

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**

Inoculação de fungos entomopatogênicos em plantas de soja visando o manejo dos nematoides *Heterodera glycines* e *Pratylenchus brachyurus*

Vitor Isaías da Silva

Trabalho de conclusão de curso
apresentado como parte dos requisitos
para obtenção do título de Bacharel em
Gestão Ambiental

**Piracicaba
2018**

Vitor Isaías da Silva

Inoculação de fungos entomopatogênicos em plantas de soja visando o manejo dos nematoídeos *Heterodera glycines* e *Pratylenchus brachyurus*

Orientador:

Prof. Dr. ITALO DELALIBERA JUNIOR

Trabalho de conclusão de curso
apresentado como parte dos requisitos
para obtenção do título de Bacharel em
Gestão Ambiental

**Piracicaba
2018**

Agradecimentos

A Deus, por estar realizando este trabalho, concedendo toda a força necessária;

Aos meus pais, pelo apoio e dedicação em todos os momentos da minha vida;

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” por toda a estrutura e oportunidades oferecidas durante todos os anos de graduação;

Ao laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos, por toda infraestrutura oferecida para a realização deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Italo Delalibera Jr. pela orientação e confiança para a execução deste trabalho;

À Dra. Celeste Paola D’Alessandro, pela amizade, apoio e orientações durante praticamente toda minha trajetória no laboratório;

A todos os colegas e companheiros de laboratório, em especial às biólogas Bianca Corrêa, Daniela Milanez Silva e Taisa Pavani por todos os momentos compartilhados;

Ao Laboratório de Nematologia, em especial ao Prof. Dr. Mario Massayuki Inomoto por todos os nematoides e estrutura oferecidos para a realização deste trabalho;

À todos os membros do Grupo de Pesquisa e Extensão em Manejo Integrados de Pragas que me acompanharam e de alguma forma colaboraram com este trabalho;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, que concedeu bolsa de Iniciação Científica que colaborou para realização deste trabalho.

“Você é o buscador e você é o quem você está buscando ”
Osho

Inoculação de fungos entomopatogênicos em plantas de soja visando o manejo dos nematoides *Heterodera glycines* e *Pratylenchus brachyurus*

Vitor I. Silva¹, Celeste P. D'Alessandro¹, Mario M. Inomoto², Italo Delalibera Jr.¹

¹ Departamento de Entomologia e Acarologia, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), Universidade de São Paulo (USP), Avenida Pádua Dias, 11, Piracicaba, São Paulo, CEP 13418-900, Brasil

² Departamento de Fitopatologia e Nematologia, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), Universidade de São Paulo (USP), Avenida Pádua Dias, 11, Piracicaba, São Paulo, CEP 13418-900, Brasil

*E-mail: vitor.isaias.silva@usp.br

Artigo a ser submetido

RESUMO

Fungos entomopatogênicos dos gêneros *Metarhizium*, *Beauveria* e *Isaria* estão sendo comercializados como bioinseticidas, no entanto, não existem relatos do uso deles como agentes de controle biológico de fitonematoides. *Heterodera glycines* (Nematoda: Heteroderidae) e *Pratylenchus brachyurus* (Nematoda: Pratylenchidae) são duas das espécies de fitonematoides que mais causam danos à cultura da soja. Nesse estudo, objetivou-se avaliar o desenvolvimento de *H. glycines* e *P. brachyurus* em plantas de soja previamente inoculadas com suspensões fúngicas de *Metarhizium sp* indeterminada 1 ESALQ-1638, *Beauveria bassiana* ESALQ-3399 e *Isaria fumosorosea* ESALQ-3422 a fim de verificar se os fungos utilizados como inoculantes poderiam proteger as plantas desses parasitos. Como as inoculações dos fungos foram feitas no momento da semeadura das sementes de soja, buscou-se também verificar a persistência dos mesmos nas raízes e no solo em que as plantas se desenvolveram. Testes *in vitro*, onde os nematoides foram colocados em contato direto com os entomopatógenos foram realizados para verificar se os fungos poderiam ser patogênicos às duas espécies de fitonematoides. Os resultados revelaram que as plantas de soja inoculadas com o isolado de *B. bassiana* ESALQ-3399 apresentaram menores populações de *H. glycines* nos dois experimentos e de *P. brachyurus* em apenas um dos três experimentos em comparação com as plantas controle. *B. bassiana* ESALQ-3399 foi recuperado das raízes das plantas de soja por mais de 70 dias, entretanto não foi detectado no substrato. Os testes *in vitro* revelaram que nenhum dos fungos entomopatogênicos conferiu efeito negativos na eclosão de juvenis e na mobilidade dos fitonematoides. Estas observações sugerem que estudos mais detalhados devem ser realizados para garantir uma maior e mais homogênea colonização endofítica do isolado *B. bassiana* ESALQ-3399 nas plantas de soja para confirmar seu potencial como antagonista de *H. glycines* e *P. brachyurus*.

Palavras-chave: entomopatógenos; endofíticos; fitonematoides; controle biológico.

ABSTRACT

Entomopathogenic fungi of the genera *Metarhizium*, *Beauveria* and *Isaria* have been used as bioinsecticide, however, there are no reports of their use as biological control agents against phytonematodes. *Heterodera glycines* (Nematoda: Heteroderidae) and *Pratylenchus brachyurus* (Nematoda: Pratylenchidae) are two of the major nematode species that can cause damages to soybean. In this work, the objective was to evaluate the development of *H. glycines* and *P. brachyurus* in soybean plants previously inoculated with fungal suspensions of *Metarhizium* sp indeterminated 1 ESALQ-1638, *Beauveria bassiana* ESALQ-3399 and *Isaria fumosorosea* ESALQ-3422 to verify if those fungi used as inoculants could protect the plants from these parasites. The fungi inoculation were carried out during the soybean seeding and the persistence of the fungi in the roots and soil was verified. Experiments *in vitro* were done to check if the entomopathogenic fungi were pathogenic to both nematode species. The results showed that the soybean plants inoculated with the isolate of *B. bassiana* ESALQ-3399 showed smaller populations of *H. glycines* in both experiments and of *P. brachyurus* in only one of three experiments compared to the control plants. *B. bassiana* ESALQ-3399 was recovered from the soybean roots for more than 70 days, however, it was not recovered from the soil. The *in vitro* experiments revealed that none entomopathogenic fungi caused negative effects for the egg hatch and mobility of juvenile nematodes from both species. These observations suggest that more detailed studies should be carried out to ensure a greater and more homogeneous endophytic colonization of the *B. bassiana* ESALQ-3399 isolate in soybean plants to confirm its potential as an antagonist of *H. glycines* and *P. brachyurus*.

Key words: entomopathogens, endophytes; phytonematodes; biological control.

INTRODUÇÃO

A cultura da soja (*Glycine max* L. Merr) é a *commodity* mais importante do agronegócio brasileiro, ocupando cerca de 50% da área cultivada com grãos no país e está presente na maior parte dos estados (Cepea 2017). A safra 2017/18 resultou na produção de aproximadamente 120 milhões de toneladas de soja, que foram cultivadas em aproximadamente 35 milhões de hectares (Conab 2018). Esses resultados foram importantes para manter o Brasil como o segundo maior produtor e o maior exportador de soja no mundo. Por se tratar de uma espécie exótica e cultivada em grande escala, a soja está exposta a um grande grupo de pragas capazes de desfolhar, sugar, transmitir doenças e até mesmo parasitar as plantas de soja originando uma perda significativa na produção de cada safra.

Dentre os principais desafios para o cultivo da soja, destacam-se os ataques dos fitonematoídes que são endo ou ectoparasitos de plantas (Pinheiro, 2012). Grande parte dos fitonematoídes encontram-se presentes no solo na forma de ovos ou cistos, migrando para as plantas em seus primeiros estágios vegetativos na forma móvel (juvenis) e completando o ciclo de desenvolvimento nas raízes das plantas hospedeiras. Os fitonematoídes apresentam uma estrutura denominada estilete que é utilizada para a alimentação deles, assim os nematoides inserem o estilete nas células radiculares para remover o conteúdo celular ocasionado danos na estrutura das raízes e na nutrição das plantas (Pinheiro, 2012). Atualmente, *Heterodera glycines* e *Pratylenchus brachyurus* (Nematoda) representam duas das espécies de fitonematoídes mais agressivas à soja no Brasil (Asmus & Inomoto, 2007), por possuírem ciclos de vida relativamente curtos podem aumentar suas populações exponencialmente em pouco tempo.

O nematoide-do-cisto-da-soja, *H. glycines* Inchinohe, 1952 (Nematoda: Heteroderidae) é uma espécie que possui grande afinidade por hospedeiros vegetais da família Fabaceae, e pode estar presente em regiões mais secas com solo mais arenoso (Koenning & Barker, 1995). Portanto, esta espécie de nematoide representa um grande problema para a produção de soja brasileira, cuja maior parte se concentra na região centro-oeste do país, onde há condições climáticas e físicas ideais para o desenvolvimento destes indivíduos. Uma característica importante de *H. glycines* é a produção de cistos para sobrevivência em ambientes extremos. Um cisto é o corpo de uma fêmea de *H. glycines* que passou por transformações físicas e químicas após sua morte, adquirindo uma coloração mais escura (marrom) e uma estrutura mais rígida

(Niblack, 2005). Um cisto pode armazenar centenas de ovos que podem ficar viáveis por vários anos (Sipes et al., 1992). Em solos com nível de infestação muito alto, esse nematoide pode causar perdas próximas a 100%, ou seja, pode comprometer uma safra inteira, em alguns casos (Mendes et al., 1992).

