

ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE FUNGOS PREDADORES DE NEMATÓIDES

Vânia Silvia Bardauil Alcântara (1)
João Lúcio de Azevedo (2)

INTRODUÇÃO

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

Os fungos predadores desenvolvem mecanismos especiais que são verdadeiras armadilhas para capturar os nematóides do solo. Segundo PRAMER (1964), o primeiro fungo predador de nematóides a ser descrito foi *Arthrobotrys oligospora* (Fresenius, 1852), mas foi WORONIN em 1870, quem primeiro verificou a formação de armadilhas por esse organismo e, somente em 1888, ZOPF observou a captura de nematóides vivos por esse fungo. Entretanto, somente após o trabalho de DRECHSLER (1937), o processo se tornou melhor conhecido. Esse autor estudou com mais detalhes o fenômeno e ainda descreveu 11 novas espécies de fungos capazes de atacar nematóides.

Entre os fungos existem dois tipos de atividade predadora: os captores de nematóides e os parasitos endozóicos.

Os fungos captores de nematóides produzem, em seu micélio, órgãos adesivos, que prendem os nematóides que ficam em contato com os mesmos. Desses órgãos se desenvolvem hifas de assimilação, causando a morte dos nematóides.

(1) Instituto Agronômico, Campinas

(2) Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", USP, Piracicaba.

Segundo DUDDINGTON (1957), algumas espécies de fungos produzem anéis constritores que servem de armadilhas para os nematóides que os atravessam. Além desses anéis existem, ainda, anéis não constritores, que prendem passivamente os nematóides.

Os parasitos endozóicos atacam sua vítima através da produção de esporos viscosos que aderem à cutícula do nematóide, produzindo tubos que a perfuram, penetrando no organismo e aí formando órgãos globosos, dos quais se desenvolvem as hifas de assimilação que se ramificam por todo o corpo do animal. Em outros parasitos endozóicos, os esporos são ingeridos pelo nematóide e formam-se também as hifas de assimilação (LORDELLO, 1976).

O objetivo do presente trabalho foi isolar fungos a partir de nematóides e ensaiá-los quanto à formação de estruturas de captura, para uma posterior tentativa de utilização no controle biológico daqueles parasitos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Nematóides usados

Os nematóides empregados para o isolamento dos fungos pertenciam às espécies *Meloidogyne javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949, proveniente de raízes de tomateiro, feijão alado e tubérculos de batata, e *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1949, proveniente de raízes de cafeeiro e tubérculos de batata.

Isolamento dos fungos

Os fungos presentes na parte externa do corpo dos nematóides foram isolados a partir de fêmeas colocadas em placas de Petri contendo batata dextrose ágar (BDA), acrescido do antibiótico estreptomicina (100 µg/ml), para evitar contaminação bacteriana. As placas foram incubadas a 28°C por 5 dias, procedendo-se, em seguida, à purificação dos fungos e sua estocagem em tubos de ensaio com meio completo (PONTECORVO et alii, 1953), mantidos em refrigerador.

Uma classificação sumária, a nível de gênero foi efetuada, pelas características morfológicas dos fungos.

Formação de estruturas de captura

Apenas os fungos obtidos a partir do nematóide *M. javanica*, de raízes de tomateiro, em número de nove, foram ensaiados em meio de cultura com meal ágar (Difco), recomendado por DUDDINGTON (1957), a fim de se verificar a formação de estruturas de captura de nematóides.

O nematóide utilizado para a verificação dessas estruturas foi *Rotylenchulus reniformis* Linford & Oliveira, 1940, de uma amostra de solo com cultura do algodoeiro, cujas larvas foram extraídas empregando-se o método do peneiramento (OOSTENBRINK, 1960), conjugado ao método de Baermann modificado (MONTEIRO, 1970).

De cada tubo estoque contendo os fungos isolados, foi feita uma suspensão de esporos em tween (0,1% v/v) para se obter uma concentração final de 10^6 esporos/ml, contagem esta, efetuada em hematímetro. Para cada isolado, quatro placas foram inoculadas com nematóides e uma constituiu o controle. As placas foram semeadas em corn meal ágar, contendo $100 \mu\text{g/ml}$ de estreptomicina, usando-se 0,1 ml da suspensão de esporos. O antibiótico teve por finalidade evitar contaminação bacteriana. Decorridas 48 horas a 28°C , as placas dos tratamentos receberam uma mistura de 0,5 ml de suspensão contendo larvas de *R. reniformis* e 0,01 ml de solução de tween, voltando, a seguir, à estufa a 28°C .

