneas. Estes produziram apressórios para facilitar a penetração nas raízes pelos dois fungos, e também induziram modificações na parede celular das células. Além disso, *A. oligospora* apresentou quimiotropismo em direção às raízes

PENSMARK & JANSSON (1997) constataram que a concentração de fungos nematófagos na rizosfera possui especificidade de culturas e fungos. GARPARD & MANKAU (1986) acharam maior concentração de *Arthrobotrys* spp. na rizosfera de citros do que em solo circunvizinho. PETERSON & KATZNELSON (1965) constataram o mesmo em soja e tomate. Para BOURNE et al. (1996) os fungos nematófagos parasitas de ovos são encontrados comumente na rizosfera das principais culturas comerciais. LLOPEZ-LORCA et al. (2002) verificaram a capacidade de colonização de raízes de cevada por esses fungos particularmente *P. chlamydosporia*. Segundo estes autores, a interação entre células da raiz de cevada e *P. chlamydosporia* indica que o fungo apresenta um comportamento endofítico nas células da raiz.

### **3.3. Antagonismo de Fungos Nematófitos a Fungos Patogênicos de Solo**

Apesar de *P. chlamydosporia* ser um agente de biocontrole de nematóides de galhas e cistos, e ser encontrado em infestações desses nematóides em inúmeros países, KERRY (1987) e LEINHOS & BUCKENAUER (1992), reportaram a capacidade deste fungo em parasitar fungos fitopatogênicos de solo. Estudos recentes demonstraram o antagonismo desse fungo contra alguns fitopatógenos de solo, como por exemplo *Fusarium solani* e *Rhizoctonia solani* (JACOBS et al., 2003).

Segundo MONFORT et al. (2003), estas propriedades de *P. chlamydosporia* e outros fungos nematófitos, aliadas à sua capacidade de colonização de raízes e controle de fitonematóides fazem destes fungos agentes de controle biológico de “duplo propósito”, os quais têm um grande potencial na agricultura e merecem ser agora melhor investigados e entendidos. Estes autores pesquisaram *P. chlamydosporia* e mais dois fungos parasitas de ovos para o controle de *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, causador do “mal-do-pé” a principal doença do trigo em nível mundial. Pelos seus

resultados, os três fungos reduziram a colonização e necroses das raízes do trigo pelo patógeno em placas de Petri e plantio em tubos em condições controladas, além de promover maior crescimento das raízes, sendo que a colonização das raízes pelos fungos nematófagos não foi influenciada pelo patógeno. Já em condições de campo não houve controle eficiente, apesar dos agentes terem promovido maior crescimento das raízes. Isto sugere que mais pesquisas sobre o assunto serão oportunas.

Em um teste *in vitro*, ao avaliar a habilidade de um isolado de *P. lilacinus* crescer e inibir o crescimento de *Rhizoctonia solani*, *Chaetomium globosum*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium bilaii* e *Trichoderma harzianum* Rifai, JACOBS et al. (2003) relataram que o fungo mostrou-se mais competitivo quando comparado a *Plectosphaerella cucumerina* e *P. chlamydosporia* a 10 e 20 °C.

### **3.4. Compatibilidade de Fungos Nematófitos a Agroquímicos**

Existem evidências de que produtos químicos utilizados na proteção das culturas podem ter efeitos antagônicos, nulos ou sinérgicos sobre a atividade de fungos utilizados no controle biológico no agrossistema (BENZ, 1987). Assim, conhecer a compatibilidade destes produtos sobre as diversas fases de desenvolvimento dos fungos é essencial em programas de manejo de pragas e doenças. A preservação da viabilidade dos conídios é de extrema importância, pois estas estruturas são as responsáveis pela sobrevivência e desenvolvimento posterior do fungo (DUARTE et al., 1992). É também importante a sua preservação, quando o fungo (conídios) é aplicado a campo, de modo inundativo, associado ou não a produtos fitossanitários (NEVES et al., 2001).

## IV. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos em condições controladas no Laboratório de Biocontrole Farroupilha (LBF), no município de Patos de Minas, MG e em sua casa de vegetação com irrigação por microaspersão durante 25 minutos diariamente no período de janeiro de 2007 a janeiro de 2008. O ensaio em condições de campo foi realizado em duas áreas sob cultivo de soja em fazendas da empresa Sementes Farroupilha Ltda., no município de Coromandel - MG, no período de outubro de 2007 a fevereiro de 2008. As análises nematológicas foram realizadas no Laboratório de Fitossanidade da FCAV/Unesp, Câmpus de Jaboticabal – SP, e no Laboratório de Nematologia da UFU, Câmpus Umuarama, em Uberlândia - MG.

### 4.1. Obtenção e Manutenção dos Agentes Biológicos de Controle

O fungo nematófago *P. lilacinus* foi cedido pelo Instituto Biológico de Campinas - SP, e o isolado de *P. chlamydosporia* pelo Rothamsted Research, da Inglaterra. Os produtos comerciais Nemix e Aldicarb foram obtidos junto a um fornecedor de insumos da empresa Sementes Farroupilha. Os inóculos fúngicos foram obtidos de repicagem de isolados preservados em papel de filtro secos com leite em pó sendo transferidos para placas de BDA e, depois de 11 dias, foram inoculados em arroz pré-cozido acondicionado em sacos de polipropileno, previamente autoclavados por 40 minutos. O produto Nemix foi preservado em câmara fria, a 3 °C.

### 4.2. Obtenção dos Fungos Fitopatogênicos de solo

O fungo de solo *Fusarium solani* (Mart.) Sacc (sinonímia: *Fusarium javanicum* Koorders) foi obtido na coleção de fungos do Laboratório de Biocontrole Farroupilha (LBF). O isolado de *Rhizoctonia solani* Kuhn grupo de anastomose 1-IA (AG1-IA) foi cedido pelo Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras

(DFP/UFLA). Os fungos foram preservados em câmara fria (3<sup>o</sup> C) em placas de Petri e, depois de 15 dias de repicagem foram inoculados em arroz pré-cozido acondicionado em sacos de polipropileno, previamente autoclavado por 40 minutos.

#### **4.3. Obtenção do Inóculo de *Meloidogyne incognita* e *Heterodera glycines***

O inóculo de *M. incognita* (Kofoid e White) Chitwood foi conseguido a partir de população mantida em tomateiros “Santa Cruz” cultivados em casa de vegetação, em substrato composto de solo e areia na proporção de 1:2 (v/v) previamente esterilizado com brometo de metila. Após 60 dias, a parte aérea das plantas foi cortada, seus sistemas radiculares cuidadosamente lavados, picados em pedaços de um centímetro e com solução de hipoclorito de sódio na concentração de 0,5% foram triturados em liquidificador doméstico na velocidade máxima por 15 segundos. A suspensão obtida foi passada em peneira de 20 mesh sobreposta à peneira de 500 mesh. Os ovos retidos nesta última peneira foram recolhidos com auxílio de pisseta contendo água destilada e a concentração da suspensão foi padronizada em 300 ovos/mL através de câmara de Peters em microscópio composto.

O inóculo de *H. glycines* usado no experimento foi obtido de plantas de soja FT-Cristalina, cultivadas em vasos como demonstra-se na (Figura 1) e (Figura 2) contendo solo infestado com uma população de *H. glycines* (raça 3), proveniente de Nova Ponte - MG. Para obtenção dos ovos, as plantas foram cuidadosamente retiradas dos vasos, as raízes separadas e colocadas sobre peneira com malha de 0,85mm, acoplada sobre outra peneira com malha de 0,15 mm e lavadas sob jato forte de água. As fêmeas retidas na peneira de 0,15 mm foram transferidas para um almofariz, onde foram esmagadas para a libertação dos ovos. Posteriormente, o material esmagado foi passado em uma peneira de 0,15 mm, acoplada a outra com malha de 0,026mm, na qual os ovos ficaram retidos, tendo sido recolhidos por meio de solução de sacarose (454 g/litro de água), sendo a suspensão centrifugada a 2.400 rpm por um minuto. O sobrenadante foi vertido em peneira de 0,026 mm e lavado para retirar o excesso de sacarose, sendo os ovos recolhidos em suspensão aquosa em bequer de 50 mL. A

concentração foi determinada com o auxílio de uma câmara de Peters e ajustada para 200 ovos por mL.



Figura 1. Aspecto geral dos vasos cultivados com soja em casa de vegetação do Laboratório de Biocontrole Farroupilha, Patos de Minas – MG, 2007.



Figura 2. Detalhe dos vasos cultivados com soja em casa de vegetação do Laboratório de Biocontrole Farroupilha, Patos de Minas – MG, 2007.

#### **4.4. Crescimento micelial e esporulação de *Paecilomyces lilacinus* e *Pochonia chlamydosporia* em dois substratos**

Os substratos usuais de produção massal de fungos no LBF, a saber, grãos de milho e grãos de arroz, foram testados para avaliação de crescimento e esporulação dos dois fungos nematófagos utilizados no presente estudo. Os fungos foram repicados para placas de Petri com BDA para a obtenção do inóculo, por 15 dias. Discos de micélio de 5 mm de diâmetro retirados das bordas das placas foram adicionados em sacos de polipropileno contendo os dois substratos. Cada saco continha 300 g de substrato, autoclavados a 121 °C por 40 minutos, antes da adição do fungo. Foram utilizados 10 discos de micélio por saco, e 4 sacos de cada substrato. A avaliação da produção de conídios foi feita pelo método de diluições sucessivas de alíquotas coletadas nos sacos e contagem em câmara de Neubauer, efetuando-se ainda a inspeção visual do crescimento micelial.

#### **4.5. Patogenicidade *in vitro* de *Paecilomyces lilacinus* e *Pochonia chlamydosporia* a Ovos de *Meloidogyne incognita* e *Heterodera glycines***

Discos de 5 mm de diâmetro dos isolados fúngicos de *P. chlamydosporia* e *P. lilacinus*, obtidos de cultivo puro em BDA, foram transferidos para o centro de placas de Petri contendo meio ágar-água a 2%. A seguir foi acrescentado 1 mL de uma suspensão concentrada contendo 100 ovos de *M. incognita* e *H. glycines*. A determinação do parasitismo foi realizada depois de oito dias de incubação. Para tanto, discos equidistantes de 9 mm de diâmetro foram retirados aleatoriamente em cada placa e colocados em seqüência sobre uma lâmina para microscopia. Sobre os discos foi acrescentada uma gota do corante azul de algodão em lactofenol, e em microscópio ótico, sob aumento de 100 vezes, foi avaliada a porcentagem de ovos parasitados. Foram feitas 4 repetições para cada fungo e cada nematóide.