O nematoide-das-lesões-radiculares, *P. brachyurus* (Godfrey, 1929) Filipjev & Schuurmans Stekhoven, 1941 (Nematoda: Pratylenchidae) pode causar significativos danos a diferentes culturas. Essa espécie há algum tempo já havia sido reportada em solos brasileiros, mas foi apenas na safra 2001/02, quando causou significativas perdas nas lavouras do cerrado passou a ser vista como uma verdadeira inimiga para a agricultura brasileira (Silva & Pereira, 2003). As grandes infestações de *P. brachyurus* ocorrem, geralmente, em solos onde há cultivo intensivo sem a rotação de culturas. Neste ambiente favorável, os indivíduos de *P. brachyurus* podem causar perdas que giram em torno de 30% da safra total (Goulart, 2008).

Ambas as espécies de fitonematoídes descritas possuem fases de seus ciclos de vida nas raízes de plantas hospedeiras (juvenis e adultos) e no solo (ovos). Desta maneira, se o nematoide for controlado ainda no solo, consegue-se evitar sua migração para as raízes e consequentemente evitam-se os danos causados nas plantações. O controle químico constitui o principal método de controle de nematoídes (Nunes et al., 2010). No entanto sua alta toxicidade, custo e questões de resistência acabam tornando este método não tão viável para o ambiente e para o produtor.

O controle biológico surge como um importante pilar do Manejo Integrado de Pragas (MIP), podendo auxiliar na redução de intensivas aplicações de defensivos agrícolas. Protozoários, fungos e bactérias são alguns dos inimigos naturais de fitonematoídes, no entanto a maioria dos estudos nesta área volta-se para o controle biológico promovido pelos fungos nematófagos (Carneiro, 1992). Estudos demonstraram que os fungos *Purpureocillium lilacinus* (antigamente denominado *Paecilomyces lilacinus*) e *Pochonia chlamydosporia* possuem potencial para o controle dos fitonematoídes, em especial do gênero *Meloidogyne* (Freire & Bridge, 1985; Coutinho et al., 2009). De acordo com Carneiro (1992) dentre os fungos que podem controlar populações de fitonematoídes, os que mais se destacam são aqueles que podem persistir no solo por mais tempo e causar maior virulência aos ovos, impedindo a eclosão dos juvenis e consequentemente sua migração às raízes das plantas.

Estudos recentes têm demonstrado que os fungos entomopatogênicos dos gêneros *Metarhizium*, *Beauveria* e *Isaria* (Ascomycetes: Hypocreales) persistem no solo dos agroecossistemas (Meyling & Eilenberg, 2006 e 2007), apresentam uma associação com a rizosfera das plantas e em alguns casos podem colonizar o interior das plantas, sendo considerados como microrganismos endofíticos (Vega, 2008). As relações dos fungos entomopatogênicos com o solo e as plantas podem gerar uma série de benefícios, tais como, promoção de crescimento das plantas (Vega, 2008; Sasan & Bidochka, 2012), aquisição de nutrientes (Behie et al., 2012; Behie & Bidochka, 2014), proteção contra fitopatogênicos (Sasan & Bidochka, 2013), herbivoria (Parsa et al., 2013) e estresses abióticos (Khan et al., 2012).

Estudos prévios conduzidos no laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos, ESALQ-USP, demonstraram que os isolados *Metarhizium* sp Indeterminada 1 (ESALQ-1638), *Beauveria bassiana* (ESALQ-3399) e *Isaria fumosorosea* (ESALQ-3422) tem uma associação com as plantas de soja e persistem no solo por até 60 dias (Bolsa PIBIC 2016/17 da aluna Beatriz Cecato Dumalakas). A associação desses isolados fúngicos com as plantas de soja afetou negativamente o desenvolvimento das lagartas desfolhadoras *Chrysodeixis includens* e *Helicoverpa armigera* e a mosca-branca, *Bemisia tabaci* (dissertação de mestrado do aluno Fernando Belezini Vinha, 2018). Para dar continuidade nos estudos sobre os efeitos nas plantas inoculadas com os fungos entomopatogênicos se propõe como objetivo de trabalho avaliar os efeitos da associação fungos descritos acima com as planta de soja sobre a população e dinâmica de fitonematóides, *H. glycines* e *P. brachyurus*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Obtenção do material fúngico

Os isolados fúngicos de *Metarhizium sp* indeterminada 1 (ESALQ-1638), *B. bassiana* (ESALQ-3399) e *I. fumosorosea* (ESALQ-3422) foram obtidos da Coleção de entomopatógenos “Prof. Sérgio Batista Alves” do Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos da ESALQ-USP, Piracicaba. O isolado de *B. bassiana* foi cultivado em placas de Petri contendo meio de cultura completo- MC (Alves et al., 1998), já os isolados de *Metarhizium sp* indet 1 e *I. fumosorosea* foram multiplicados sobre meio de cultura Batata Dextrose ágar – BDA DifcoTM. Todas as placas foram incubadas simultaneamente em câmaras tipo B.O.D a $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e 12 horas de fotofase durante 10 dias. Após este período, as placas que apresentaram esporulação foram utilizadas para a preparação de suspensões fúngicas a partir da raspagem das estruturas reprodutivas dos fungos (conídios) com espalhante Tween 80 (0,01%). Posteriormente, foram preparadas diluições seriadas para determinar a quantidade de conídios com auxílio de uma câmara de Neubauer em um microscópio de luz e, assim, ajustar a concentração para 1×10^8 conídios/mL.

Determinação da viabilidade do material fúngico

Para confirmar a viabilidade dos fungos utilizados nos experimentos foi avaliada a porcentagem de germinação dos conídios de acordo com a metodologia de Oliveira et al., (2015). Para isso foram utilizadas placas de Petri tipo RodacTM contendo 4 mL de meio de cultura BDA mais o fungicida DerosalTM 500 SC (10 microlitros/L) (princípio ativo Carbendazim, Bayer CropScience, SP, Brasil) e incubadas com suspensões de 1×10^6 conídios/mL de cada espécie fúngica. Posteriormente, as placas foram mantidas em câmara tipo B.O.D por 22h a 26°C e 12h de fotofase. O número de conídios germinados e não germinados foi quantificado em microscópio ótico com objetiva de 400X, estimando-se a porcentagem de conídios germinados. Em todos os experimentos utilizou suspensões de conídios com porcentagem de viabilidade superior a 90%.

Obtenção dos fitonematoides *Heterodera glycines* e *Pratylenchus brachyurus*

Os fitonematoides das espécies *H. glycines* e *P. brachyurus* foram mantidos e multiplicados em casa de vegetação sobre cultivares suscetíveis, no laboratório de Nematologia sob a coordenação do Prof. Mario Massayuki Inomoto do departamento de Fitopatologia e Nematologia (LFN) da ESALQ-USP. Os inóculos foram preparados através da extração dos nematoides (ovos e/ou juvenis), das plantas hospedeiras que ficaram na casa de vegetação, conforme a metodologia de Coolen e D'Herde (1972). Após a extração dos nematoides, foi quantificado o número de nematoides por mL com auxílio de uma lâmina de Peters e um microscópio óptico.

Ação de fungos entomopatogênicos sobre o desenvolvimento de *Heterodera glycines* em plantas de soja

Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação em duas épocas do ano, sendo o primeiro realizado no período de 04 de junho a 30 de julho de 2018, neste experimento a inoculação dos fungos entomopatogênicos e a semeadura ocorreram no dia 04 de junho de 2018, no entanto a inoculação dos ovos de *H. glycines* ocorreu no dia 18 de junho de 2018, quando as plantas atingiram o estágio vegetativo desejado. No segundo experimento que ocorreu entre 30 de agosto a 22 de outubro de 2018, a inoculação dos fungos e a semeadura das sementes marcaram o dia inicial do experimento (30 de agosto de 2018), mas a inoculação dos nematoides ocorreu apenas no dia 10 de setembro de 2018.

Sementes de soja da variedade BRS 284 (EMBRAPA) foram semeadas em vasos plásticos de coloração preta, com aproximadamente 1000 gramas de uma mistura de areia e solo (3:1) estéril adquirida do Laboratório de Nematologia, sendo este um solo mais arenoso para o melhor desenvolvimento dos indivíduos de *H. glycines* inoculados.

A inoculação dos fungos entomopatogênicos foi realizada através da aplicação direta de 8 mL da suspensão de 1×10^8 conídios/mL sobre a superfície do solo no momento da semeadura de acordo com metodologia de Parsa et al. (2013). As plantas controle foram inoculadas com 8 mL do espalhante Tween 80 (0,01%) utilizado para a preparação dos fungos.

A infestação de nematoides ocorreu quando as plantas de soja atingiram o estágio vegetativo V1, com apenas um par de folhas unifolioladas, o que aconteceu por volta de 7 a 10 dias após a semeadura. Os inóculos de *H. glycines* foram disponibilizados pelo Laboratório de Nematologia, contendo preferentemente ovos. No experimento 1 foram inoculados 1828 ovos + 36 juvenis por planta e no experimento 2 foram inoculados 890 ovos + 240 juvenis. A suspensão contendo os ovos de *H. glycines* foi inoculada em um orifício de 2 cm de diâmetro aberto no solo e próximo as raízes das plantas. Após a inoculação o orifício foi fechado com vermiculita.