Após 24 e 48 horas da adição de nematóide, procedeu-se à observação ao microscópio, efetuando-se a contagem do número de estruturas de captura em 10 campos observados, utilizando-se um aumento de 320X do microscópio. O método foi o mesmo utilizado por SCHENCK & PRAMER (1975) com algumas modificações.

Para se isolar os fungos da parte interna do corpo dos nematóides, grupos de três fêmeas foram mantidos por um minuto em sublimado corrosivo (Hg C12, 1:1000) esmagando-se, então, as fêmeas contra as paredes de tubos de ensaio, contendo 2 ml de solução salina esterilizada. As paredes dos tubos foram lavadas e retirou-se 0,1 ml de cada tubo, semeando-se em placas com BDA. Estas foram incubadas a 28°C por 5 dias, purificando-se os fungos e estocando-os em tubos com meio completo, mantidos no refrigerador.

QUADRO I. Classificação a nível de gênero de 12 dos isolados obtidos.

Isolado n.º	Gênero	Origem
1	<i>Helminthosporium</i>	E ⁺
2	<i>Aspergillus</i>	I ⁺⁺
3	<i>Penicillium</i>	E
5	<i>Penicillium</i>	E
6	<i>Aspergillus</i>	I
8	<i>Pestalotia</i> ⁺⁺⁺	I
11	<i>Helminthosporium</i>	E
12	<i>Fusarium</i> ⁺⁺⁺	E
20	<i>Aspergillus</i>	E
22	<i>Penicillium</i>	E
23	<i>Aspergillus</i>	I
24	<i>Aspergillus</i>	I

+ E — Fungos encontrados na parte externa do corpo das fêmeas

++ I — Fungos encontrados internamente no corpo das fêmeas

+++ — Classificado na Seção de Micologia Fitopatológica do Instituto Biológico.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um total de 24 diferentes isolados de fungos foram obtidos a partir dos nematóides, sendo que apenas 12 puderam ser identificados, como mostra o quadro I. Por esse quadro verifica-se uma predominância do gênero *Aspergillus*, pois dos 12 isolados, cinco pertencem a esse gênero, o que significa, em termos de porcentagem, cerca de 41,6%.

Quanto à formação de estruturas de captura, dos nove fungos ensaiados, apenas dois (isolados n.º 8 e 9) apresentaram tais estruturas (figuras 1, 2 e 3). Os valores dos números de anéis hifais e corpos globosos (Knobs adesivos) observados após 24 e 48 horas da adição dos nematóides, são apresentados nos quadros II, III, IV e V. Observa-se que para ambos os isolados (8 e 9), houve a formação espontânea de algumas estruturas de captura de nematóides, nas placas controle. Esse fato foi também obser-

vado por SCHENCK & PRAMER (1975). Considerando-se o isolado número 8, comparando-se os quadros II e III, verifica-se que o número de anéis hifais, formados após 24 e 48 horas da adição das larvas do nematóide, é praticamente o mesmo. O mesmo ocorreu para o isolado número 9, quanto à formação dos anéis, porém o número de corpos globosos variou muito para os campos observados.

Os fungos mais conhecidos como formadores de estruturas típicas de captura de nematóides, pertencem a algumas espécies dos gêneros *Arthrobotrys*, *Dactylaria* e *Dactylella* (DRECHSLER, 1937) e *Monacrosporium* (MONOSON et alii, 1974).

QUADRO II. Estruturas de captura formadas pelo isolado n.º 8 (*Pestalotia* sp.) após 24 horas da adição do nematóide *Rotylenchulus reniformis*. Adição efetuada decorridas 48 horas de cultivo do fungo a 28°C.

CAMPOS OBSERVADOS	PLACAS									
	1		2		3		4		Controle	
	A ⁺	B ⁺⁺	A	B	A	B	A	B	A	B
1	1	1	1	1	1	2	—	—	—	—
2	—	1	—	—	1	—	—	1	—	—
3	2	—	—	—	—	2	—	—	—	1
4	1	—	—	1	—	—	—	—	—	1
5	1	—	—	—	—	1	—	1	1	—
6	—	1	1	—	—	—	2	1	—	—
7	—	—	—	1	—	—	—	1	1	1
8	—	2	1	—	—	—	—	1	—	—
9	—	2	2	1	—	1	—	—	—	—
10	1	—	—	2	—	1	—	1	—	—
TOTAL	6	7	5	6	2	7	3	6	1	3

⁺ A — anel simples

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

QUADRO III. Estruturas de captura formadas pelo isolado n.º 8 (*Pestalotia* sp.) após 48 horas da adição do nematóide *Rotylenchulus reniformis*. Adição efetuada decorridas 48 horas de cultivo do fungo a 28°C.