#### 4.6. Compatibilidade dos Fungos Nematófagos e Nemix com Agroquímicos Utilizados na Cultura da Soja

Foram testados os seguintes produtos químicos:

a) Vitavax<sup>®</sup> (Thiram 200 SC – Suspensão Concentrada): fungicida para tratamento de semente registrado no MAPA para soja composto por dois ingredientes ativos distintos: um fungicida sistêmico (carboxina) e um fungicida de contato (tiram). Recomendado para controle de doenças de fungos de solo de maneira geral. Dose utilizada: 250 mL x 100 kg<sup>-1</sup> de sementes.

b) Cruiser<sup>®</sup> (Tiametoxan FS: suspensão concentrada): Inseticida sistêmico do grupo químico dos neonicotinóides para tratamento de sementes registrado para soja. Recomendado para cupim-de-montículo (*Procornitermes triacifer*), Lagarta-elasma (*Elasmopalpus lignosellus*) e mosca branca (*Bemisia tabaci*) raça B. Dose utilizada: 300 mL x 100 kg<sup>-1</sup> de sementes.

c) Maxim<sup>®</sup> (Fludioxonil SC – Suspensão Concentrada): Fungicida do grupo químico dos fenilpirroles. Recomendado para Mancha Olho de Rã (*Cercospora sojina*), tombamento (*R. solani*) e podridão-vermelha-da-raiz (*F. solani*). Dose utilizada: 200 mL x 100 kg<sup>-1</sup> de sementes

d) Regent<sup>®</sup> 800 (Fipronil WG – granulado dispersível). Inseticida e cupinicida do grupo químico dos pirazóis. Registrado apenas para batata e cana-de-açúcar no momento. Tem potencial para controle de tamanduá-da-soja (*Sternechus subsignatus*). Dose utilizada: 500 g P.C x ha<sup>-1</sup>

e) Protreat<sup>®</sup> (Carbendazim + Thiram – SC suspensão concentrada). Fungicida de ação sistêmica (Carbendazim) e de contato (Tiram) do grupo químico Benzimidazol (Carbendazim) e Dimetilditiocarbamato (Tiram), registrado e recomendado para tratamento de sementes de soja no combate ao crestamento foliar (*Cercospora kikuchii*), tombamento (*Phomopsis sojiae*, *Colletotrichum dematium*), e podridão da semente (*Fusarium pallidoroseum*). Dose utilizada: 200 mL x 100 kg<sup>-1</sup> de sementes.

f) Standak<sup>®</sup> (Fipronil – SC suspensão concentrada). Inseticida do grupo químico dos pirazóis. Registrado para soja no combate a torrãozinho (*Aracanthus* sp.),

vaquinha-verde-amarela (*Diabrotica speciosa*), broca-do-colo (*Elasmopalpus lignosellus*), coró (*Phyllophaga cuyabana*), tamanduá-da-soja (*Sternechus subsignatus*). Dose utilizada: 250 mL x 100 kg<sup>-1</sup> de sementes.

Para se determinar a compatibilidade procedeu-se de acordo com metodologia usual do LBF. Em um tubo tipo Falcom de 50 mL, foram adicionados os produtos químicos de acordo com as doses recomendadas, às suspensões (1 x 10<sup>7</sup> conídios / mL) de *P. lilacinus* e *P. chlamydosporia*. Suspensões contendo conídios de *P. lilacinus* e *P. chlamydosporia* sem os produtos químicos foram também preparadas (controles). No caso produtos usados no tratamento de sementes foram usadas as doses recomendadas e o equivalente a 600 mL de suspensões de fungos (1 x 10<sup>7</sup> conídios / mL) para 100 kg de sementes. Agitou-se em agitador de tubos por 5 segundos para homogeneização das suspensões. A seguir foram espalhados 100 microlitros de cada mistura e dos controles em placas de Petri contendo meio BDA, tendo sido feitas três repetições. As respectivas misturas e os controles foram deixadas em temperatura ambiente (em torno de 30 °C) à sombra e novamente semeadas da mesma forma 3 e 12 horas após. Depois de 16 horas de incubação, aplicaram-se gotas do corante azul de algodão em lactofenol para paralisar o desenvolvimento do tubo germinativo e o crescimento micelial dos fungos. Foram realizadas contagens dos conídios germinados e não germinados e transformadas em valores percentuais. Quando a germinação dos conídios foi maior que 80% nas 3 sementeiras após 16 horas de sementeira, considerou-se o produto como compatível.

#### **4.7 Antagonismo de *Pochonia chlamydosporia* e *Paecilomyces lilacinus* a *Fusarium solani* e *Rhizoctonia solani***

Em sacos de polipropileno contendo arroz autoclavado por 40 minutos a 121 °C, fez-se a inoculação de *R. solani* e *F. solani* com discos de micélio com 2 cm de diâmetro, provenientes de culturas crescidas em placas de Petri com BDA. Após oito dias colocou-se 10 gramas de arroz colonizado com *F. solani* (1,7 x 10<sup>8</sup> conídios / g) e 10 g de arroz colonizado com micélio de *R. solani* em vasos de argila contendo 2 litros

de areia e terra de horizonte C de latossolo vermelho-amarelo, na relação 3:1. Dez dias após a inoculação nos vasos foram preparadas suspensões aquosas de conídios de *P. chlamydosporia* e de *P. lilacinus*, ajustadas as concentrações para  $1,2 \times 10^7$  conídios / mL. Tratou-se 100 g de sementes de Soja variedade M-Soy 6101 com as suspensões fúngicas, e as mesmas foram semeadas nos vasos e colocadas em casa de vegetação em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições, com os seguintes tratamentos:

- a) Controle (semente não tratadas em solo estéril)
- b) Sementes plantadas em solo inoculado com *F. solani*
- c) Sementes plantadas em solo inoculado com *R. solani*
- d) Sementes tratadas com *P. lilacinus* em solo estéril
- e) Sementes tratadas com *P. lilacinus* em solo inoculado com *F. solani*
- f) Sementes inoculadas com *P. lilacinus* em solo inoculado com *R. solani*
- g) Sementes tratadas com *P. chlamydosporia* em solo estéril
- h) Sementes tratadas com *P. chlamydosporia* em solo inoculado com *F. solani*
- i) Sementes inoculadas com *P. chlamydosporia* em solo inoculado com *R. solani*.

Foi avaliada a porcentagem de germinação aos 10 dias de plantio e a ocorrência de tombamento Damping off, aos 30 dias.

Foram feitas quatro repetições para os nove tratamentos enumerados acima, e para a análise estatística os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F, comparando-se as médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

#### **4.8. Potencial do Controle de *Meloidogyne incognita* infectando plantas de soja em casa de vegetação**

##### **4.8.1. Tratamento de sementes**

O tratamento de sementes com os fungos foi feito na dosagem de 600 mL de suspensão para 100 kg de sementes. Para a obtenção das suspensões ( $1,5 \times 10^8$

conídios / g de *P. chlamydosporia* e  $1,5 \times 10^9$  conídios/g de *P. lilacinus*, determinados em câmara de Neubauer), o arroz colonizado foi lavado com solução de Tween 20<sup>®</sup> a 0,1 % usando-se o mínimo de solução possível, com vistas à obtenção da maior concentração de conídios. No caso do NEMIX, cuja concentração foi confirmada em  $3,2 \times 10^9$  UFC de *Bacillus* sp. / g, o tratamento foi feito segundo a recomendação do fabricante para soja, com a dose de 500 g do produto para 100 kg de sementes.

#### **4.8.2 Plantio e infestação de *Meloidogyne incognita***

As sementes de soja foram semeadas em vasos de argila de 4,5 L, contendo terra do horizonte C (Latosolo vermelho-amarelo) e areia lavada de granulometria média, na proporção de 1:2 (v/v). Esta mistura de solo/areia foi colocada em uma caixa de fibrocimento de 500 L, coberta com lona de plástico e esterilizada com brometo de metila, sendo retirada depois de uma semana. Após o plantio, deixou-se 1 plântula por vaso. Para a inoculação, 15 dias após, foram abertos três orifícios com 2 cm de profundidade e distanciados 2 cm da plântula. Nesses três orifícios foram distribuídos 10 mL da suspensão de ovos, que corresponde a 3000 ovos do nematóide para cada plântula. Depois da adição da suspensão de ovos, os orifícios foram fechados. As plantas foram irrigadas diariamente por 25 minutos com microaspersão e receberam solução nutritiva em intervalos quinzenais. O ensaio foi conduzido até o estágio de florescimento, quando foram feitas as análises, correspondendo a 35 dias após a inoculação.

#### **4.8.3. Aplicação em pós-emergência**

Quinze dias após o plantio, concomitantemente com a infestação de *M. incognita*, foi feita a aplicação dos produtos de controle em pós-emergência de soja. No caso dos fungos, utilizou-se pulverização da suspensão de conídios, com as concentrações supracitadas, ajustadas para uma vazão de 400 L / ha, semelhante à usada em condições de campo, usadas nas pulverizações de produtos químicos comerciais. Para

o Nemix e o Aldicarb foi aplicado o equivalente a 10 kg / ha, em pulverização (Nemix) e incorporação no solo a 2 cm de profundidade (Aldicarb). As aplicações foram feitas na área total dos vasos (0,1 m<sup>2</sup> / vaso).

#### **4.8.4. Determinação do número de galhas, de ovos, de nematóides juvenis de *Meloidogyne incognita* presentes no sistema radicular e da matéria seca da raiz**

As raízes foram separadas em pequenos fragmentos de radículas e então observadas ao fundo claro (folha de papel sulfite) com lupa manual, sendo as galhas então contadas. Para a contagem de ovos as raízes foram cortadas com tesoura em pedaços de 2 cm e então trituradas em liquidificador doméstico com velocidade máxima por 15 segundos em uma solução 1:1 (v/v) de água sanitária comercial e água. A suspensão foi passada em uma peneira de 20 mesh sobre outra de 500 mesh. Com auxílio de água destilada contida em uma pisseta a suspensão foi então transferida para um becker e em seguida para um tubo de ensaio. Após sedimentação foi retirada uma alíquota de 5 mL do precipitado e os ovos contados em câmara de Peters (TIHOHOD, 1993) em microscópio composto.

Para a extração de juvenis empregou-se a técnica de COOLEN & D'HERDE, (1972), e feita a contagem também realizada no microscópio composto em câmara de Peters. O peso da matéria seca das raízes foi determinado cortando-se as mesmas na altura do colo e colocando-as em estufa a 60 °C até peso constante.