Os tratamentos foram:

- 1- Tween 80 (0,01%) + *H. glycines* (Controle)
- 2- *Metarhizium sp* indeterminada 1 ESALQ-1638 + *H. glycines*
- 3- *B. bassiana* ESALQ-3399 + *H. glycines*
- 4- *I. fumosorosea* ESALQ-3422 + *H. glycines*

Para cada tratamento foram inoculadas 20 plantas, as quais foram mantidas em casa de vegetação pelo período de 60 dias após a semeadura, respeitando o ciclo de vida de *H. glycines* que é no mínimo 22 dias (Niblack, 2005). As unidades experimentais foram dispostas em dez blocos casualizados, sendo que em cada bloco possuía duas repetições de cada um dos tratamentos;

Após aproximadamente 45 dias da inoculação dos nematoides nas plantas, foi realizada a extração dos cistos de *H. glycines* presentes nas raízes e no solo. O processo de extração dos cistos de *H. glycines* das raízes de soja foi realizado a partir da lavagem externa das raízes a fim da obtenção dos cistos formados e aderidos nesta parte da raiz. Neste processo, as raízes de cada uma das unidades experimentais foram separadas do solo e lavadas manualmente em água corrente para remover os cistos. O material da extração foi colocado em peneiras de 20 e 100 mesh, respectivamente, e o material retido foi recolhido com água e reservado num pequeno frasco de vidro. Os frascos foram mantidos em banho-maria a 60°C com o propósito de estabilizar os nematoides e, posteriormente, adicionou-se 200µL de formol a fim de conservar os cistos para as respectivas contagens. Os cistos presentes no solo foram extraídos do volume total da mistura de solo (aproximadamente 1000 gramas) de cada um dos respectivos vasos. O solo foi diluído em um balde plástico com 4 litros de água e, posteriormente, foi colocado em peneiras de 20 e 60 mesh para reter os cistos. O material retido na peneira de 60

mesh foi recolhido com a adição de água, devidamente reservados em frascos de vidro e, consequentemente estabilizados em banho-maria a 60°C e 200µL de formol para as respectivas contagens.

Para a contabilização dos cistos de *H. glycines* presentes no solo e nas raízes das plantas de soja, foram contados o número de cistos presentes em 3 mL de cada uma das suspensões preparadas na etapa anterior. As contagens foram feitas com o auxilio de uma placa de Petri (90 mm) que foi quadriculada manualmente (20 mm X 20 mm) e uma lupa óptica. O volume total de cada frasco foi medido e arquivado antes do inicio das contagem para auxiliar nos cálculos realizados posteriormente. Multiplicando a média obtida nas contagens com o volume total do frasco obtém-se a quantidade total de nematoides presentes na respectiva raiz e solo.

Ação de fungos entomopatogênicos sobre o desenvolvimento de *Pratylenchus brachyurus* em plantas de soja

Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação em três épocas do ano, sendo o primeiro experimento realizado no período de 22 de fevereiro a 14 de maio de 2018, o dia 22 de fevereiro de 2018 marca o inicio do experimento, ou seja, o dia em que as sementes de soja foram semeadas e os fungos entomopatogênicos inoculados sobre elas, mas a contagem do ciclo de vida dos indivíduos de *P. brachyurus* iniciou a partir da sua data de inoculação que foi em 07 de março de 2018. No segundo experimento que aconteceu entre 18 de abril e 05 de julho de 2018, os nematoides foram inoculados no dia 2 de maio de 2018. O terceiro experimento que foi de 30 de agosto a 14 de novembro de 2018, a inoculação de *P. brachyurus* ocorreu no dia 18 de setembro.

Nestes experimentos, as sementes de soja da variedade BRS 284 (EMBRAPA) foram semeadas em copos plásticos transparentes (500 mL) com aproximadamente 800 gramas de uma mistura feita com solo estéril e areia (granulometria média) na proporção de 3:2. Cada copo do experimento representou uma unidade experimental, havendo apenas uma única planta de soja por copo. No terceiro experimento, a metodologia foi ajustada visando melhores condições sanitárias para as plantas, já que nos experimentos anteriores verificou-se que os vasos eram pequenos para as mesmas. Nesse experimento as sementes foram colocadas em vasos plásticos de coloração preta, com

aproximadamente 1000 gramas de uma mistura de solo e areia de acordo com a metodologia para *H. glycines*.

As inoculações dos fungos entomopatogênicos foram realizadas através da aplicação direta de 5 mL de uma suspensão de 1×10^8 conídios/mL sobre a superfície da mistura do solo com o auxilio de uma pipeta volumétrica, logo após a semeadura das sementes, de acordo com metodologia de Parsa et al., (2013). As plantas controle foram inoculadas com 5 mL do espalhante Tween 80 (0,01%) utilizado para a preparação dos fungos. No terceiro experimento foram utilizados 8 mL da suspensão de conídios e do Tween 80 (0,01%) devido a maior quantidade da mistura de solo e areia.

Quando as plantas atingiram o estágio vegetativo V1 (aproximadamente 10 dias pós-semeadura) foram realizadas as inoculações de juvenis de *P. brachyurus* em cada planta. No primeiro experimento foram inoculados 1105 juvenis/planta, no segundo 996 juvenis/planta e no terceiro 893 juvenis/planta. As suspensões contendo os nematoides foram inoculadas em orifício/s de 2 cm de diâmetro aberto no solo e próximo as raízes das plantas e, posteriormente, esses orifício/os foram fechados com vermiculita.

Os tratamentos foram:

- 1- Tween 80 (0,01%) + *P. brachyurus* (Controle)
- 2- *Metarhizium* sp indeterminada 1 ESALQ-1638 + *P. brachyurus*
- 3- *B. bassiana* ESALQ-3399 + *P. brachyurus*
- 4- *I. fumosorosea* ESALQ-3422 + *P. brachyurus*

Para cada tratamento foram inoculadas 20 plantas, totalizando 80 plantas. Todas as plantas foram mantidas em casa de vegetação pelo período de 80 dias após a semeadura, respeitando o ciclo de vida de *P. brachyurus* que é de aproximadamente 60 dias, de acordo com a metodologia utilizada por Alves et al., (2011). As unidades experimentais foram dispostas em dez blocos casualizados, sendo que em cada bloco possuía duas repetições de cada um dos tratamentos;

Após aproximadamente 60 dias da inoculação dos nematoides, foram extraídos os juvenis de *P. brachyurus* seguindo a metodologia de Coolen & D'Herde (1972). Neste processo, cada planta foi retirada dos vasos e as raízes lavadas e separadas da parte aérea. Posteriormente, as raízes foram processadas num liquidificador com a adição de 100 mL de água, gerando assim uma suspensão aquosa com material vegetal e os

nematoides. Após o processamento das raízes, foi adicionada uma pequena quantidade de caulin nas suspensões obtidas, e as mesmas foram transferidas para os tubos de uma centrífuga onde foram centrifugadas individualmente por cinco minutos, para que o caulin pudesse reter todos os possíveis nematoides presentes nas suspensões. Após a centrifugação de cada amostra, reservou-se o caulin sedimentado no fundo dos tubos e adicionou-se 100mL de uma solução açucarada (Sacarose 60%). Posteriormente, a suspensão foi centrifugada novamente por um minuto e o líquido resultante passou por uma peneira de 500 mesh para reter apenas os nematoides. O material retido foi reservado em pequenos frascos de vidro, onde foram identificados de acordo com seu tratamento e número de repetição.

A quantificação do número de ovos e juvenis de *P. brachyurus* foi realizada com o auxilio de uma lâmina de Peters e um microscópio óptico num aumento de 400X. A lâmina de Peters é uma placa acrílica (70 mm X 35 mm) que possui marcas delimitadas por seis colunas e quatro linhas, formando assim 24 pequenos quadrados que auxiliam na contagem do número de nematoides presentes nas soluções preparadas anteriormente. A quantificação foi realizada por triplicata em lâmina de Peters, ou seja, foram utilizados 3 mL de cada suspensão para obter a média de ovos e juvenis/mL. O volume total de cada frasco foi medido para determinar a quantidade total de nematoides presentes na respectiva raiz.

Determinação da presença dos fungos entomopatogênicos em plantas de soja e no solo

As plantas de soja inoculadas com os fungos entomopatogênicos e os nematoides foram utilizadas para a determinação da presença dos entomopatógenos nas raízes e na mistura de solo e areia.

Para cada tratamento, foram utilizadas de 5 a 10 plantas, as quais foram removidas dos vasos e lavadas com água para retirada do excesso de solo. Posteriormente, as raízes de cada planta foram cortadas em pequenos fragmentos de aproximadamente 2 cm de comprimento. Os fragmentos foram esterilizados superficialmente de acordo com a metodologia de Lohse et al., (2015), onde os tecidos vegetais foram lavados com álcool (70%) por dois minutos, hipoclorito de sódio (0,01%)

por três minutos, álcool (70%) por dois minutos e três lavagens sucessivas de água destilada estéril. Após a esterilização, os fragmentos vegetais foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura seletivo descrito por Behie et al., (2015) constituído por meio BDA (Difco™, USA) mais 0,5 g/L de Ciclohexamida, 0,2 g/L de Cloranfenicol, 0,5 g/L de Dodine (65%) e 0,01 g/L de Cristal Violeta. Todas as placas contendo o material vegetal foram incubadas em câmara climatizada tipo B.O.D a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ e 12 horas de fotofase por 15 dias. A frequência de colonização dos fungos entomopatogênicos foi estimada como o número de fragmentos colonizados em relação com o número total de fragmentos por planta e expressada em percentagens.