Campos Observados	PLACAS									
	1		2		3		4		Controle	
	A ⁺	B ⁺⁺	A	B	A	B	A	B	A	B
1	—	3	—	—	1	—	—	—	—	—
2	—	4	—	—	2	1	1	—	—	—
3	—	5	2	—	—	1	—	1	—	1
4	—	—	—	—	—	1	—	—	—	1
5	2	—	—	1	—	2	1	—	—	—
6	1	3	—	1	—	1	—	3	—	—
7	2	—	1	1	1	1	—	3	—	—
8	2	—	—	2	1	2	—	—	—	—
9	1	—	—	1	1	3	—	1	—	—
10	—	—	—	2	2	1	—	1	—	2
TOTAL	8	15	3	8	7	13	2	9	—	4

⁺A — anel simples

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

No presente trabalho, apenas o isolado número 8 pôde ser classificado como pertencente ao gênero *Pestalotia*. Este gênero até o presente momento não tem sido descrito como predador de nematóides.

Há outros fungos, que embora não formem estruturas de captura de nematóides, liberam substâncias que possuem propriedades nematicidas. Estudos estão conduzidos para verificar se há liberação dessas substâncias tóxicas pelos isolados obtidos.

Convém salientar que os testes de laboratório devem ser complementados com experimentos de casa de vegetação, para se avaliar a eficiência dos fungos no solo.

QUADRO IV. Estruturas de captura formadas pelo isolado n.º 9 após 24 horas da adição do nematóide *Rotylenchulus reniformis*. Adição efetuada decorridas 48 horas de cultivo do fungo a 28°C.

Campos Observados	PLACAS														
	1			2			3			4			Controle		
	A ⁺	B ⁺⁺	C ⁺⁺⁺	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
1	1	-	1	-	1	15	1	-	1	2	-	3	-	2	1
2	3	3	-	1	2	14	-	-	21	-	-	31	-	-	-
3	1	2	-	-	1	3	-	1	8	3	-	13	-	-	-
4	-	-	4	-	2	1	2	-	1	-	1	4	-	2	-
5	-	1	1	-	2	1	-	-	7	-	3	12	-	1	1
6	2	3	-	1	-	8	1	1	1	2	2	13	-	1	-
7	3	1	-	1	-	1	-	2	3	-	1	24	-	-	2
8	-	1	-	1	-	2	-	-	4	1	-	-	-	-	-
9	2	1	-	1	2	1	2	-	1	4	2	-	-	1	-
10	1	2	-	1	-	-	-	1	1	3	1	-	-	-	-
TOTAL	13	14	6	6	10	46	6	5	46	14	10	100	-	7	4

+A - anel simples

+ + B - anel do tipo apresentado na figura 2

+ + + C - corpos globosos (knobs) do tipo apresentado na figura 3

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

Campos observados	PLACAS															
	1			2			3			4			Controle			
	A ⁺	B ⁺⁺	C ⁺⁺⁺	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	
1	-	2	-	1	5	28	-	-	-	10	3	1	6	-	-	3
2	2	-	3	-	-	35	1	-	-	4	-	4	2	-	1	-
3	1	1	1	-	1	-	-	-	-	3	1	-	-	-	2	1
4	-	2	-	-	-	6	-	1	-	-	2	2	1	-	-	1
5	2	5	-	-	2	5	-	-	1	2	2	2	-	-	-	2
6	-	2	-	-	2	4	-	2	-	-	2	-	-	-	1	2
7	1	1	-	-	3	3	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	1	-	6	-	-	1	1	-	-	1	3	-	-	1	-
9	1	1	-	-	1	-	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-
10	-	2	-	-	2	-	1	-	-	-	3	1	-	-	-	-
TOTAL	7	16	10	1	17	82	4	7	18	12	13	9	-	5	7	

+ A — anel simples

+ + B — anel do tipo apresentado na figura 2

+ + + C — corpos globosos (knobs) do tipo apresentado na figura 3.