#### **4.8.5. Delineamento experimental e análise estatística**

O ensaio foi conduzido no delineamento em blocos casualizados com nove tratamentos e três repetições por tratamento. Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F, comparando-se as médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

#### 4.9. Controle de *Meloidogyne incognita* e *Heterodera glycines* com Fungos nematófagos e Nemix em Condições de Campo

Em áreas de produção comercial de soja (Figura 3.) da empresa Sementes Farroupilha Ltda, escolheu-se duas áreas em duas fazendas, ambas no município de Coromandel – MG. Após o plantio comercial mecanizado convencional, esperou-se as plântulas de soja atingirem a idade de 15 dias. Uma das áreas consistiu da demarcação de uma reboleira causada por *M. incognita*, (Fazenda Rio Brillhante) e a outra, de uma segunda reboleira onde verificou-se grande população de *H. glycines*, principalmente (Fazenda São Francisco). Nas duas áreas as plântulas foram arrancadas e em seguida foram plantadas sementes da variedade M-SOY 6101 de soja no espaçamento normal de plantio (0,45 m X 0,066 m). O experimento foi implantado no delineamento em blocos casualizados, com cinco tratamentos e três repetições, com cada parcela contendo 25 m<sup>2</sup> (5 m x 5 m) e 11 linhas de plantio de soja. A retirada das amostras foi feita nas duas linhas centrais de plantio, tendo sido colhidas 20 plantas por parcela, aleatoriamente. Juntamente com a coleta de plantas procedeu-se à coleta de solo, na profundidade de 0 a 20 cm, em 20 pontos. Retirou-se as raízes das plantas, as quais foram incorporadas às amostras de solo homogeneizadas. Os tratamentos foram os seguintes:

- a) Aldicarb em pós-emergência
- b) Nemix em tratamento de sementes e aplicação em pós-emergência
- c) *P. lilacinus* em tratamento de sementes e aplicação em pós-emergência
- d) *P. chlamydosporia* em tratamento de sementes e aplicação em pós emergência
- e) Testemunha absoluta

O tratamento de sementes foi efetuado como descrito no item 4.8.1. Da mesma forma, a aplicação em pós-emergência foi realizada conforme o item 4.8.3., ou seja, com a vazão normalmente utilizada em pulverizações de agroquímicos (400 L/ha), neste caso utilizando-se um pulverizador costal, com as máximas concentrações de conídios obtidas para os fungos *P. chlamydosporia* (1,5 x 10<sup>8</sup> conídios/g) e *P. lilacinus*

( $1,5 \times 10^9$  conídios/g), e no caso de Nemix, a aplicação recomendada pelo fabricante de 500 g do produto para 100 kg de sementes (no tratamento de sementes) e de 10 Kg/ha em pós-emergência. As aplicações em pós-emergência foram feitas aos 30 e 60 dias após o plantio, e as avaliações aos 90 dias após o plantio (Figura 3).

Os nematóides foram extraídos das amostras de solo pelo método da flotação centrífuga em solução de sacarose (JENKINS, 1964) e das raízes, pelo método de COOLEN & D'HERDE (1972). A seguir, a população de nematóides nas amostras foi estimada ao microscópio óptico composto com auxílio da câmara de contagem de Peters (SOUTHEY, 1970), no caso da reboleira com *M. incognita*. Para a área com *H. glycines* foi feito o mesmo procedimento para a detecção e contagem de juvenis e ovos em solo e raízes.

Para isolamento e contagem dos cistos, utilizou-se amostras de 50 cc de solo. Cada amostra foi colocada em um balde contendo água. Os torrões foram desmanchados e a suspensão agitada para que os cistos fossem liberados. Em seguida o conteúdo do balde foi vertido em duas peneiras superpostas de 60 e 100 mesh. O resíduo da peneira de 100 mesh foi recolhido com o auxílio de uma pisseta com água, para um erlenmeyer com capacidade para 1000 mL. Adicionou-se água ao erlenmeyer agitando a suspensão, e depois disso deixou-se em repouso por 10 minutos, para que os cistos flutassem sobre a água. A parte superficial da suspensão foi vertida em papéis de filtro dobrados sobre funis. Após a passagem da água, os papéis foram desdobrados e colocados em placas de plástico de 15 cm de diâmetro, até secagem. Logo após, os papéis contendo o resíduo foram analisados em microscópio estereoscópio, utilizando um estilete de ponta fina para separar os cistos de outras partículas e contá-los.

Para análise estatística usou-se o delineamento em blocos casualizados com cinco tratamentos e quatro repetições, tendo sido os dados submetidos à análise de variância pelo teste F, comparando-se as médias pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.



Figura 3. Aspecto geral da área experimental cultivada com soja no Município de Coromandel – MG, 2008.

#### 4.10. Colonização de Raízes de Soja pelos Fungos Nematófagos e Nemix

Para determinação da capacidade de colonização endofítica dos fungos foi utilizada a metodologia de ARAÚJO et al. (2002) modificada. Foram retiradas amostras de raízes de plantas de soja com 30 dias após o plantio, cujas sementes haviam sido tratadas com suspensões de *P. chlamydosporia*, *P. lilacinus* e Nemix, conforme item 4.8.1. As raízes foram lavadas com sabão em água corrente e colocadas em placas de Petri contendo álcool 70% por 30 segundos, após o que foram tratadas com hipoclorito de sódio a 1,5% por quatro minutos, lavadas em água destilada esterilizada e colocadas para secar em papel de filtro esterilizado. Após estes procedimentos, foram retirados fragmentos de raiz de 5 mm de comprimento, os quais foram transferidos para placas de Petri contendo meio BDA suplementado com o antibiótico cloranfenicol ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ) e incubados em BOD à temperatura de  $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ . Para o Nemix foi utilizado o mesmo procedimento, com a diferença de que o meio utilizado nas placas de Petri foi o TSA (modificado): agar, 13 g; peptona, 10 g; cloreto de sódio, 5 g; cloreto de sódio, 5 g; extrato de levedura, 5 g;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,3;  $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,02;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,02;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,02 em 1000 mL de água destilada, sem adição de cloranfenicol. Após sete dias de incubação, para as placas do tratamento com Nemix, foram retiradas amostras de pontos próximos às extremidades das raízes com auxílio de alça de platina estéril e feitas observações em microscópio ótico composto para verificação da morfologia das bactérias. No caso dos fungos foram retiradas amostras após 14 dias, quando foi verificada a esporulação, procedendo a verificação das estruturas miceliais e dos conídios.

Cada tratamento consistiu de quatro vasos, contendo somente uma planta em cada um, na casa de vegetação do LBF. Para avaliação, foi feita semeadura em quatro pontos equidistantes em placas de Petri. Foram contadas o número de placas com raízes colonizadas pelos fungos e bactérias.

## V. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Crescimento Micelial e Esporulação de *Paecilomyces lilacinus* e *Pochonia chlamydosporia* em dois substratos

O arroz mostrou-se totalmente colonizado por *P. chlamydosporia* e apresentou a produção de  $1 \times 10^7$  conídios/g, e de  $2 \times 10^8$  con./g para *P. lilacinus*. Já o milho apresentou uma produção de  $1,5 \times 10^6$  con./g no caso de *P. chlamydosporia* e de  $1 \times 10^7$  con./g para *P. lilacinus*. Observou-se que os dois substratos utilizados na produção massal do LBF apresentam potencial de uso na produção destes agentes de biocontrole, apesar do milho não ter sido totalmente colonizado como o arroz por *P. chlamydosporia*.

De fato, arroz tem sido o substrato mais utilizado para a produção massal de fungos em meios sólidos (ALVES, 1998). Segundo o mesmo autor, a fermentação sólida é a forma mais comum atualmente em uso, por não necessitar de tecnologia sofisticada como a exigida em fermentação líquida. No LBF são usados grãos de milho para a produção massal de *Trichoderma asperellum*, e este meio também demonstrou potencial para produção dos fungos nematófagos em questão.

### 5.2. Colonização de Raízes de Soja pelos Fungos Nematófitos

Dentre os dois fungos utilizados, apenas *P. chlamydosporia* se mostrou capaz de colonizar as raízes da soja (Figura 4). Todas as quatro placas com raízes provenientes de sementes tratadas com o fungo apresentaram colônias de *P. chlamydosporia*, que começaram a crescer a partir das extremidades dessas raízes.



Figura 4. Teste de clonização de raízes de plantas proveniente de sementes de soja tratadas com *Pochonia chlamydosporia*, cultivadas em casa de vegetação, Patos de Minas, 2008.

Como os fitonematóides geralmente atacam as raízes das plantas, a habilidade de fungos nematófagos colonizar raízes é uma grande vantagem no combate aos nematóides se estes fungos apresentarem bom potencial de controle (BORDALLO et al., 2002). Segundo estes autores, a resposta das células das raízes à colonização tem profundas implicações no desempenho destes fungos como agentes de controle, o que foi constatado em ensaio no qual *P. chlamydosporia* demonstrou capacidade de colonização de raízes de cevada e tomate.

PENSMARK & JANSSON (1997) constataram que a rizosfera de plantas de ervilhas apresentaram maiores populações de fungos nematófagos do que solos sem raízes e do que as rizosferas de cevada e mostarda, sugerindo a ocorrência uma certa especificidade neste processo.

Segundo BOURNE et al. (1996) fungos nematófagos parasitas de ovos são comumente encontrados na rizosfera de culturas comerciais. LLOPEZ-LORCA et al. (2002) constataram a habilidade destes fungos em colonizar endofiticamente raízes de cevada, particularmente *P. chlamydosporia*, fato este observado neste trabalho com as raízes de soja.

RUMBOS & KIEWNICK (2006) testaram a persistência de *P. lilacinus* na rizosfera de 12 espécies de plantas e não acharam diferenças na persistência do fungo em solos com plantas e sem plantas após 100 dias. Porém, foi constatado que o isolado usado nos testes (PL251) colonizou endofiticamente 5 das 10 espécies de culturas comerciais testadas. Neste trabalho, não se observou a colonização das raízes de soja por *P. lilacinus*.

### **5.3 Patogenicidade *in vitro* de *Paecilomyces lilacinus* e *Pochonia chlamydosporia* a Ovos de *Meloidogyne incognita* e *Heterodera glycines***

Ambos os fungos apresentaram alta patogenicidade para ovos de *M. incognita* e *H. glycines in vitro*, o que demonstra seu potencial no controle destes nematóides. Na média das quatro placas de cada tratamento *P. chlamydosporia* apresentou colonização de 88% dos ovos no caso de *M. incognita* (Figura 5) e de 91% no caso de *H. glycines*. Já *P. lilacinus* colonizou 74% dos ovos de *M. incognita* e 89% dos ovos de *H. glycines*.

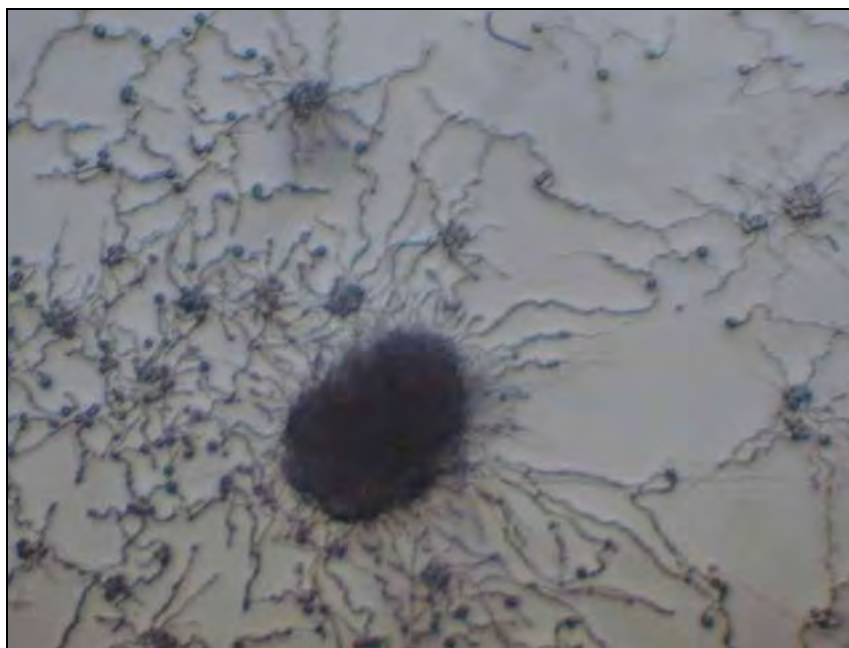


Figura 5. Ovo de *Meloidogyne incognita* colonizado por *Pochonia chlamydosporia*

#### **5.4 Compatibilidade dos Fungos Nematófagos e Nemix com Agroquímicos Utilizados na Cultura da Soja**

Apenas os inseticidas Regent e Standak se mostraram compatíveis com o fungo *P. chlamydosporia*, obtendo 86% e 91% de germinação de conídios, respectivamente. Para os outros produtos a germinação ficou abaixo de 10%. O mesmo resultado foi também verificado para *P. lilacinus* em relação os produtos Regent e Standak, para os quais se obteve 92% e 87% de germinação de conídios, respectivamente.