Para avaliar a presença dos fungos entomopatogênicos na mistura de solo e areia, coletou-se 1 grama da mistura de cada vaso e homogeneizou-se em 10 mL de água estéril com Tween 80 a 0,01% (suspenção original). Posteriormente, foram realizadas diluições seriadas a partir da solução original até 10^{-3} , e todas as diluições foram transferidas para placas de Petri contendo o meio seletivo descrito por Behie et al., (2015). Cada placa de Petri foi dividida em quatro quadrantes, onde se inoculou 20 μL de cada diluição do solo (Original, $10^{-1}, 10^{-2}$ e 10^{-3}). As placas foram mantidas em câmara climatizada tipo B.O.D a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ e 12 horas de fotofase durante 7 dias. A determinação da presença dos fungos entomopatogênicos no solo foi feita a partir da contagem de Unidades de Formação de Colônia (UFC) em cada diluição e posterior ajuste de UFC/gramas de solo.

A presença dos fungos entomopatogênicos foi avaliada nas plantas dos dois experimentos com *H. glycines* como assim também no segundo e terceiro experimento com *P. brachyurus*.

Ação direta de fungos entomopatogênicos sobre *Heterodera glycines* e *Pratylenchus brachyurus* (*In vitro*)

Para avaliar a existência de uma ação direta dos fungos entomopatogênicos sobre os ovos e juvenis de *H. glycines* e *P. brachyurus* foram realizados ensaios *in vitro*. Para isso, os nematoídes foram misturados com duas concentrações (1×10^5 e 1×10^7 conídios/mL) dos isolados fúngicos *Metarhizium sp* indeterminada 1 (ESALQ-1638), *B. bassiana* (ESALQ-3399) e *I. fumosorosea* (ESALQ-3422). As suspensões fúngicas foram

preparadas a partir da raspagem de conídios em meio de cultivo e ajustadas nas concentrações 1×10^5 e 1×10^7 conídios/mL em câmara de Neubauer, como descrito anteriormente. Para o experimento realizado com a espécie *H. glycines*, foi utilizada um inóculo contendo aproximadamente 200 ovos e alguns juvenis recém-eclodidos/mL. O experimento com *P. brachyurus* foi utilizado um inóculo contendo aproximadamente 50 juvenis/mL. Desta maneira para ambas as espécies de nematoides, os tratamentos foram:

- 1) Nematode + Tween 80 0,01% (Controle)
- 2) Nematode + *Metarhizium* sp indet 1 ESALQ-1638 (1×10^5 conídios/mL)
- 3) Nematode + *Metarhizium* sp indet 1 ESALQ-1638 (1×10^7 conídios/mL)
- 4) Nematode + *Beauveria bassiana* ESALQ-3399 (1×10^5 conídios/mL)
- 5) Nematode + *Beauveria bassiana* ESALQ-3399 (1×10^7 conídios/mL)
- 6) Nematode + *Isaria fumosorosea* ESALQ-3422 (1×10^5 conídios/mL)
- 7) Nematode + *Isaria fumosorosea* ESALQ-3422 (1×10^7 conídios/mL)

Todos os tratamentos foram realizados com a mistura de 1 mL do inoculo de nematoide (*H. glycines* ou *P. brachyurus*) e 1 mL das suspensões de conídios ou Tween 80 0,01% por repetição, sendo realizada 5 repetições por tratamento. Os experimentos foram instalados em placas de titulação (ELISA) com 24 poços, sendo utilizados apenas os 7 poços de cada placa e 5 placas para cada espécie de nematoides. Uma vez instalados os experimentos, foi realizada a avaliação inicial, para se conhecer a quantidade de ovos e juvenis presentes em cada unidade experimental (poço). Logo após avaliação inicial, as placas de ELISA foram cobertas por papel laminado e incubadas no escuro em B.O.D a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ e avaliadas consecutivamente a cada 24 horas durante 5 dias. As avaliações dos nematoides foram realizadas com o auxilio de uma lupa óptica, onde foram avaliados o número de ovos, juvenis moveis e juvenis paralisados (ou imoveis). Foram considerados imóveis, os juvenis que não apresentavam movimento após o contato de uma alça metálica de ponta fina. A partir dos dados, foi estimada a porcentagem de eclosão e de imobilização de juvenis de *H. glycines* e apenas a porcentagem de imobilização de juvenis de *P. brachyurus*.

Análise estatística dos dados

As análises estatísticas do número de cistos de *H. glycines* no solo e raízes das plantas, como assim também, os dados de ovos e juvenis de *P. brachyurus*, foram realizadas através da análises da variância (ANOVA) e pela comparação das médias dos tratamentos por teste de Tukey a 5% de probabilidade ($p<0.05$). Os dados obtidos nos experimentos de ação direta de fungos entomopatogênicos sobre os nematoides estão sendo analisados junto com a profa. Dra. Clarice Demetrio e o aluno Eduardo Elias Ribeiro Junior do departamento de Ciências Exatas, ESALQ-USP, portanto, serão apresentados só através de análises descritivas.

RESULTADOS

Ação dos fungos entomopatogênicos inoculados nas plantas de soja sobre o desenvolvimento de *Heterodera glycines*

No primeiro experimento conduzido com *H. glycines* foi observado que a quantidade de cistos encontrados nas raízes foi significativamente diferente entre os tratamentos ($F=2,323$ $p=0,042$) (Figura 1). As plantas inoculadas com o fungo entomopatogênico *B. bassiana* ESALQ-3399 apresentaram uma quantidade de cistos aderidos nas raízes que se diferenciou estatisticamente apenas das plantas controle (Figura 1), onde a média de cistos foi de 19,57 cistos por planta e no tratamento com *B. bassiana* ESALQ-3399 foi de 2,67 cistos por planta. As plantas inoculadas com *Metarhizium* sp indet 1 ESALQ-1638 e *I. fumosorosea* ESALQ-3422 apresentaram número de cistos nas raízes de 12,29 e 10,43 cistos por planta, respectivamente, mas não diferiram estatisticamente do controle. No solo, foi observado que a quantidade de cistos foi similar entre os tratamentos ($F=0,069$ $p=0,976$) com aproximadamente 20 cistos por vaso. O número total de cistos encontrados na raiz e no solo não apresentou diferenças estatísticas entre os tratamentos ($F=0,914$ $p=0,444$), obtendo valores que variaram de 22,67 cistos no tratamento com *B. bassiana* ESALQ-3399 a 42,90 cistos no tratamento controle (Figura 1).

Os resultados obtidos no segundo experimento com *H. glycines* foram similares ao experimento anterior, porém o número de cistos obtidos foi superior. A quantidade de cistos aderidos nas raízes foi significativamente diferente entre os tratamentos ($F=7,880$ $p=0,001$) (Figura 2). As plantas inoculadas com *B. bassiana* ESALQ-3399 apresentaram uma quantidade significativamente menor de cistos nas raízes (18,33 cistos por planta) em comparação com os demais tratamentos, contabilizando-se 53,33 cistos por planta no controle, 51,85 cistos por planta no tratamento com *Metarhizium* sp indet 1 ESALQ-1638 e 50,00 cistos por planta no tratamento *I. fumosorosea* ESALQ-3422. Em relação aos cistos encontrados no solo, novamente nenhuma diferença estatística foi observada entre os tratamentos ($F=1,897$ $p=0,148$). O número total de cistos encontrados na raiz e no solo apresentou diferenças estatísticas entre os tratamentos ($F=7,331$ $p=0,001$), obtendo valores que variaram de 33,33 cistos no tratamento com *B. bassiana* ESALQ-3399 a 86,67 cistos no tratamento controle (Figura 2).

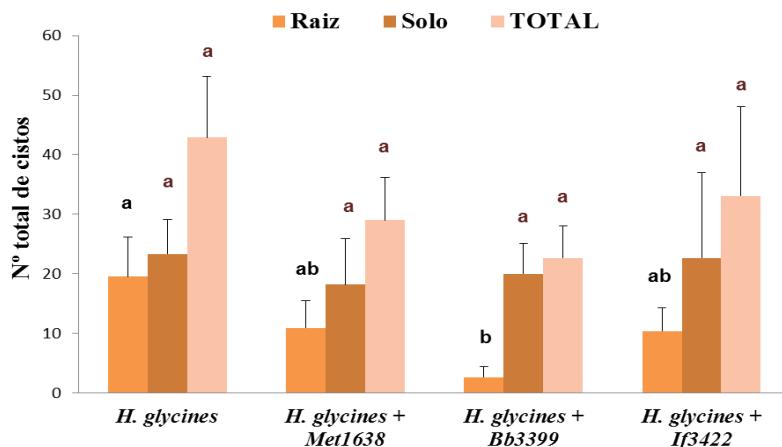


Figura 1. Número total de cistos de *Heterodera glycines* encontrados em plantas de soja inoculadas com os fungos entomopatogênicos *Metarhizium* sp. indeterminada 1 ESALQ-1638 (Met1638), *Beauveria bassiana* ESALQ-3399 (Bb3399) e *Isaria fumosorosea* ESALQ-3422 (If3422). Experimento conduzido no período de 04 de junho a 30 de julho de 2018. Letras diferentes nas colunas representam diferenças estatísticas pelo analises da variância (ANOVA) e pelo Teste de Tukey ($p < 0.05$).