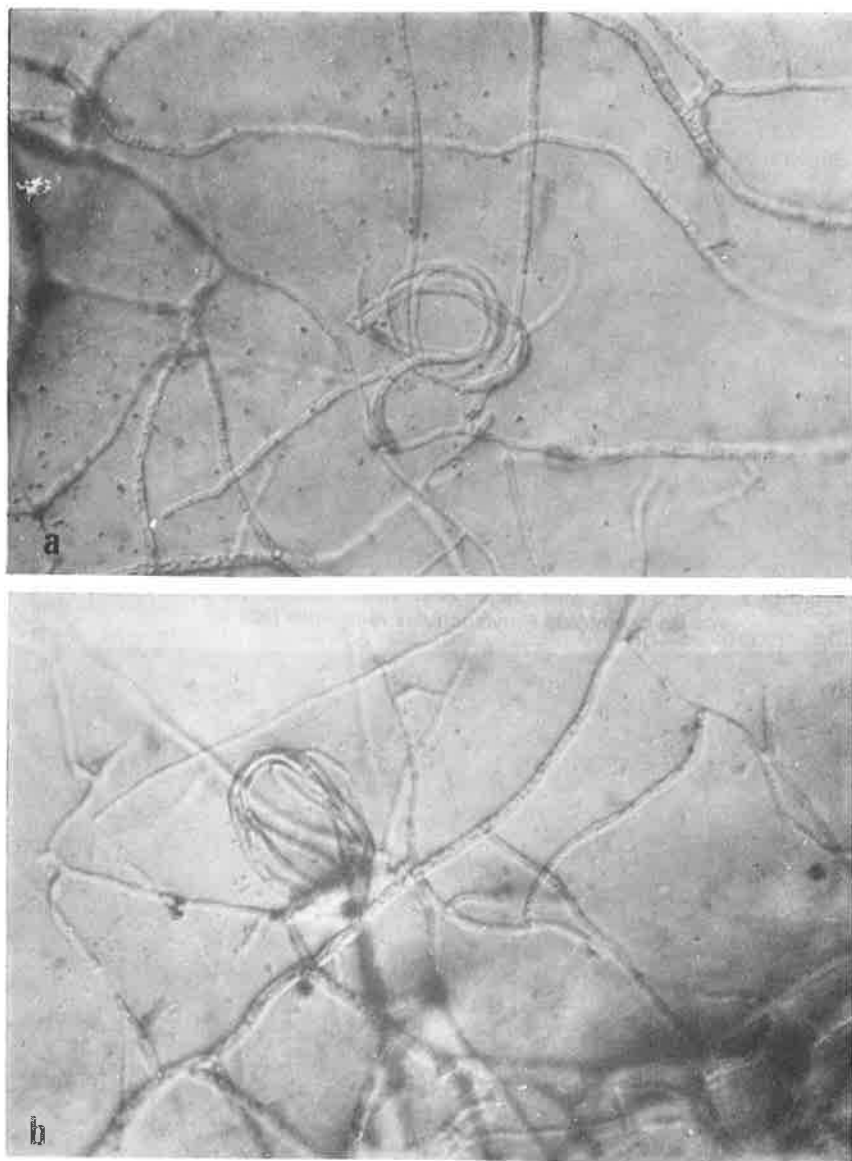


FIGURA 1. Isolado n.º 8 (*Pestalotia* sp.). a) Anéis hifais observados após 24 horas da adição de larvas do nematóide *Rotylenchulus reniformis*. b) Anéis hifais observados após 45 horas da adição das larvas do referido nematóide (320 X).

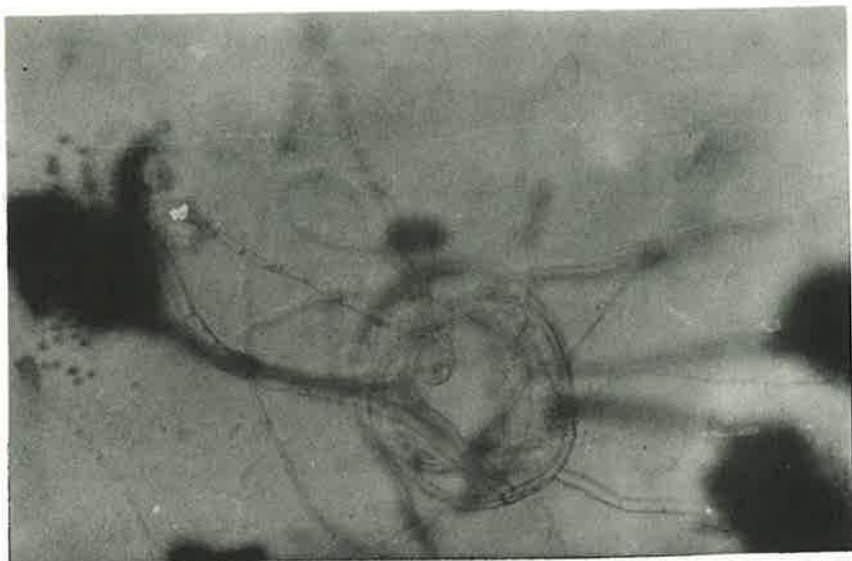


FIGURA 2. Isolado n.º 9. Anéis hifais observados após 24 horas de adição de larvas do nematóide *Rotylenchulus reniformis* (320 X).