#### **5.5. Antagonismo de *Pochonia chlamydosporia* e *Paecilomyces lilacinus* a *Fusarium solani* e *Rhizoctonia solani***

Os resultados do ensaio avaliando a proteção de *P. chlamydosporia* e *P. lilacinus* a problemas de emergência de plântulas com tombamento encontram-se nas Figuras 6 e 7.

Pelos resultados de ensaio de emergência (Figura 6) observa-se que o tratamento de sementes com *P. chlamydosporia* e *P. lilacinus* não interferiu na emergência das plântulas. O inóculo de *R. solani* no substrato também não afetou a germinação, seja em sementes tratadas ou não com os fungos. Já o inóculo de *F. solani* afetou significativamente a emergência, mas os tratamentos de sementes com os fungos nematófagos não evitaram este efeito.

*P. chlamydosporia* tem sido descrito como parasita de fungos de solo parasitas de plantas (LEINHOS & BUCKENAUER, 1992), e estudos de JACOBS et al. (2003) e MONFORT et al. (2003) demonstraram sua capacidade de antagonismo a *F. oxysporum* e *R. solani*. Porém neste experimento isto não ocorreu, visto que 30 dias após o plantio tanto *F. solani* quanto *R. solani* causaram tombamento nas plantas e o tratamento de sementes com os agentes de controle não foi eficaz, ou seja, não foi diferente dos tratamentos sem os agentes (Figura 7).

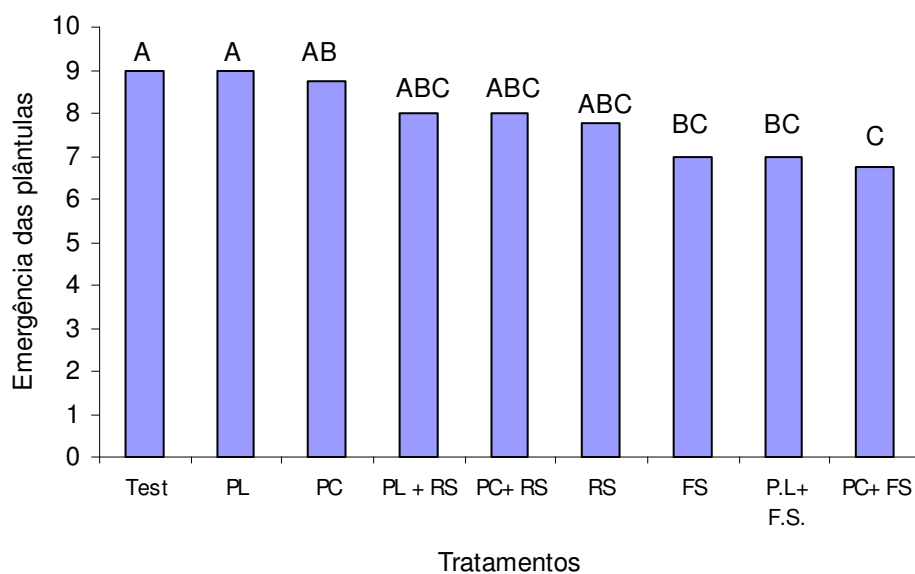


Figura 6. Efeito dos fungos fitopatogênicos na emergência de plântulas de soja em solo estéril com 10 dias de idade após tratamento de sementes com agentes de biocontrole: PL: sementes tratadas com *P. lilacinus*; PC: sementes tratadas *Pochonia chlamydosporia*; RS: solo inoculado com *Rhizoctonia solani*; FS: solo inoculado com *Fusarium solani*. PL+RS: sementes tratadas com *Paecilomyces lilacinus*, semeadas em solo inoculado com *R. solani*; PC+RS: sementes tratadas com *P. chamydosporia*, semeadas em solo inoculado com *R. solani*; PL+FS: sementes tratadas com *P. lilacinus*, semeadas em solo inoculado com *F. solani*; PC+FS: sementes tratadas com *P. chamydosporia*, semeadas em solo inoculado com *F. solani*. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Teste F para tratamentos: 5,09\*\*; Desvio padrão: 0,77; C.V. (%): 9,80.

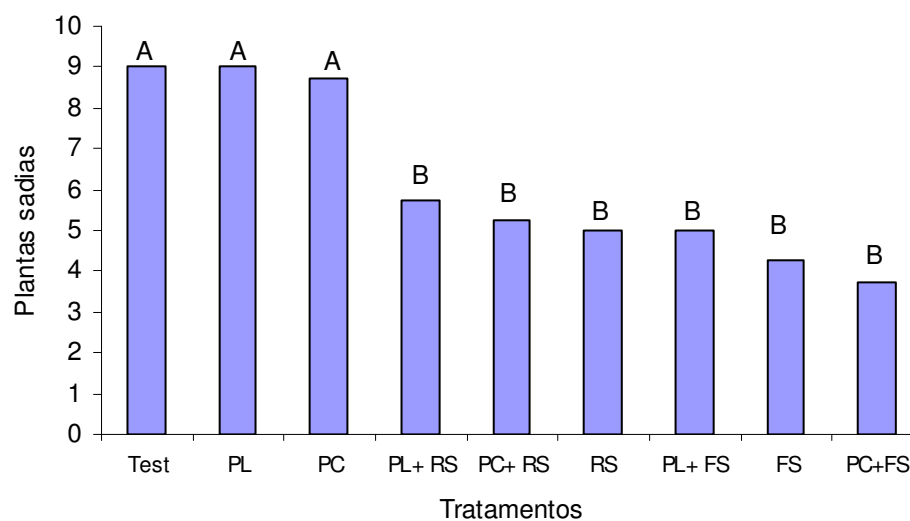


Figura 7. Efeito no número de plantas sadias após 30 dias de plantio em solo estéril provenientes de sementes de soja tratadas com agentes de biocontrole: PL: sementes tratadas com *Paecilomyces lilacinus*; PC: sementes tratadas *Pochonia chlamydosporia*; RS: solo inoculado com *Rhizoctonia solani*; FS: solo inoculado com *Fusarium solani*. PL+RS: sementes tratadas com *P. lilacinus*, semeadas em solo inoculado com *R. solani*; PC+RS: sementes tratadas com *P. chamydosporia*, semeadas em solo inoculado com *R. solani*; PL+FS: sementes tratadas com *P. lilacinus*, semeadas em solo inoculado com *F. solani*; PC+FS: sementes tratadas com *P. chamydosporia*, semeadas em solo inoculado com *F. solani*. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Teste F para tratamentos: 12,86\*\*; Desvio padrão: 1,18; C.V. (%): 19,09.

## 5.6. Potencial do Controle de *Meloidogyne incognita* Infectando Plantas de Soja em Casa de Vegetação

### 5.6.1 Número de galhas de *Meloidogyne incognita* nas raízes da soja

O número de galhas encontrado nas raízes após os tratamentos biológicos não diferiu da testemunha com o nematóide apenas. O mesmo ocorreu em relação ao tratamento com o produto químico que, apesar de não ter diferido da testemunha sem infestação, também não diferiu da testemunha infestada com *M. incognita* (Figura 8).

Em outras culturas CABANILLAS et al. (1989) e JATALA (1985) conseguiram redução significativa do número de galhas de *M. incognita* por *P. lilacinus* em tomateiro. SHARMA & TRIVEDI (1989) constataram o mesmo fato em raízes da planta de berinjela. Além disso, RODRIGUEZ-KABANA et al. (1984), em solos naturalmente infestados por *Meloidogyne arenaria* conseguiram controle significativo do número de galhas com o uso de *P. lilacinus* e *P. chlamydosporia*. No Brasil, SANTIAGO et al. (2006), em testes com diferentes isolados de *P. lilacinus*, verificaram que a maioria destes isolados promoveram a redução do número de galhas de *M. paranaensis* em tomateiros. Também FREITAS et al. (1999) conseguiu redução do número de galhas de *M. javanica* em tomateiro com o uso de mudas com o substrato colonizado por *P. lilacinus*.

JATALA (1986) constatou, em laboratório, elevada eficácia de *P. lilacinus* em infectar e destruir ovos de *M. incognita*. Segundo DELEIJ et al. (1993) obtiveram mais de 90% de redução da população de nematóides aplicando *P. chlamydosporia* a campo. Formulações comerciais de ambos os fungos estão disponíveis em vários países para controle de nematóides de galhas, porém no Brasil, apesar de algumas empresas estarem testando estes organismos, não existe nenhum produto registrado.

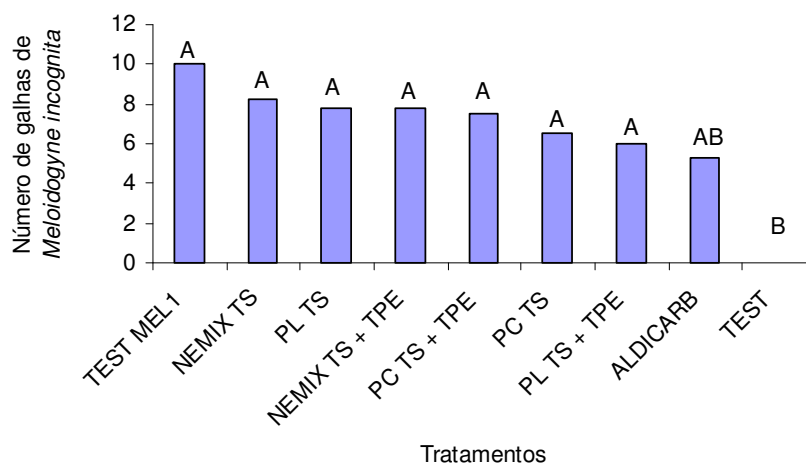


Figura 8. Número de galhas de *Meloidogyne incognita* formadas nas raízes de soja após tratamento com os agentes biológicos e o agente químico e inoculação do parasita. TEST: testemunha sem inoculação do nematóide e sem aplicação dos agentes de controle; TEST MEL: testemunha com inoculação de *M. incognita*; PC TS: tratamento de sementes com *Pochonia chlamydosporia*; PL TS tratamento de sementes com *P. lilacinus*; Nemix TS: tratamento de sementes com Nemix; Nemix TS+TPE: tratamento de sementes e aplicação em pós-emergência com Nemix; PLTS+TPE: tratamento de sementes e aplicação em pós-emergência com *Paecilomyces lilacinus*; Aldicarb: aplicação de Aldicarb em pós emergência; PCTS+TPE: tratamento de sementes e aplicação em pós-emergência com *P. chlamydosporia*. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Teste F para blocos: 14,4\*\*; Teste F para tratamentos: 5,5\*\*; Desvio padrão: 2,40; C.V. (%): 36,7.