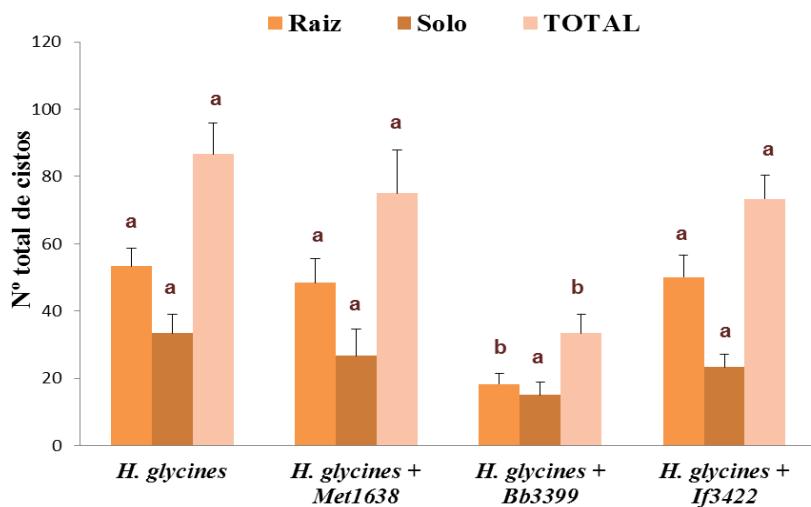


Figura 2. Número total de cistos de *Heterodera glycines* encontrados em plantas de soja inoculadas com os fungos entomopatogênicos *Metarhizium* sp. indeterminada 1 ESALQ-1638 (Met1638), *Beauveria bassiana* ESALQ-3399 (Bb3399) e *Isaria fumosorosea* ESALQ-3422 (If3422). Experimento conduzido no período de 30 de agosto a 24 de outubro de 2018. Letras diferentes nas colunas representam diferenças estatísticas entre os tratamentos pelo Teste de Tukey ($p < 0.05$).

Ação dos fungos entomopatogênicos inoculados nas plantas de soja sobre o desenvolvimento de *Pratylenchus brachyurus*

No primeiro experimento conduzido com *P. brachyurus* foi observado que o número total de indivíduos (ovos + juvenis) no interior das raízes foi significativamente diferente entre os tratamentos ($F= 6,063$ $p=0,002$) (Figura 3). As plantas controle (sem a inoculação de fungo) apresentaram um número total de *P. brachyurus* superior (1339,20 indivíduos por planta) ao tratamento com *B. bassiana* ESALQ-3399 (463,20 indivíduos por planta). As plantas inoculação com *Metarhizium* sp. indeterminada 1 ESALQ-1638 e *fumosorosea* ESALQ-3422, apresentaram valores médios de 981 e 734,40 indivíduos por planta, respectivamente, mas não diferiram dos outros tratamentos (Figura 3).

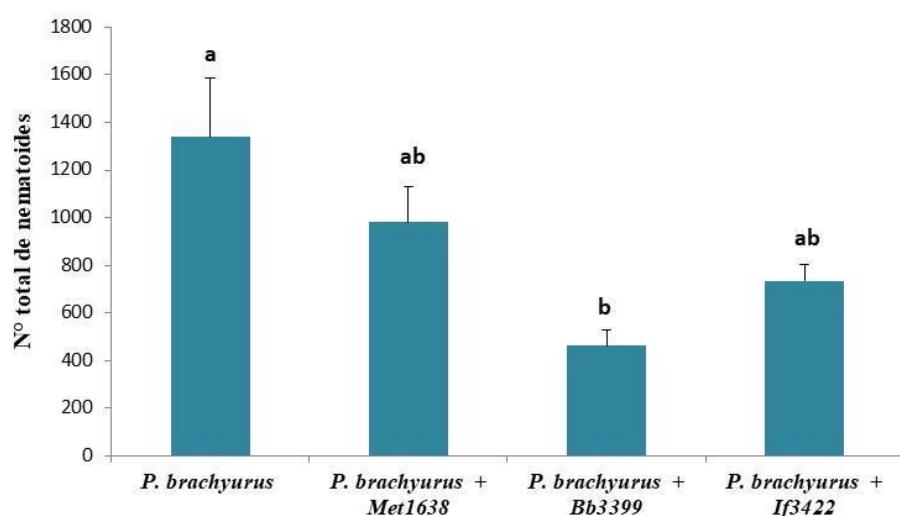


Figura 3. Número total de ovos e juvenis de *Pratylenchus brachyurus* encontrados em plantas de soja inoculadas com os fungos entomopatogênicos *Metarhizium* sp. indeterminada 1 ESALQ-1638 (Met1638), *Beauveria bassiana* ESALQ-3399 (Bb3399) e *Isaria fumosorosea* ESALQ-3422 (If3422). Experimento conduzido no período de 22 de fevereiro a 14 de maio de 2018. Letras diferentes nas colunas representam diferenças estatísticas pelo Teste de Tukey ($p <0.05$).

No entanto os resultados obtidos no segundo experimento não apresentaram diferenças estatísticas entre os tratamentos ($F=1,670$ $p=0,191$) (Figura 4). Nas plantas inoculadas com *Metarhizium* sp. indeterminada 1 ESALQ-1638 foram obtidos 745,34 ovos + juvenis de *P. brachyurus* por planta seguido das plantas com *I. fumosorosea* ESALQ-

3422 (954,67 por planta), *B. bassiana* ESALQ-3399 (1090,40 por planta) e as plantas controle (1118,24 por planta).

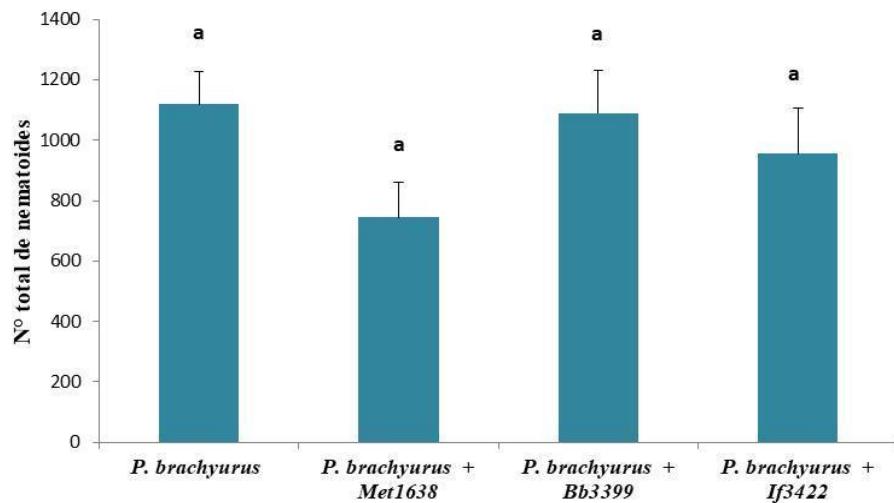


Figura 4. Número total de ovos e juvenis de *Pratylenchus brachyurus* encontrados em plantas de soja inoculadas com os fungos entomopatogênicos *Metarhizium* sp. indeterminada 1 ESALQ-1638 (Met1638), *Beauveria bassiana* ESALQ-3399 (Bb3399) e *Isaria fumosorosea* ESALQ-3422 (If3422). Experimento conduzido no período de 18 de abril a 05 de julho de 2018. Letras diferentes nas colunas representam diferenças estatísticas pelo Teste de Tukey ($p < 0.05$)

No terceiro experimento conduzido com *P. brachyurus* foi observado que os tratamentos não apresentaram diferenças estatísticas ($F= 2,796$ $p=0,056$) (Figura 5). As plantas inoculadas com *B. bassiana* ESALQ-3399 apresentaram 852,50 ovos e juvenis por planta. Já as plantas com *I. fumosorosea* ESALQ-3422 apresentaram 1356 por planta, seguido de *Metarhizium* sp. indeterminada 1 ESALQ-1638 (1169 por planta) e o controle (931,25 por planta). Embora nenhuma diferença estatística tenha sido observada, percebe-se que a mesma tendência do primeiro experimento.

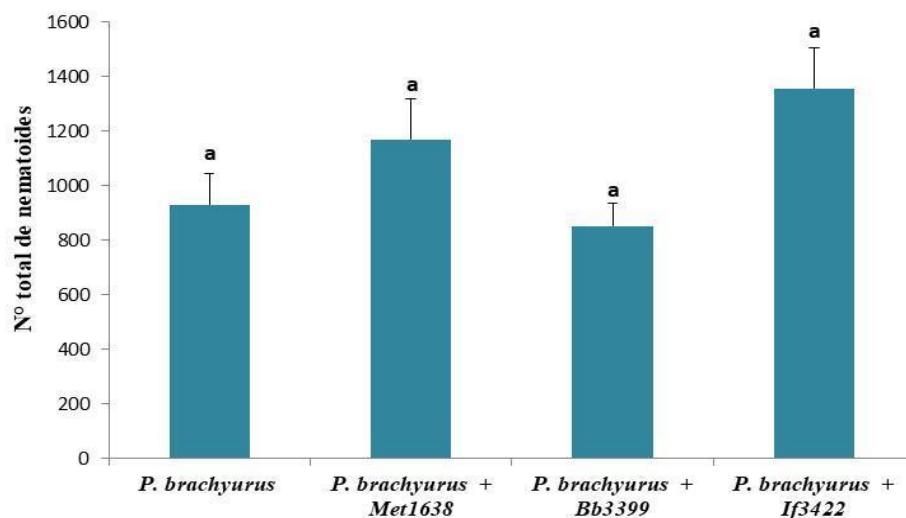


Figura 5. Número total de ovos e juvenis de *Pratylenchus brachyurus* encontrados em plantas de soja inoculadas com os fungos entomopatogênicos *Metarhizium* sp. indeterminada 1 ESALQ-1638 (Met1638), *Beauveria bassiana* ESALQ-3399 (Bb3399) e *Isaria fumosorosea* ESALQ-3422 (If3422). Experimento conduzido no período de 30 de agosto a 14 de novembro de 2018. Letras diferentes nas colunas representam diferenças estatísticas pelo Teste de Tukey ($p < 0.05$).