FIGURA 3. Isolado n.º 9. Corpos globosos (knobs adhesivos) formados em presença de larvas do nematóide *Rotylenchulus reniformis* (320 X).

RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo o isolamento de fungos a partir de nematóides do gênero *Meloidogyne* e a posterior utilização desses isolados em testes de laboratório para verificar a formação de estruturas especializadas de captura. Os nematóides empregados para o isolamento dos fungos foram: *Meloidogyne javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949 e *M. incognita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1949; para ensaios em laboratório, usou-se *Rotylenchulus reniformis* Linford & Oliveira, 1940.

Pelos resultados obtidos, conclui-se que: a) várias espécies de fungos de diversos gêneros puderam ser isoladas a partir de nematóides, havendo uma predominância de fungos do gênero *Aspergillus*. b) dois isolados (um do gênero *Pestalotia* e um não identificado) dos nove ensaiados, apresentaram estruturas de captura em testes de laboratório, em presença de nematóides. Mesmo na ausência destes, essas estruturas ocorreram, porém, em menor número.

SUMMARY

Isolation of fungi from root-knot nematodes of the genus *Meloidogyne* and utilization of them in laboratory tests to obtain formation of specialized traps were made. The nematodes employed were *Meloidogyne javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949 and *M. incognita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1949; in laboratory tests, *Rotylenchulus reniformis* Linford & Oliveira, 1940 was used.

The following conclusions were drawn: a) various fungi from different genera were isolated from the nematodes; *Aspergillus* was the most frequent genus; b) two isolates (one belonging to the genus *Pestalotia* and one not identified), formed traps in the laboratory tests, in the presence of nematodes. A minor number of traps was found even in the absence of nematodes.

AGRADECIMENTOS

Os autores expressam seus agradecimentos ao Prof. Dr. Luiz Gonzaga E. Lordello, do Dep. de Zoologia da ESALQ, pelo estímulo e orientação no desenvolvimento deste trabalho: à Pesq. Cient. Cybele Pacheco Vaz Pimentel, da Seção de Micologia Fitopatológica do Instituto Biológico, pela confirmação do gênero de alguns fungos; e ao Dr. Cláudio Luiz Messias, do Dep. de Genética e Evolução (UNICAMP), pelas fotografias. Agradecimentos também ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), através do auxílio concedido (Programa Integrado de Genética) e bolsa de estudos a um dos autores (V.S.B.A.)

LITERATURA CITADA

- DRECHSLER, C., 1937. Some Hyphomycetes that prey on free-living terricolous nematodes. *Mycologia* 29:447-552.
- DUDDINGTON, C.L., 1957. *The friendly fungi*, 1.^a ed., London, Faber and Faber, 188p.
- LORDELLO, L.G.E., 1976. *Nematóides das plantas cultivadas*, 3.^a ed., São Paulo, Livraria Nobel S.A., 197p.
- MONOSON, H.L., A.G. GALSKEY & R.S. STEPHANO, 1974. Studies on the ability of various nematodes to induce trap formation in a nematode-trapping fungus, *Monacrosporium doedycoides*. *Nematologica* 20:96-102.
- MONTEIRO, A.R., 1970. *Dorylaimoidea de cafezais paulistas (Nemata, Dorylaimida)*, Piracicaba, ESALQ/USP, 137 p. (tese de doutoramento).
- OOSTENBRINK, M., 1960. Estimating nematode population by some selected methods. In: SASSER, J.N. & R. JENKINS, Coord., *Nematology fundamentals and recent advances with emphasis on plant parasites and soil forms*, Chapell Hill, Univ. North Carol. Press, p.85-102.
- PONTECORVO, G., J.A. ROPER, L.M. HEMMONS, K.D. MacDONALD & A.W. BUFTON, 1953. The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Advances in Genetics* 5:141-238.
- PRAMER, D., 1964. Nematode-trapping fungi. *Science* 144:382-388.
- SCHENCK, S. & D. PRAMER, 1975. The effects of volatile compounds from nematodes on trap formation by a nematode-trapping fungus. *Appl. Microbiol.* 30:496-497.