### 5.6.2 Peso da matéria seca das raízes de soja

Os nematóides tendem a reduzir o desenvolvimento e, portanto, o peso da matéria seca das raízes, principalmente em infestações severas (VILAS-BOAS et al., 2002). Apenas no tratamento das sementes com *P. lilacinus* (PL TS) obteve-se um peso de matéria seca significativamente maior que o obtido na testemunha inoculada com *M. incognita* (Figura 9) evidenciando a ação do fungo na redução da atividade do nematóide. Este resultado corrobora o trabalho de SANTIAGO et al. (2006), que conseguiram maiores pesos de raízes de tomateiros tratados com alguns isolados *P. lilacinus* infestados com *M. paranaensis*.

### 5.6.3. Número de ovos de *Meloidogyne incognita* nas raízes de soja

O tratamento das sementes de soja com ambos os fungos junto com a aplicação dos mesmos em pós-emergência (PL TS + TPE e PC TS + TPE); PL TS: tratamento de sementes com *P. lilacinus*; TPE: tratamento de sementes e aplicação em pós-emergência com Nemix e PC TS: tratamento de sementes com *P. chlamydosporia*, o tratamento das sementes apenas com Nemix (Nemix TS) e também em pós emergência (Nemix TS + TPE), e a aplicação de Aldicarb em pós-emergência reduziram significativamente o número de ovos de *M. incognita* nas raízes de soja. Os demais tratamentos não diferiram estatisticamente. A maior redução foi obtida no tratamento com *P. chlamydosporia* + pós emergência (Figura 10). Estes resultados corroboram a literatura existente a respeito dos fungos, conhecidos ovicidas. O resultado condiz com CAMPOS & CAMPOS (1997), que constataram redução do número de ovos por grama de raiz usando *P. lilacinus* e *P. chlamydosporia*.

Trabalhos de JATALA et. al (1981) e SILVA et. al. (1992), também apontam *P. lilacinus* como agente de grande potencial de controle de ovos de *M. incognita* em condições de campo

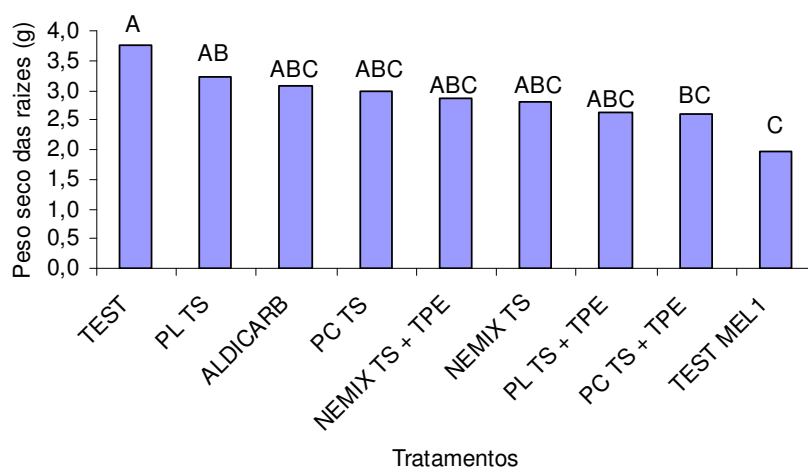


Figura 9. Peso da matéria seca das raízes de soja após tratamento com os agentes biológicos e o agente químico, e inoculação do parasita. TEST: testemunha sem inoculação do nematóide e sem aplicação dos agentes de controle; TEST MEL: testemunha com inoculação de *M. incognita*; PC TS: tratamento de sementes com *Pochonia chlamydosporia*; PL TS tratamento de sementes com *Paecilomyces lilacinus*; Nemix TS: tratamento de sementes com Nemix; Nemix TS+TPE: tratamento de sementes e aplicação em pós-emergência com Nemix; PLTS+TPE: tratamento de sementes e aplicação em pós-emergência com *P. lilacinus*; Aldicarb: aplicação de Aldicarb em pós-emergência; PCTS+TPE: tratamento de sementes e aplicação em pós-emergência com *P. chlamydosporia*. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Teste F para blocos: 3,38\*\*; Teste F para tratamentos: 4,28\*\*; Desvio padrão: 0,47; C.V. (%): 16,3.

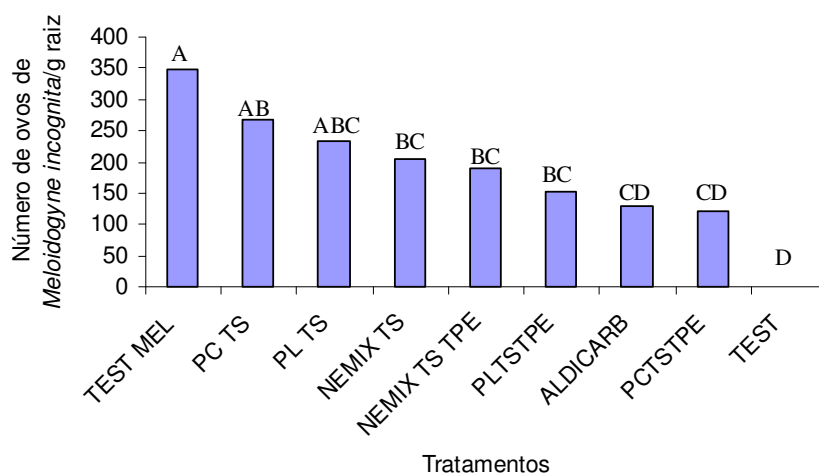


Figura 10. Número de ovos de *Meloidogyne incognita* nas raízes de soja após tratamento com os agentes biológicos e o agente químico, e inoculação do parasita. TEST: testemunha sem inoculação do nematóide e sem aplicação dos agentes de controle; TEST MEL: testemunha com inoculação de *M. incognita*; PC TS: tratamento de sementes com *P. chlamydosporia*; PL TS: tratamento de sementes com *Paecilomyces lilacinus*; NEMIX TS: tratamento de sementes com Nemix; NEMIX TS+TPE: tratamento de sementes e aplicação em pós-emergência com Nemix; PLTS+TPE: tratamento de sementes e aplicação em pós-emergência com *P. lilacinus*; Aldicarb: aplicação de Aldicarb em pós-emergência; PCTS+TPE: tratamento de sementes e aplicação em pós-emergência com *P. chlamydosporia*. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Teste F para blocos: 3,38\*\*; Teste F para tratamentos: 4,28\*\*; Desvio padrão: 0,47; C.V. (%): 16,3.

#### 5.6.4 Número de juvenis de *Meloidogyne incognita* nas raízes de soja

Pelos resultados obtidos neste trabalho apenas Aldicarb proporcionou redução no número de juvenis (Figura 11). Em outras culturas e situações, utilizando filtrados de culturas de *P. lilacinus*, COSTA et al. (2000) atestam redução da motilidade, eclosão e aumento da mortalidade de J2 de *Meloidogyne incognita* significativos e semelhantes à Aldicarb. Também CAMPOS & CAMPOS (1997) constataram redução de número de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne sp.* com aplicação de *P. chlamydosporia* e *P. lilacinus*. MACHADO & CAMPOS (1997) conseguiram redução do número de juvenis de *M. javanica* com *P. lilacinus* e *P. chlamydosporia* cultivados em diferentes substratos, sendo os melhores resultados conseguidos com o crescimento dos fungos em esterco bovino e farelo de arroz.

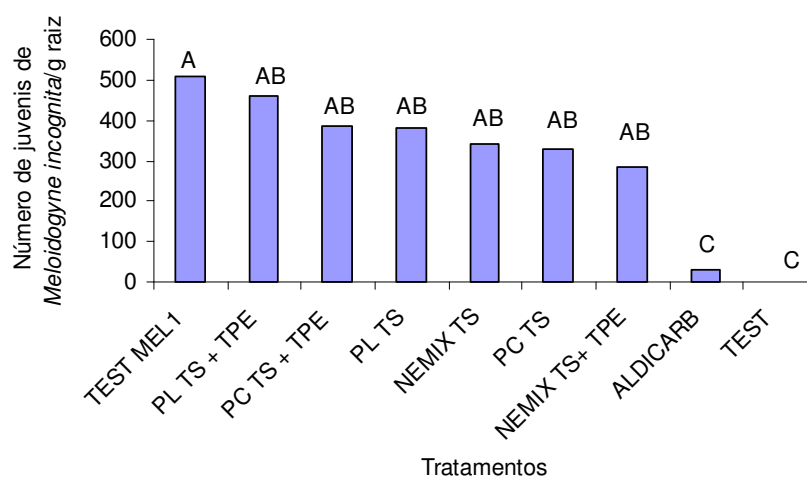


Figura 11. Número de juvenis de *Meloidogyne incognita* nas raízes de soja após tratamento com os agentes biológicos e o agente químico, e inoculação do parasita em casa de vegetação. TEST: testemunha sem inoculação do nematóide e sem aplicação dos agentes de controle; TEST MEL: testemunha com inoculação de *M. incognita*; PC TS: tratamento de sementes com *Pochonia chlamydosporia*; PL TS tratamento de sementes com *P. lilacinus*; Nemix TS: tratamento de sementes com Nemix; Nemix TS+TPE: tratamento de sementes e aplicação em pós-emergência com Nemix; PLTS+TPE: tratamento de sementes e aplicação em pós-emergência com *P. lilacinus*; Aldicarb: aplicação de Aldicarb em pós emergência; PCTS+TPE: tratamento de sementes e aplicação em pós-emergência com *P. chlamydosporia*. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Teste F para blocos: 0,35NS; Teste F para tratamentos: 13,18\*\*; Desvio padrão: 54,51; C.V. (%): 29,82.

## **5.7. Controle de *Meloidogyne incognita* e *Heterodera glycines* com Fungos nematófagos e Nemix em Condições de Campo**

### **5.7.1. Experimento de campo realizado com *Meloidogyne incognita* (Reboleira) na Fazenda Rio Brilhante, município de Coromandel - MG)**

Os resultados do número de juvenis de *M. incognita* / 150 cc de solo e do número de juvenis e ovos por grama de raiz estão representados nas Figuras 12 e 13. Apenas no tratamento com Aldicarb se observou redução na presença de juvenis no solo. Nos tratamentos com os agentes de controle biológico não houve redução do número de juvenis em relação à testemunha, mas também não apresentaram diferença do tratamento com Aldicarb. Para o número de ovos e juvenis por grama de raiz os mesmos resultados foram obtidos.