Colonização e persistência dos fungos entomopatogênicos em raízes de plantas de soja e no solo

No momento da extração dos cistos de *H. glycines* nos dois experimentos, as plantas estavam com aproximadamente 60 dias de inoculação dos fungos entomopatogênicos. Nessas plantas foi possível recuperar os 3 isolados fúngicos colonizando as raízes das plantas de soja, sendo observado um número maior de plantas com o isolado de *B. bassiana* ESALQ-3399 (40% de plantas colonizadas) nos dois experimentos. O isolado de *I. fumosorosea* ESALQ-3422 foi recuperado em 40% de plantas do primeiro experimento e 20% de plantas do segundo experimento. O isolado *Metarhizium* sp. indeterminada 1 ESALQ-1638 foi detectado unicamente nas raízes de algumas plantas de soja do primeiro experimento (40%). No solo foi isolado majoritariamente *Metarhizium* sp. indeterminada 1 ESALQ-1638, obtendo os valores de $1,3 \times 10^4$ e $4,2 \times 10^4$ UFC por grama de solo no experimento 1 e 2, respectivamente. Também foi isolado o fungo *I. fumosorosea* ESALQ-3422 a partir do solo, porém só no primeiro experimento.

Para os experimentos que foram conduzidos com *P. brachyurus*, a colonização e persistência dos fungos foram avaliadas em plantas de soja com mais de 70 dias. Em ambos os experimentos, o único fungo entomopatogênico detectado nas raízes de plantas de soja foi *B. bassiana* ESALQ-3399, sendo observado em aproximadamente 40% das plantas avaliadas. Entretanto, nas amostras de solo foi recuperado apenas o fungo *Metarhizium* sp. *indet.* 1 ESALQ-1638, obtendo valores de $1,3 \times 10^5$ e $9,3 \times 10^4$ UFC por grama de solo no primeiro e segundo experimento, respectivamente.

Ao comprar os resultados obtidos em ambas das espécies de nematóides pode se observar que os isolados mais persistentes foram *B. bassiana* ESALQ-3399 e *Metarhizium* sp. *indet.* 1 ESALQ-1638, entretanto a associação deles com as plantas foi diferente. O isolado *B. bassiana* ESALQ-3399 persistiu por mais de 70 dias nas plantas de soja, porém não foi detectado no solo (Figura 6 A). O isolado *Metarhizium* sp. *indet.* 1 ESALQ-1638 permaneceu nos solo por um período maior a 70 dias (Figura 6 B).

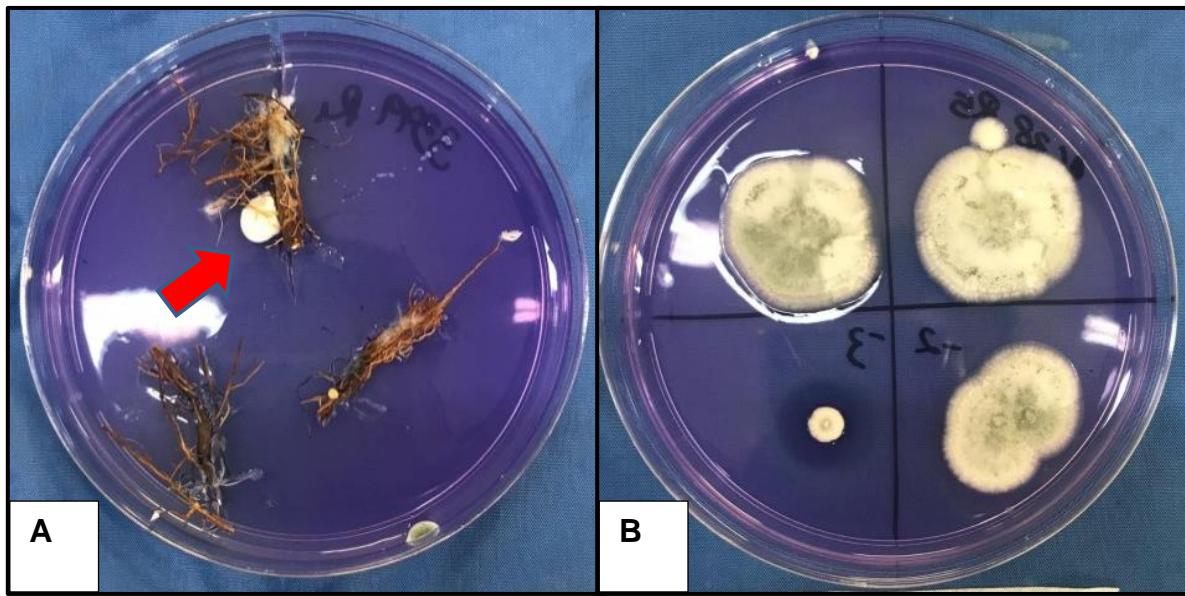


Figura 6. Recuperação dos isolados fúngico em raiz e solo das plantas de soja. **A-** *Beauveria bassiana* ESALQ- 3399 crescendo em fragmento de raiz; **B-** *Metarhizium sp indeterminada 1* ESALQ-1638 recuperado em amostras de solo.

Ação direta dos fungos entomopatogênicos sobre populações de *Heterodera glycines* e *Pratylenchus brachyurus*

Com o objetivo de avaliar se os fungos entomopatogênicos possuem efeito direto no desenvolvimento dos fitonematoídes sem a presença das plantas de soja, foi realizado um teste *in vitro* onde ovos e juvenis de *H. glycines* e *P. brachyurus* foram misturados com duas concentrações dos isolados fúngicos.

Nos testes conduzidos com ovos de *H. glycines* foi observado que os fungos entomopatogênicos nas duas concentrações não interferiram na eclosão de juvenis durante todo o período de avaliação (Tabela 1). No entanto, o tratamento com *I. fumosorosea* ESALQ-3422 na maior concentração apresentou valores de eclosão inferiores nos primeiros quatro dias em comparação com os demais tratamentos. Simultaneamente, os resultados da mobilidade dos juvenis demonstraram que o tratamento *B. bassiana* ESALQ-3399 (1×10^7 conídios/mL) apresentou uma porcentagem inferior de juvenis móveis nos primeiros três dias (Tabela 2).

Tabela 1. Porcentagem de eclosão de juvenis de *Heterodera glycines* em contato com duas concentrações (1×10^5 e 1×10^7 conídios/ml) de *Metarhizium sp. indeterminada 1* ESALQ-1638 (Met1638), *Beauveria bassiana* ESALQ-3399 (Bb3399) e *Isaria fumosorosea* ESALQ-3422 (If3422)

| TRATAMENTOS | Eclosão de juvenis acumulado por dia de avaliação (%)* | | | | | |
|---|--|------------|------------|------------|------------|------------|
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| <i>H. glycines</i> | 0,0± 0,0 | 15,9± 15,4 | 24,0± 22,4 | 28,7± 23,5 | 35,0± 24,8 | 47,6± 26,0 |
| <i>H. glycines</i> + Met1638 1×10^5 conídios/ml | 0,0± 0,0 | 12,5± 8,2 | 20,4± 23,3 | 20,3± 18,8 | 31,8 ±18,4 | 48,0± 23,2 |
| <i>H. glycines</i> + Met1638 1×10^7 conídios/ml | 0,0± 0,0 | 15,4± 14,6 | 14,0± 16,2 | 24,3± 14,8 | 31,3± 18,2 | 44,7± 17,4 |
| <i>H. glycines</i> + Bb3399 1×10^5 conídios/ml | 0,0± 0,0 | 12,2± 14,2 | 13,6± 14,3 | 14,7± 16,4 | 25,5± 17,9 | 30,9± 18,0 |
| <i>H. glycines</i> + Bb3399 1×10^7 conídios/ml | 0,0± 0,0 | 25,6± 24,8 | 25,2± 25,6 | 22,8± 21,1 | 27,2± 21,9 | 30,9± 22,0 |
| <i>H. glycines</i> + If3422 1×10^5 conídios/ml | 0,0± 0,0 | 21,8± 6,3 | 21,7± 6,9 | 22,6± 4,7 | 25,9± 20,3 | 45,7± 30,6 |
| <i>H. glycines</i> + If3422 1×10^7 conídios/ml | 0,0± 0,0 | 5,1± 5,8 | 6,1± 6,1 | 8,9± 6,3 | 20,0± 17,6 | 63,8± 25,4 |

*Eclosão de juvenis ± Desvio Padrão das médias

Tabela 2. Porcentagem de mobilidade de juvenis de *Heterodera glycines* em contato com duas concentrações (1×10^5 e 1×10^7 conídios/ml) de *Metarhizium sp. indeterminada 1* ESALQ-1638 (Met1638), *Beauveria bassiana* ESALQ-3399 (Bb3399) e *Isaria fumosorosea* ESALQ-3422 (If3422)

| TRATAMENTOS | Mobilidade de juvenis por dia de avaliação (%)* | | | | | |
|---|---|-----------|-----------|-----------|------------|------------|
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| <i>H. glycines</i> | 100,0± 0,0 | 92,1± 5,0 | 91,8± 2,3 | 92,8± 2,3 | 81,7± 9,4 | 65,5± 10,6 |
| <i>H. glycines</i> + Met1638 1×10^5 conídios/ml | 100,0± 0,0 | 80,6±16,7 | 85,8± 2,6 | 85,9± 6,2 | 80,5± 11,0 | 64,8± 9,1 |
| <i>H. glycines</i> + Met1638 1×10^7 conídios/ml | 100,0± 0,0 | 86,3±10,4 | 85,9± 9,8 | 89,3± 9,1 | 69,6± 19,8 | 57,8± 22,0 |
| <i>H. glycines</i> + Bb3399 1×10^5 conídios/ml | 100,0± 0,0 | 91,6± 7,2 | 91,0± 7,9 | 93,0± 5,2 | 71,5± 18,0 | 58,6± 12,5 |
| <i>H. glycines</i> + Bb3399 1×10^7 conídios/ml | 100,0± 0,0 | 77,3± 5,4 | 75,7± 7,7 | 76,1± 3,2 | 66,3± 13,2 | 61,8± 7,5 |
| <i>H. glycines</i> + If3422 1×10^5 conídios/ml | 97,9± 5,0 | 87,6± 7,7 | 87,0± 8,1 | 85,0± 5,9 | 70,4± 18,5 | 73,3± 7,3 |
| <i>H. glycines</i> + If3422 1×10^7 conídios/ml | 100,0± 0,0 | 81,7± 7,4 | 83,6± 4,5 | 82,8± 3,5 | 64,1± 24,3 | 72,2± 8,1 |

*Mobilidade de juvenis ± Desvio Padrão das médias

Nos testes com *P. brachyurus* foram inoculados apenas juvenis, portanto foi avaliada a porcentagem de eclosão de juvenis. Os resultados demonstraram que os fungos entomopatogênicos utilizados nas duas concentrações não apresentaram efeitos sobre a mobilidade dos juvenis (Tabela 3).

Tabela 3. Porcentagem de mobilidade de juvenis de *Pratylenchus brachyurus* em contato com duas concentrações (1×10^5 e 1×10^7 conídios/ml) de *Metarhizium sp. indeterminada 1* ESALQ-1638 (Met1638), *Beauveria bassiana* ESALQ-3399 (Bb3399) e *Isaria fumosorosea* ESALQ-3422 (If3422)

| TRATAMENTOS | Mobilidade de juvenis por dia de avaliação (%) [*] | | | | | |
|---|---|------------|------------|------------|------------|-----------|
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| <i>H. glycines</i> | 98,5± 3,3 | 72,8± 31,8 | 80,0±14,8 | 80,7± 13,7 | 53,4± 25,0 | 52,0±28,0 |
| <i>H. glycines</i> + Met1638 1×10^5 conídios/ml | 98,8± 2,6 | 90,7± 7,7 | 87,8± 3,3 | 86,2± 5,2 | 70,0± 10,8 | 58,8±15,1 |
| <i>H. glycines</i> + Met1638 1×10^7 conídios/ml | 94,5± 5,8 | 79,6± 6,4 | 78,7±13,4 | 74,8± 13,0 | 59,5± 20,0 | 56,3±20,3 |
| <i>H. glycines</i> + Bb3399 1×10^5 conídios/ml | 100,0± 0,0 | 85,3± 9,2 | 85,9± 6,0 | 90,07± 3,8 | 61,5± 26,6 | 55,2±24,6 |
| <i>H. glycines</i> + Bb3399 1×10^7 conídios/ml | 100,0± 0,0 | 82,5± 12,7 | 87,4± 7,2 | 85,3± 8,3 | 52,9± 20,0 | 49,2±24,3 |
| <i>H. glycines</i> + If3422 1×10^5 conídios/ml | 100,0± 0,0 | 79,4± 7,0 | 85,3± 8,8 | 86,4± 9,4 | 48,9± 21,0 | 44,9±18,9 |
| <i>H. glycines</i> + If3422 1×10^7 conídios/ml | 100,0± 0,0 | 72,6± 28,7 | 72,5± 25,3 | 72,5± 28,9 | 70,7± 13,6 | 61,1±18,4 |

*Mobilidade de juvenis ± Desvio Padrão das médias

DISCUSSÃO

Nos experimentos conduzidos com plantas inoculadas com fungos entomopatogênicos foi observado que os fitonematoídes *H. glycines* e *P. brachyurus* conseguiram completar seus ciclos de vida nos tempos de aproximadamente 45 dias e 60 dias, respectivamente. Para as duas espécies de nematoídes, a maior parte dos indivíduos foi encontrada nas raízes das plantas, evidenciando assim que ambas as espécies passam a maior parte de seus ciclos no interior seus hospedeiros (Luc et al, 2005; Koenning & Barker, 1995).

Ao comparar os resultados em ambas às espécies de nematoídes, foi observado que os efeitos dos fungos entomopatogênicos variaram de acordo com a espécie de nematoide, o qual pode estar relacionado com o ciclo de vida desses parasitos na planta. *H. glycines* é um endoparasita sedentário já que em seu processo de alimentação na raiz hospedeira permanece imóvel, os indivíduos fêmeas de *H. glycines* dão origem aos cistos que são estruturas rígidas destinadas para o armazenamento de ovos (Hussey et al. 1998). O fato que *H. glycines* ser um parasito sedentário poderia favorecer o contato dele com os fungos inoculados nas plantas ou com os metabolitos produzidos pela associação dos fungos com as plantas. Portanto, os indivíduos de *H. glycines* poderiam ser mais suscetíveis ao efeito da inoculação dos fungos nas plantas de soja.

P. brachyurus é um endoparasito migratório, porque em suas fases móveis migram no interior das raízes em busca de sítios de alimentação e, em alguns casos, podem retornar ao solo e parasitar outras plantas hospedeiras. No caso dos experimentos com esse nematoide, os resultados não foram conclusivos devido às variações nas quantidades de juvenis presentes nas raízes. Ao comparar o número de juvenis inoculados com o número de juvenis obtidos nas raízes após 60 dias, foi possível concluir que *P. brachyurus* apresentou um taxa de reprodução baixa (próxima a 1), indicando que juvenis inoculados ingressaram nas raízes das plantas mas não conseguiram aumentar a população.

De acordo com as informações fornecidas no folder do EMBRAPA (Farias, 2010) sobre variedades de soja convencionais, conferiu-se que a variedade utilizada nesse estudo (BRS 284) apresenta susceptibilidade para o nematoide-do-cisto *H. glycines*, porém não há relatos de que esta variedade é susceptível ou resistente ao nematoide-das-lesões-radiculares *P. brachyurus*. Portanto, os resultados obtidos nos experimentos

com *P. brachyurus* poderiam indicar que a variedade BRS 284 poderia ser considerada resistente já que a quantidade de indivíduos vistos após os 60 dias de inoculação eram similares com a quantidade que havia sido inoculada.

Os experimentos foram instalados em épocas do ano diferentes o que ocasionou uma variação nos dados no número de nematoides por plantas. Alston & Schmitt (1988) relataram que a temperatura ambiental desempenha grande influência sobre os estágios do ciclo de vida em fitonematoides, portanto a temperatura poderia ter interferido nos resultados, tanto nos experimentos com *H. glycines* e *P. brachyurus*. No caso de *H. glycines* as quantidades totais de cistos observados foram maiores no segundo experimento que foi conduzido no período de 30 de agosto a 24 de outubro de 2018 em comparação com o primeiro experimento que foi realizando entre 04 de junho a 30 de julho de 2018. Fato semelhante ocorreu com Valle et al. (1997), onde a eclosão de indivíduos de *H. glycines* foi maior em experimentos conduzidos em plantações de Guandu e Mucuna Preta em novembro de 1994 em relação com os experimentos nas mesmas cultivares instalados em maio 1994.

Embora os dados entre os experimentos conduzidos com *H. glycines* e *P. brachyurus* apresentaram variações, em linhas gerais, é possível indicar que para as duas espécies de nematoides o fungo entomopatogênico *B. bassiana* ESALQ-3399 apresentou algum efeito negativo sobre o desenvolvimento de ambas as espécies de nematoides. No segundo experimento conduzido com *H. glycines*, a quantidade total de cistos observados foi estatisticamente menor no tratamento com *B. bassiana* ESALQ-3399 que as quantidades encontradas no controle e nos demais tratamentos. Já no primeiro experimento conduzido com a mesma espécie de nematoide, embora a quantidade total de cistos não apresentasse diferenças estatísticas, a tendência pareceu ser a mesma, pois nas raízes das plantas inoculadas com *B. bassiana* ESALQ-3399 a quantidade de cistos foi significativamente menor que a quantidade vista no controle. No primeiro experimento conduzido com *P. brachyurus*, as plantas inoculadas com *B. bassiana* ESALQ-3399 apresentaram quantidade de ovos e juvenis numericamente menores que as plantas controle, no entanto nos dois experimentos seguintes diferenças estatísticas não foram constatadas, devido às variações nos dados.

Além de indicarem possíveis efeitos no desenvolvimento de *H. glycines* e *P. brachyurus* o isolado de *B. bassiana* ESALQ-3399 também foi verificado colonizando as raízes das plantas de soja. Estudos prévios reportaram que o *B. bassiana* é considerado

um fungo endofítico em plantas de milho, batata, algodão, tomate, sorgo, tamareira, banana, cacau, papoula, café e pinho (Vega et al. 2008, 2009; Ownley et al. 2008; Brownbridge et al. 2012, Parsa et al., 2018). No entanto, o presente trabalho indica pela primeira vez que essa associação endofítica pode, de alguma forma, afetar negativamente o desenvolvimento de fitonematoides.