Os resultados encontrados na literatura com outras culturas divergem do encontrado neste trabalho com raízes de soja. De acordo com KIEWNICK & SIKORA (2006), o tratamento de solo com *P. lilacinus* antes do plantio reduziu o número de galhas em 66%, o número de massas de ovos em 74% e o número de juvenis nas raízes em 71% comparados com a testemunha. Porém para estes autores uma dose mínima foi exigida para o controle, a qual foi, para o isolado 251 de *P. lilacinus*, correspondente à concentração de  $1 \times 10^6$  conídios por grama de solo. Da mesma forma, LARA et al. (1996) demonstraram que *P. lilacinus* reduziu significativamente a população de *M. incognita* no solo e nas raízes de tomateiro e aumentou a produtividade. SIDDIQUI et al. (2000) reportaram redução de infestação de *M. javanica* em tomateiro. *P. chlamydosporia* é um parasita facultativo de nematóides de galhas, porém em certas situações tem promovido uma redução significativa na população desses nematóides (DELEIJ et al., 1993; BOURNE et al. (1996). Porém estes autores sugerem que um controle efetivo de nematóides por este fungo depende da susceptibilidade da cultivar ao nematóide e da capacidade de *P. chlamydosporia* em colonizar a rizosfera daquela espécie de planta em particular.

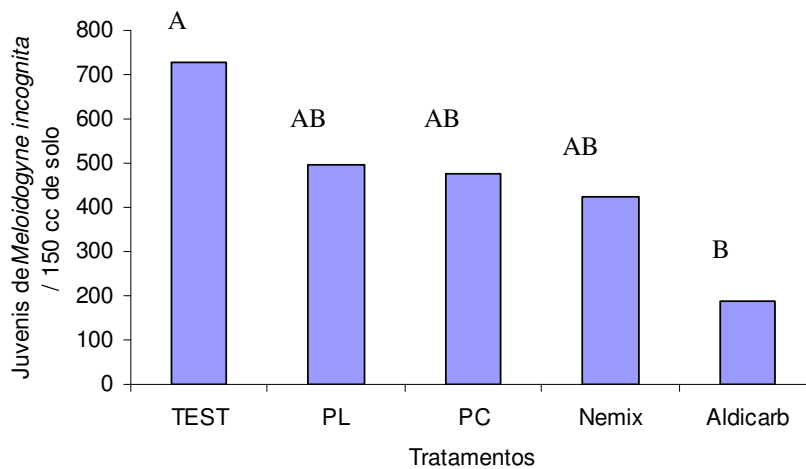


Figura 12. Número de juvenis de *Meloidogyne incognita* por 150 cc de solo sob cultivo de soja após tratamento com os agentes biológicos e o agente químico em área naturalmente infestada. TEST: testemunha sem inoculação do nematóide e sem aplicação dos agentes de controle; PC: *Pochonia chlamydosporia*; PL: *P. lilacinus*; Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Teste F: 4,97\*\*; Desvio padrão: 148,81; C.V. (%): 32,09. PC: *Pochonia chlamydosporia*; PL: *Paecilomyces lilacinus*; TEST: Testemunha

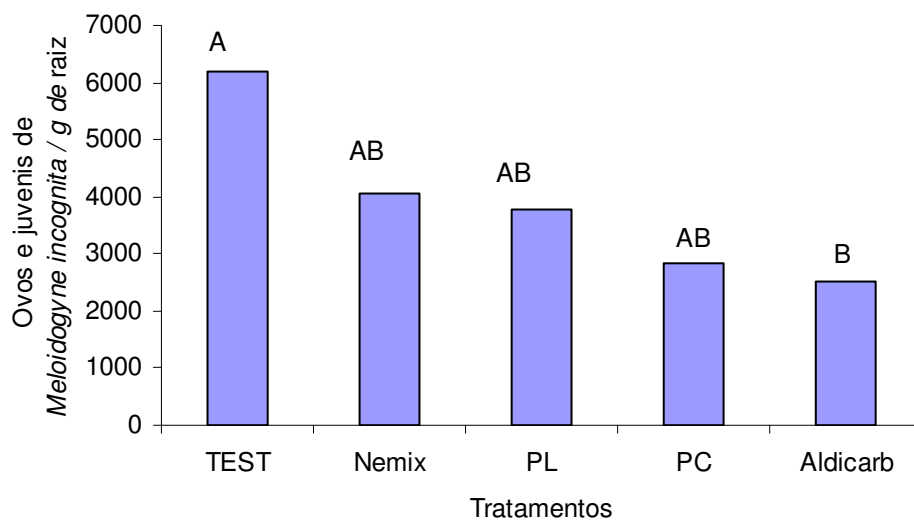


Figura 13. Número de ovos e juvenis de *Meloidogyne incognita* nas raízes de soja após tratamento com os agentes biológicos e o agente químico, em área naturalmente infestada sob cultivo de soja. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Teste F para blocos: 0,44NS; Teste F para tratamentos: 4,38\*\*; Desvio padrão: 1199,3,51; C.V. (%): 30,88. PC; *Pochonia chlamydosporia*; PL; *Paecilomyces lilacinus*; Testemunha; TEST.

### 5.7.2. Experimento de campo realizado com *Heterodera glycines* (Reboleira na Fazenda São Francisco)

Os resultados na área naturalmente infestada com *H. glycines* estão representados nas Figuras 14 e 15.

Apenas no tratamento com Aldicarb houve uma redução significativa no número de juvenis de *H. glycines* no solo, e do mesmo modo que no experimento realizado com *M. incógnita*, o tratamento com Aldicarb não diferiu dos tratamentos com os produtos biológicos, embora estatisticamente os mesmos não tenham diferido da testemunha. Isto também ocorreu com o número de ovos e juvenis nas raízes. Porém no caso de cistos presentes no solo (Figura 16), o agente mais eficaz foi *P. chlamydosporia*, que diferiu significativamente de todos os demais tratamentos. Os tratamentos com *P. lilacinus* e Aldicarb também reduziram o número de cistos, enquanto que Nemix não diferiu da testemunha. Em revisão sobre o controle de nematóides por *P. lilacinus* CANNAVANE & SIVAKUMAR (2001) citaram vários trabalhos nos quais é reportado o controle do nematóide do cisto da batata *Globodera rostochiensis* e também de nematóides de galhas por *P. lilacinus*. OLIVARES-BERNABEU & LLOPEZ-LORCA (2002), pesquisando fungos que parasitavam ovos de *H. glycines*, detectaram que *P. chlamydosporia* foi o parasita mais comum.

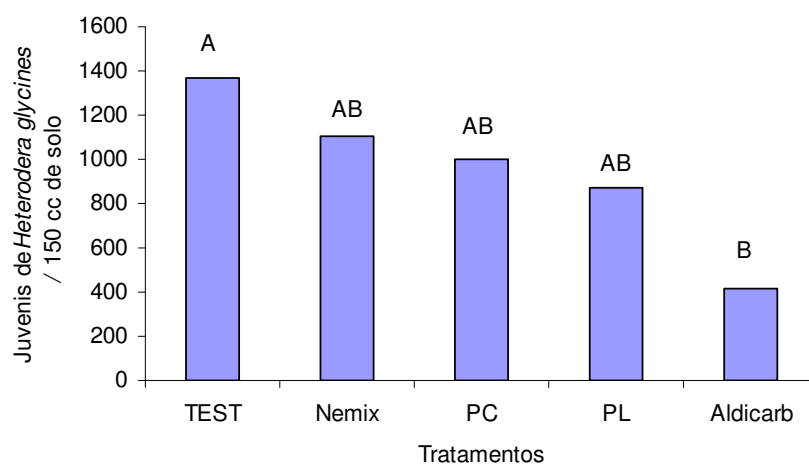


Figura 14. Número de juvenis de *Heterodera glycines* no solo cultivado sob soja: PC: *Pochonia chlamydosporia*; PL: *Paecilomyces lilacinus*; TEST: Testemunha. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Teste F: 5,96\*\*; Desvio padrão: 248,1; C.V. (%): 26,01.

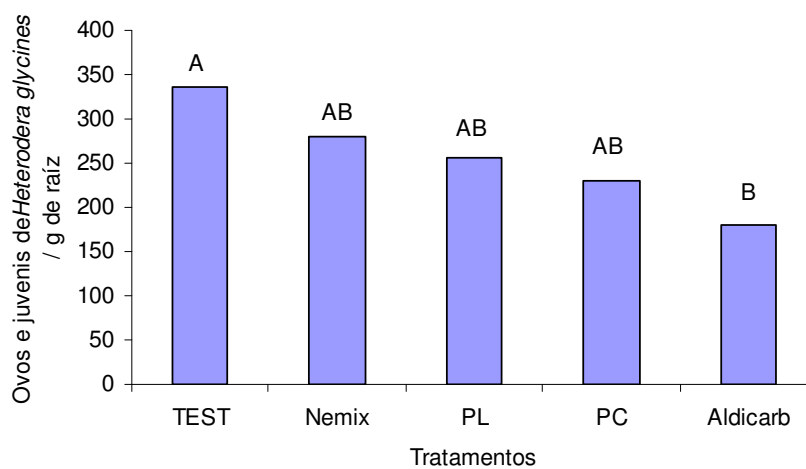


Figura 15. Número de ovos e juvenis de *Heterodera glycines* por grama de raízes de soja em área naturalmente infestada: PC: *Pochonia chlamydosporia*; PL: *Paecilomyces lilacinus*; TEST: Testemunha. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Teste F para blocos: 0,74NS; Teste F para tratamentos: 3,98\*; Desvio padrão: 50,26; C.V. (%): 19,53.

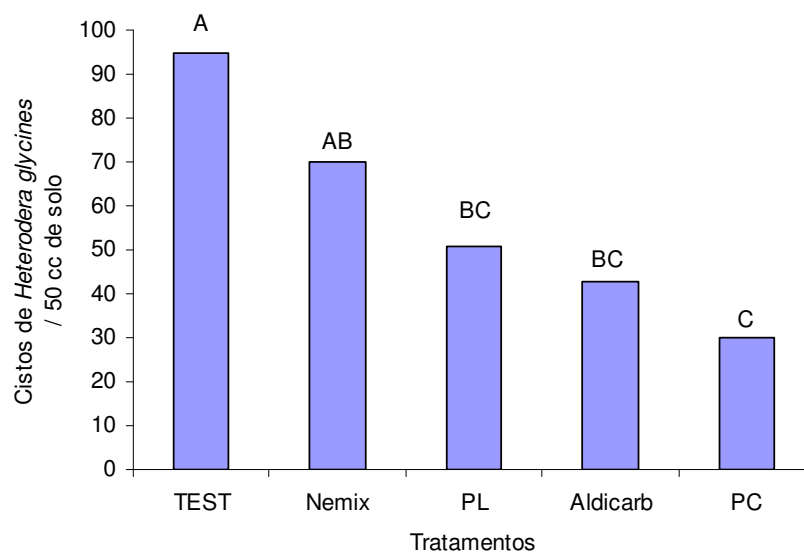


Figura 16. Número de cistos totais de *Heterodera glycines* no solo cultivado com soja: PC: *Pochonia chlamydosporia*; PL: *Paecilomyces lilacinus*; TEST: Testemunha. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Teste F: 14,49\*; Desvio padrão: 11,58; C.V. (%): 20,04.