Os entomopatógenos *Metarhizium* sp indeterminada 1 ESALQ-1638 e *I. fumosorosea* ESALQ-3422 não foram vistos colonizando raízes de plantas de soja na mesma proporção que *B. bassiana* ESALQ-339, observando também que eles não afetaram negativamente o desenvolvimento de *H. glycines* e *P. brachyurus*.

A persistência dos fungos entomopatogênicos no solo variou entre as espécies fúngicas, observando unicamente a presença de *Metarhizium* sp indeterminada 1 ESALQ-1638 em todos os experimentos com *H. glycines* e *P. brachyurus*. Entretanto, esse fungo não causou nenhum efeito no desenvolvimento de ambas as espécies de nematoides, indicando que a inoculação de *Metarhizium* sp indeterminada 1 ESALQ-1638 no solo não afetou a eclosão a migração dos juvenis para a planta.

Os experimentos *in vitro* demonstraram que nenhum fungo entomopatogênico foi capaz de afetar a eclosão e mobilidade de juvenis de *H. glycines* e *P. brachyurus*. Desta maneira pode-se sugerir que o isolado *B. bassiana* ESALQ-3399 pode colonizar as raízes de plantas de soja, e afetar indiretamente o desenvolvimento dos nematoides. Assim, o fungo *B. bassiana* ESALQ-3399 colonizaria as raízes de soja e, consequentemente, poderia interferir na penetração dos juvenis. Assim mesmo, a associação do fungo com as plantas poderia induzir o sistema de defesa das plantas e a produção de compostos ou metabolitos que inibiriam o desenvolvimento dos nematoides no interior das raízes. No entanto, estudos mais detalhados devem ser realizados para poder afirmar que o fungo entomopatogênico *B. bassiana* ESALQ-3399 é de fato um antagonista de *H. glycines* e *P. brachyurus*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alston, D G & Schmitt, D P (1988) Development of *Heterodera glycines* Life Stages as Influenced by Temperature. *The Journal of Nematology*, 20 (3): 366-372.
- Alves, T C U; Silva R A; Borges, D C; Motta, L C C; Kobayasti L (2011) Reação de Cultivares de Soja ao Nematoide das Lesões Radiculares. *Revista Biodiversidade*, 10 (1): 73-79.
- Alves, S B; Almeida, J E M; Moino Jr, A; Alves, L F A (1998) Técnicas de laboratório. In: Controle microbiano de insetos, Alves, S B (ed) Controle microbiano de insetos. São Paulo.
- Asmus, G L; Inomoto, M M (2007) Nematoides em cultivo integrado (Capítulo 7). In: Embrapa Informática Agropecuária. Disponível em. <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/99460/1/cap7.pdf>.
- Behie, S W & Bidochka, M J (2014) Nutrient transfer in plant–fungal symbioses. *Trends in Plant Science*, 19 (11): 734–740.
- Behie, S W; Jones, S J; Bidochka, M J (2015) Plant tissue localization of the endophytic insect pathogenic fungi *Metarhizium* and *Beauveria*. *Fungal Ecology*, 13:112-119.
- Behie, S W; Zelisko, P M; Bidochka, M J (2012) Endophytic insect parasitic fungi translocate nitrogen directly from insects to plants. *Science*, 336 (6088): 1576-1577.
- Brownbridge, M.; Reay, S.D.; Nelson, T.L.; Glare, T.R. (2012) Persistence of *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) as an endophyte following inoculation of radiata pine seed and seedlings. *Biological control*, 61: 194-200.
- Carneiro, R M D G (1992) Princípios e tendências do controle biológico de nematóides com fungos nematófagos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 27: 113-121.
- Cepea (2017) Soja. In: Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada. Disponível em. <https://www.cepea.esalq.usp.br/br/indicador/soja.aspx>. Citado 10 set 2016.
- Conab (2018) Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos. Disponível em. <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos>.

Coolen, W A & D'Herde, C J (1972) A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue. Ghent, Belgium, State Nematology and Entomology Research Station. 77p.

Coutinho, M M; Freiras, L G; Giarreta, R D; Neves, W S; Lopes, E A; Ferrez S (2009) Controle de *Meloidogyne javanica* com *Pochonia chlamydosporia* e farinha de sementes de mamão. *Nematologia Brasileira*, 33 (2): 169-175.

Faria, M R, Wraight, S P (2007) Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control*, 43: 237–256.

Farias, J R B (2010) Cultivares de Sojas Regiões Sul e Central do Brasil. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). Folder 10/2010 Dezembro/2010. In: <http://www.fundacaomeridional.com.br/files/Imagens/soja/BRS%20284.jpg>.

Freire, F C O; Bridge, J (1985) Parasitism of eggs, females and juveniles of *Meloidogyne incognita* by *Paecilomyces lilacinus* and *Verticillium chlamydosporium*. *Fitopatologia Brasileira*, 10 (3): 577- 596.

Goettel, M S; Eilenberg, J; Glare, T R (2005) Entomopathogenic fungi and their role in regulation of insect populations. In: Gilbert, L.I., Iatrou, K, Gill, S (Eds.), comprehensive Molecular Insect Science, 6. Elsevier, Oxford: 361–406

Goulart, A M C (2003) Aspectos Gerais dos Nematoides-das-lesões-radiculares (gênero *Pratylenchus*). In: Embrapa documentos 219. Disponível em. <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/571924/1/doc219.pdf>

Hussey, R S; Grundler, F M W (1998) Nematode parasitism of plants. In: Perry, R N; Wright, D J The physiology and biochemistry of free-living and plant-parasitic nematodes: 213-244.

Jaronski, S T & Jackson M A (2012) Mass production of entomopathogenic Hypocreales. In: Lacey, L A. Manual of Techniques in Invertebrate (Second editon), Elsevier: 255-284.

Khan, A L; Hamayun, M; Khan, S A ; Kang, S; Shinwari, Z K; Kamran, M; Rehman, S; Kim, J; Lee, I (2012) Pure culture of *Metarhizium anisopliae* LHL07 reprograms soybean to

higher growth and mitigates salt stress. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28: 1483-1494.

Koenning, S R; Barker, K R (1995) Soybean Photosynthesis and Yield as Influence by *Heterodera glycines*, Soil Type and Irrigation. *Journal of Nematology*, 27 (1): 51-62.

Lohse, R; Jakobs-Schonwandt, D; Vidal, S; Patel, A V (2015) Evaluation of new fermentation and formulation strategies for a high endophytic establishment of Beauveria bassiana in oilseed rape plants. *Biological Control*, 88:26-36.

Luc, M; Sikora, R A; Bridge, J. (2005) Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture. second edition. CABI Publishing, Cambridge, 871 p.

Meyling, N V & Eilenberg, J (2006) Occurrence and distribution of soil borne entomopathogenic fungi within a single organic agroecosystem. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 113: 336–341.

Meyling, N V & Eilenberg, J (2007). Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: potential for conservation biological control. *Biological Control*, 43: 145-155.

Niblack, T L (2005) Soybean Cyst Nematode Management Reconsidered. *Plant Disease*, 89 (10): 1020-1026.

Nunes, H T; Monteiro, A C; Vilela, A W P (2010) Uso de agentes microbianos e químico para o controle de *Meloidogyne incognita* em soja. *Acta Scientiarum Agronomy Journal (Maringá)*, 32 (3): 403-409.

Ownley, B H; Griffin, M R; Klingeman, W E; Gwinn, K D; Moulton, J K; Pereira, R M (2008) *Beauveria bassiana*: Endophytic colonization and plant disease control. *Journal of Invertebrate Pathology*, 98: 267–270.

Parsa, S; Ortiz, V; Vega, F E (2013) Establishing Fungal Entomopathogens as Endophytes: Towards Endophytic Biological Control. *Journal of Visualized Experiments*, 74: 503-560.

Pinheiro, J B (2012) Agência Embrapa de Informação Tecnologica- Nematoides. Disponível:<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/pimenta/arvore/CONT000gn0k9bx902wx5ok0liq1mqu1365k.html>

- Sasan, R K & Bidochka, M J (2013) Antagonism of the endophytic insect pathogenic fungus *Metarhizium robertsii* against the bean plant pathogen *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*. Canadian Journal of Plant Pathology, 35 (3): 288–293.
- Sasan, R K & Bidochka, M.J (2012) The insect-pathogenic fungus *Metarhizium robertsii* (Clavicipitaceae) is also an endophyte that stimulates plant root development. American Journal of Botany, 99 (1): 101-107.
- Silva, R A; Pereira, L C (2003) Efeitos de densidades populacionais de *Pratylenchus brachyurus* na produtividade de duas cultivares de soja. Nematologia Brasileira, 27 (2): 268, 2003.
- Sipes, B S; Schmitt D P; Barker K R (1992) Fertility of three parasitic biotypes of *Heterodera glycines*. Phytopathology, 82: 999-1001.
- Valle L A C; Ferraz, S; Teixeira, D A (1997) Estímulo à Eclosão de Juvenis, Penetração e Desenvolvimento de *Heterodera glycines* nas raízes de Macuna Preta (*Mucuna aterrima*) e Guandu (*Cajanus cajan*). Nematologia Brasileira, 21 (1): 67-83.
- Vega, F E (2008) Insect pathology and fungal endophytes. Journal of Invertebrate Pathology, 98: 277-279.
- Vega, F E (2009) Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. Fungal Ecology, 2:149–159.