## VI. CONCLUSÕES

Nas condições de realização deste trabalho foi possível concluir que:

a) Os meios sólidos preparados com grãos de arroz e milho são adequados para a produção massal de conídios tanto de *P. chlamydosporia* quanto de *P. lilacinus*.

b) Os isolados de *P. chlamydosporia* e *P. lilacinus* são patogênicos para ovos de *M. incognita* e *H. glycines*.

c) Os agroquímicos se mostraram pouco seletivos aos isolados de *P. chlamydosporia* e *P. lilacinus*, que foram compatíveis apenas com Regent e Standak.

d) *P. chlamydosporia* e *P. lilacinus* não são eficientes para reduzir a ocorrência de tombamento em plantas da variedade M-SOY 6101 de soja, causado por *F. solani* e *R. solani*.

e) Em ensaios conduzidos em casa de vegetação com plantas de soja, apenas Aldicarb foi eficiente na redução do número de ovos e juvenis de *M. incognita*. *P. lilacinus* favoreceu a manutenção do peso da matéria seca das plantas e reduziu o número de ovos, enquanto Nemix e *P. chlamydosporia* somente tiveram ação efetiva na redução do número de ovos do nematóide.

f) Nos ensaios realizados em condições de campo, somente Aldicarb se mostrou eficiente na redução do número de juvenis no solo e de juvenis e ovos de *M. incognita* e *H. glycines* nas raízes de plantas de soja. *P. chlamydosporia* foi o

agente mais efetivo na redução do número de cistos de *H. glycines* no solo, tendo também os tratamentos com *P. lilacinus* e aldicarb reduzido significativamente estes inóculos.

## VII. REFERÊNCIAS

AHMAD, S. F.; KHAN, T. A. Management of root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*, by integration of *Paecilomyces lilacinus* with organic materials in Chilli. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, London, v. 37, p. 35-40, 2004.

AHREN, D.; TUNLID, A. Evolution of parasitism in nematode-trapping fungi. **Journal of Nematology**, Hanover, v. 35, p. 194-197, 2003.

ALMEIDA, A. M. R. Observação de resistência parcial a *Septoria glycines* em soja. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 2, p. 214-216, 2001.

ALVES, F.R.; CAMPOS, V.P. Efeitos da temperatura sobre a atividade de fungos no controle biológico de *Meloidogyne javanica* e *Meloidogyne incognita* raça 3. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 27, n.1, p. 91-97, jan./fev., 2003.

ALVES, S. B. Ed. **Controle Microbiano de Insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1163 p., 1998.

ARAÚJO, F. F.; SILVA, J.F.V.; ARAÚJO, A. S. F. Influência de *Bacillus subtilis* na eclosão, orientação e infecção de *Heterodera glycines* em soja. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.32, n.2, p.197-202, 2002.

ARAUJO, W. L.; LIMA, A. O. S.; AZEVEDO, J. L.; MARCON, J.; KUBLINCKY-SOBRAL, J.; LACAVA, P. T. **Manual: isolamento de microrganismos endofíticos**. Piracicaba: Calq, 2002, 86p.

ATKINS, S.D.; HIDALGO-DIAZ, L.; KALISZ, H.; MAUCLINE, T. H.; HIRSCH, P. R.; KERRY, B. R. Development of a new management strategy for the control of root-knot

nematodes (*Meloidogyne* spp.) in organic vegetable production. **Pest Management Science**, Brighton, v. 59, p. 183-189, 2003.

AZEVEDO, J. L. Microorganismos endofíticos. In: Melo, I. S. & Azevedo, J. L. (Eds). **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: EMBRAPA, 1998. p. 117-137.

AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI Jr., W.; PEREIRA, J. O.; ARAÚJO, W. L. Endophytic microorganisms: A review on insect control and recent advantages on tropical plants. **Environmental Biotechnology**, v. 3, n.1, 31 p., 2000.

BASSETO, M. A.; CERESINI, P. C.; VALÉRIO FILHO, W. V. Severidade da mela da soja causada por *Rhizoctonia solani* AG-1 IA em função de doses de potássio. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 33, n .1, p. 56-62, 2007.

BARKER, K. R.; KOENNING, S. R. Developing sustainable systems for nematode management. **Annal Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 36, p. 165-205, 1998.

BARRON, G. L. **The nematode destroying fungi**. Ghelph: Canadian Biological Publications Ltda, 1977, 140p.

BENZ, G. Environment. In. FUXA, R.; TANADA, Y. (Eds.). **Epizootiology of insect diseases**. New York: Wiley, 1987. p.177-214.

BETTIOL, W., KIMATI, H. Efeito de *Bacillus subtilis* sobre *Pyricularia oryzae* agente causal de bruzone do arroz. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.25, p.1165-1174, 1990.

BONANTS, P. J. M.; FITTERS, P. F. L.; DEN BELDER, E.; WAALWIJK, C.; HENFLING, J. W. D. M. A basic serine protease from *Paecilomyces lilacinus* with biological activity against *Meloidogyne hapla* eggs. **Microbiology**, Dublin, v. 141, p. 775-784, 1995.

BORDALLO, J. J.; LOPEZ-LLORCA, L. V.; JANSSON, H. B.; SALINAS, J.; ASENSIO, L. Colonisation of plant roots by egg-parasitic and nematode-trapping fungi. **New Phytologist**, v. 154, p. 491-499, 2002.

BOURNE, J. M.; KERRY, B. R.; DE LEIJ, F. A. A. M. The importance of the host plant on the interaction between root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) and the nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium* Goddard. **Biocontrol Science and Technology**, Lethbridge, v. 6, p. 539-548, 1996.

CABANILLAS, E.; BARKER, K. R.; NELSON, L. A. Growth of isolates of *Paecilomyces lilacinus* on their efficacy in biocontrol of *Meloidogyne incognita* on tomato. **Journal of Nematology**, Hanover, v. 21, n. 2, p. 164-172, 1989.

CAMPOS, V. P. Perspectivas do controle biológico de fitonematóides. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 16, p. 26-30, 1992.

CAMPOS, H. D.; CAMPOS, V. P. Efeito da época e forma de aplicação dos fungos *Arthrobotrys conoides*, *Arthrobotrys musiformis*, *Paecilomyces lilacinus*, e *Verticillium chlamydosporium* no controle de *Meloidogyne exigua* do cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 3, p. 261-265, 1997.

CANNAYANE, I.; SIVAKUMAR, C. V. Nematode egg-parasitic fungus: *Paecilomyces lilacinus* – A review. **Agric. Rev.**, v. 22, p. 79-86, 2001.

CARNEIRO, R. M. D. G.; GOMES, C. B. Metodologia e testes de patogenicidade de *Paecilomyces lilacinus* e *P. fumosoroseus* em ovos de *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 17, p. 66-75, 1993.

CHEN, S. Y.; DICKSON, D. W.; MITCHELL, D. J. Population development of *Heterodera glycines* in response to mycoflora in soil from Florida. **Biological Control**, v. 6, p. 226-231, 2004.

COOLEN, W. A., D'HERDE, C. J. A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue. Ghent: State Agriculture Research Center, 1972, 77p.

COSTA, M. J. N.; CAMPOS, V. P.; PFENNING, L. H.; OLIVEIRA, D. F. Filtrados de culturas fúngicas com ação antagonista a *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood In: **Congresso brasileiro de fitopatologia**, p. 23; 2000.

D'ANGIERI FILHO, C.; CAMPOS, V. P. Controle de *Meloidogyne javanica* em jaborandi (*Pilocarpus microphyllus*) com *Arthrobotrys conoides*, *Paecilomyces lilacinus* e *Verticillium chlamydosporium*. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 21, p. 23-29, 1997.

DELEIJ, F. A. A. M.; DENNEHY, J. A.; KERRY, B. R. Effect of watering on the distribution of *Verticillium chlamydosporium* in soil and the colonization of egg masses of *Meloidogyne incognita* by the fungus. **Nematologica**, Leithen, v. 39, p. 250-265, 1993.

DOMSCH, K. H.; GAMS, W.; ANDERSON, T. H. **Compendium of Soil Fungi I**. London: Academic Press, 1980, 1.264 p.

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

DUARTE, A.; MENENDEZ, J. M.; TRIGUEIRO, N. Estudio preliminar sobre la compatibilidad de *Metarhizium anisopliae* con algunos plaguicidas químicos. **Rev. Baracoa**, La Habana, v. 22, p. 31-39, 1992.

EHTESHAMUL, H. S.; ZAKI, M. J.; ABID, M.; GHAFAR, A. Use of *Verticillium chlamydosporium* in the biological control of root-rot disease of chickpea. **Pakistan Journal of Botany**, v. 26, p. 229-233, 1994.

ESSER, R. P.; EL-GHOLL, N. E. ***Paecilomyces lilacinus*, a fungus that parasitizes nematode eggs**. Fla. Dept. Agriculture & Consumer Service (Nematology Circular, 203). 3 p. 1993.

FREIRE, F. C. O.; BRIDGE, J. Parasitism of eggs, females and juveniles of *Meloidogyne incognita* by *Paecilomyces lilacinus* and *Verticillium chlamydosporium*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 10, n. 3, p. 577-596, 1985.

FREITAS, L. G.; FERRAZ, S.; ALMEIDA, A. M. S. Controle de *Meloidogyne javanica* em tomateiro pela produção de mudas de tomateiro em substrato infestado com *Paecilomyces lilacinus*. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 23, n. 1, p. 65-73, 1999.

FRONZA, V. **Genética da reação da soja a *Fusarium solani* f.sp. *glycines***. Tese (Doutorado em Agronomia). Escola Superior de Agricultura Luis de Queiroz, Piracicaba, 2003, 154p.

GARCIA, L.; BULNES, C.; MELCHOR, G.; VEGA, G.; MIRANDA, I.; MONTES DE OCA, N.; HIDALGO, L.; MARRERO, E. Safety of *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* in acute oral and dermal toxicity/pathogenicity evaluations in rats and rabbits. **Vet. Hum. Toxicol.**, v. 46, p. 248-250, 2004.

GASPARD, J. T.; MANKAU, R. Nematophagous fungi associated with *Tylenchulus semipenetrans* and the citrus rhizosphere. **Nematologica**, Leithen, v. 32, p. 359-363, 1986.

GAZZONI, D. L., YORINORI, J. T. **Manual de identificação de pragas e doenças da soja**. Brasília: Embrapa, SPI, 128 p. 1995

GOETTEL, M. S.; HAJEK, A. E.; SIEGEL, J. P.; EVANS, H. C. Safety of fungal biocontrol agents. In: BUTT, T. M.; JACKSON, C.; MAGAN, N. **Fungal as biocontrol agents: problems, progress and potential**. United Kingdom: CABI Publishing, 2001, cap. 13, p. 347-376.

HALLMANN, J., FAUPEL, A., KRECHEL, A., SIKORA, R. A., BERG, G. Endophytic bacteria and biological control of nematodes Münster, **Bulletin OILB/SROP**, v. 27, n. 1, p. 83-94, 2004.

JACOBS, H.; GRAY, S. N.; CRUMP, D. H. Interactions between nematophagous fungi and consequences for their potential as biological agents for the control of potato cyst nematodes. **Mycological Research**, Amsterdam, v. 107, p. 47-56, 2003.

JANSSON, H-B.; TUNLID, A.; NORDBRING-HERTZ, B. Biological control: Nematodes. In: ANKE, T. Ed. **Fungal Biotechnology**. Weinheim: Chapman and Hall, p. 38-50, 1997.

JATALA, P.; KAELTENBACH, M.; BOCANGEL, D. A. J. Field application of *Paecilomyces lilacinus* for controlling *Meloidogyne incognita* on potatoes. **Journal of Nematology**, DeLeon Springs, v. 12, p. 226-227, 1980.

JATALA, P. Biological control of nematodes. In: SASSER, J.N.; CARTER, E.C. **An Advanced treatise on Meloidogyne**. North Carolina: North Carolina State University, 1985. p. 303-308.

JATALA, P. Biological control of plant-parasitic nematodes. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 24, p. 453-489, 1986.

JATALA, P.; SALAS, R.; BOCANGEL, M. Multiple application and long-term effect of *Paecilomyces lilacinus* in controlling *Meloidogyne incognita* under field condition. **Journal of Nematology**, DeLeon Springs, v. 13, n. 4, p. 445-, 1981.

JENKINS, W. R. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. **Plant Disease Reporter**, Sant Paul, v. 48, p. 629, 1964.

KERRY, B. R.; CRUMP, D. H.; MULLEN, L. A. Studies of the cereal cyst-nematode *Heterodera avenae* under continuous cereals, 1975-1978. II. Fungal parasitism of nematode eggs and females. **Annals of Applied Biology**, Camberra, v. 100, p. 489-499, 1982.

KERRY, B. R. Biological control *In* R. H. Brown & B. R. Kerry, eds. 92 **Biological control of nematodes: prospects and opportunities Principles and practice of nematode control in crops**, p. 233-263. Sydney: Australia, Academic Press, 1987.

KERRY, B. R.; HIDALGO-DIAZ, L. Application of *Pochonia chlamydosporia* in the integrated control of root-knot nematodes on organically grown vegetable crops in Cuba. *In*: Sikora, R. A.; GOWEN, S.; HAUSCHILD, R.; KIEWNICK, S. Eds. Multitrophic interactions in soil. **IOBC/WPRS Bulletin**. v. 27, p. 123-126, 2004.

KIEWNICK, S.; SIKORA, R. A. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* by *Paecilomyces lilacinus* strain 251. **Biological Control**, v. 38, p. 179-187, 2006.

KIMPINSKI, J., STURZ, A. V. Managing crop root zone ecosystems for prevention of harmful and encouragement of beneficial nematodes. **Soil Till Res.**, v. 72, p. 213-221, 2003.

KREBS, B., JUNGE, H., OCKHARDT, A. *Bacillus subtilis*: an effective biocontrol agent. **Pesticides Sciences**, v.37, p.427-429, 1993.

LARA, J.; ACOSTA, N.; BETANCOURT, C.; VINCENTE, N.; RODRÍGUEZ, R. Biological control of *Meloidogyne incognita* in tomato in Puerto Rico. **Nematropica**, Auburn, v. 26, p. 143-152, 1996.

LEINHOS, G. M. E.; BUCHENAUER, H. Inhibition of rust diseases os cereals by metabolic products of *Verticillium chlamydosporium*. **Journal of Phytopathology**, v. 136, p. 177-193, 1992.

LLOPEZ-LORCA, L. V.; BORDALLO, J. J.; SALINAS, J.; MONFORT, E.; LÓPEZ, M. L. Use of light and scannig electron microscopy to examine colonisation of barley rhizosphere by nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium*. **Micron**, v. 33, p. 61-67, 2002.

LIU, X. Z.; SUN, M. H.; GUO, R.J.; ZHANG, Y. Q.; XIE, Y. Q. QIU, W. F. Biological control of the soybena cyst nematode in china. **Journal of Nematology**, Hanover, v. 23, p. 275-282, 1996.

MACHADO, V. O. F.; CAMPOS, V. P. Cultivo de fungos antagonistas em diferentes substratos e avaliação da eficiência no controle de *Meloidogyne javanica* **Fitopatologia Brasileira**, v. 33, n. 3, p. 387-391, 1997.

MAPA, 2008. Disponível em: (<http://www.agricultura.gov.br>). Acesso em: janeiro de 2008.

MONFORT, E.; LLOPEZ-LORCA, L.V.; JANSSON, H-B.; SALINAS, J.; PARK, J. O.; SIVASITHAMPARAM, K. Colonisation of seminal roots of wheat and barley by egg-parasitic nematophagous fungi and their effects on *Gaeumannomyces graminis* var.

tritici and development of root-rot. **Soil Biology and Biochemistry**, United Kingdom, v. 37, p. 1229-1235, 2005

MONFORT 2003 CITAR???

MORGAN-JONES, G.; WHITE, J. F.; RODRIGUEZ-KABANA, R. Phytonematode pathology: ultrastructural Studies. Parasitismo *Meloidogyne arenaria* eggs by *Verticillium chlamydosporium*. **Nematropica**, Auburn, v. 13, p. 245-260, 1983.

NEVES, P. M .O. J. Compatibility of entomopathogenic fungi with neonicotinoid insecticides. **Neotropical Entomology**, Londrina, v.30, p.263-268, 2001

NORONHA, M.A., MICHEREFF, S.J., MARIANO, R.L.R. Efeito do tratamento de sementes de caupi com *Bacillus subtilis* no controle de *Rhizoctonia solani*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 2, p.174-178, 1995

OLIVARES-BERNABEU, C. M.; LÓPEZ-LLORCA, L. V. Fungal egg-parasites of plant-parasitic nematodes from Spanish soils. **Rev Iberoam Micol**, v. 19, p. 104-110, 2002.

PENSMARK, L.; JANSSON, H-B. Nematophagous fungi in the rhizosphere of agricultural crops. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 22, p. 303-312, 1997.

PENSMARK, L.; MARBAN-MENDOZA, N.; JANSSON, H-B. Nematophagous fungi from agricultural soils of Central America. **Nematropica**, v. 2, p. 117-124, 1995.

PETERSON, E. A.; KATZNELSON, H. Studies on the relationships between nematodes and other soil microorganisms. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 11, p. 491-495, 1965.

RIBEIRO, R. C. F.; CAMPOS, V. P. Controle de *Meloidogyne javanica* com fungos parasitas de ovos. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 17, p. 193-202, 1993.

RODRIGUEZ-KÁBANA, R.; MORGAN-JONES, G.; GODOY, G.; GINTIS, B. O. Effectiveness of species of *Giocladium*, *Paecilomyces* and *Verticillium* for control of *Meloidogyne arenaria* in field soil. **Nematropica**, Florida, v. 14, p. 155-170, 1984.

RUMBOS, C. I.; KIEWNICK, S. Effect of plant species on persistence of *Paecilomyces lilacinus* strain 251 in soil and root colonization by the fungus. **Plant and Soil**, v. 283, p. 25-31, 2006.

SANTIAGO, D. C.; HOMECHIN, M.; SILVA, J. F. V.; RIBEIRO, E. R.; GOMES, B. C.; SANTORO, P. H. Seleção de isolados de *Paecilomyces lilacinus* (Thom.) Samson para controle de *Meloidogyne paranaensis* em tomateiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 4, 2006.

SASSER, J. N.; FRECKMAN, D. W. A word perspective on nematology: The role of society. In: VEECH, A. J.; DICKSON, W. D. **Vistas on Nematology**. Deleon Springs, FL: Society of Nematologists Inc., 1987, p. 7-14.

SHARMA, R. D, GOMES, A. C. Controle biológico de *Meloidogyne arenaria* com *Pausteria penetrans*. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 23, n. 1, p. 47-52, 1999.

SHARMA, A.; TRIVEDI, P. C. Influence of inoculum levels of fungus *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson on the biocontrol of root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* (Chitwood). Raleigh, **International Nematological Network Newsletters**, v. 6, n. 2, p. 27-29, 1989.

SIDDIQUI, Z. A.; QURESHI, S. A.; SULTANA, V.; EHTESHAMUL-HAQUE, S.; GHAFFAR, A. Biological Control of rot-root knot disease complex of tomato. **Plant Soil**, v. 227, p. 163-169, 2000.

SIKORA, R. A.; PADGHAM, J. L. Biological control potential and modes of action of *Bacillus megaterium* against *Meloidogyne graminicola* on rice. **Crop Protection**, v. 26, p. 971-977, 2007.

SIKORA, R. A. Management of the antagonistic potential in agricultural ecosystems for the biological control of plant-parasitic nematodes. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 30, p. 245-270, 1992.

SILVA, J. A. L.; NETO, L. M. O.; EULÁLIA MARIA SOUSA, E. M. CARVALHO, E. M. S. Levantamento da ocorrência do nematóide de cistos da soja (*Heterodera glycines*) em áreas de cultivo de soja (*Glycine max*) no cerrado do Piauí. Universidade Federal do Piauí, Pró-reitoria de extensão, Centro de Ciências Agrárias. **Comunicado Técnico**, n. 6, p. 1-4, 2006.

SILVA, J. F. V.; PIZA, S. M. T.; CARNEIRO, R. G. D. Ocorrência de *Paecilomyces lilacinus* parasitando ovos de *Meloidogyne incognita* em amora no noroeste do Paraná. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 16, n. 1-2, p. 74-76, 1992.

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

SOUTHEY, J. F. **Laboratory methods for work with plant and soil nematodes**. (5 ed.). London: Minist. Agric. Fisch. FD.; 1970. 148 p. (Bulletin 2).

STIRLING, G. R. **Biological control of plant parasitic nematodes: progress, problems and prospects**. Wallingford, UK: CAB International, Wallingford, 1991, 282p.

TIHOHOD, D. **Nematologia agrícola aplicada**. 2 ed. Jaboticabal: Funep, 2000, 473p.

TIHOHOD, D. *Nematologia agrícola aplicada*. Jaboticabal: FUNEP, 1993, 372p

VILAS-BOAS, L. C.; TENENTE, R. C. V.; GONZAGA, V.; NETO, S. P. S.; ROCHA, H. S. Reação de clones de bananeira (*Musa* spp.) ao nematóide *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1949, Raça 2. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, n. 3, Jaboticabal, 2002.

VILLANUEVA, L. M.; DAVIDE, R. G. Effects of fungicides, nematicidas and herbicides on the growth of nematophagous fungi *Paecilomyces lilacinus* and *Arthrobotrys cladodes*. **Phil. Phytopathology**, v. 19, p. 24-27, 1983.

WANG, C. J.; SONG, C. Y.; ZHANG, X. D.; XIE, Y. Q.; LIU, X. Z.; WANG, M. Z. Sustainable control efficacy of *Paecilomyces lilacinus* against *Heterodera glycines*. **Chinese Journal of Biological Control**, v. 13, p. 26-28, 1997.

WARRIOR, P., REHBERGER, L. A., BEACU, M., GRAU, P. A., KIRFMAN, G. W., CONLEY, J. M. Commercial development and introduction of DiTera™, a new nematicide. *Pesticide Science*, v. 55, p. 376-379, 1999.

WRATHER, J. A. **Biology and Management of the soybean cyst nematode**. St. Paul: APS Pres., 1992.