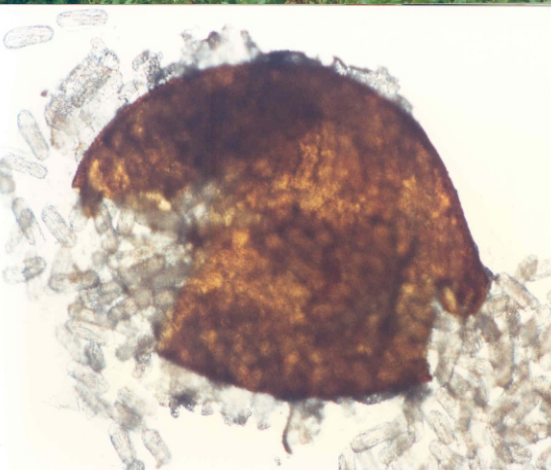
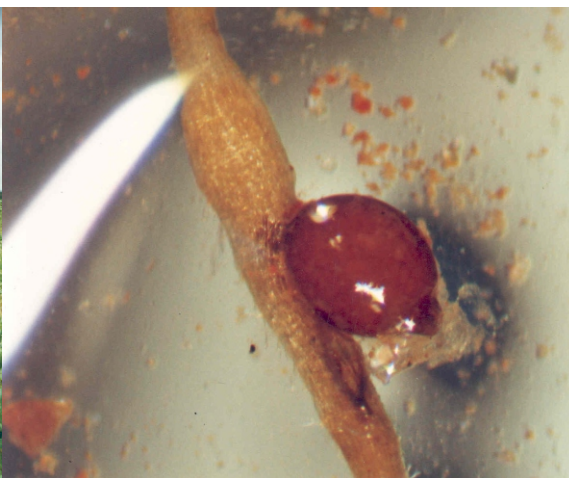


Eficiência de Endotoxinas de *Bacillus* spp. no Controle de *Heterodera* *glycines* Ichinohe na Soja





Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Cerrados
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

ISSN 1676-918X

Fevereiro, 2003

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 78

Eficiência de Endotoxinas de *Bacillus* spp. no Controle de *Heterodera glycines* Ichinohe na Soja

Ravi Datt Sharma
Wellington A. Moreira
Roberto Teixeira Alves

Planaltina, DF
2003

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Cerrados

BR 020, Km 18, Rod. Brasília/Fortaleza

Caixa Postal 08223

CEP 73310-970 Planaltina - DF

Fone: (61) 388-9898

Fax: (61) 388-9879

http\www.cpac.embrapa.br

sac@cpac.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Dimas Vital Siqueira Resck*

Editor Técnico: *Carlos Roberto Spehar*

Secretária-Executiva: *Nilda Maria da Cunha Sette*

Supervisão editorial: *Jaime Arbués Carneiro*

Revisão de texto: *Jaime Arbués Carneiro*

Normalização bibliográfica: *Rosângela Lacerda de Castro*

Capa: *Chaile Cherne Soares Evangelista*

Editoração eletrônica: *Leila Sandra Gomes Alencar*

Impressão e acabamento: *Divino Batista de Souza*
Jaime Arbués Carneiro

Impresso no Serviço Gráfico da Embrapa Cerrados

1ª edição

1ª impressão (2003): tiragem 100 exemplares

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

CIP-Brasil. Catalogação-na-publicação.
Embrapa Cerrados.

S531e Sharma, Ravi Datt.

Eficiência de endotoxinas de *Bacillus* spp. no controle de *Heterodera glycines* Ichinohe na soja / Ravi Datt Sharma, Wellington A. Moreira, Roberto Teixeira Alves. – Planaltina, DF : Embrapa Cerrados, 2003.

15 p. – (Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Cerrados, ISSN 1676-918X ; 78)

1. Controle biológico. 2. Soja. 3. Nematóide-do-cisto. I. Moreira, Wellington A. II. Alves, Roberto Teixeira. III. Título. IV. Série.

632.96 - CDD 21

© Embrapa 2003

Sumário

Resumo	5
Abstract	6
Introdução	7
Material e Métodos	8
Preparo do inóculo do nematóide	8
Preparo do inóculo da bactéria	8
Montagem, condução e avaliação do bioensaio	8
Resultados e Discussão	10
Conclusões	13
Agradecimentos	14
Referências Bibliográficas	14

Eficiência de Endotoxinas de *Bacillus* spp. no Controle de *Heterodera glycines* Ichinohe na Soja

Ravi Datt Sharma¹

Wellington A. Moreira²

Roberto Teixeira Alves³

Resumo - Avaliou-se a eficiência de endotoxinas de *Bacillus sphaericus* (Bs 2362), *B. thuringiensis* var. *Israelensis* (Bti-H-14) e *B. thuringiensis* var. *Kurstaki* (Btk-Hd-1) no controle de nematóide de cisto *Heterodera glycines*, na soja cv. Cristalina, em casa de vegetação. Cinco doses (0, 250, 500, 1000, e 1500 mg) de cada endotoxina, com 10⁸ esporos por grama, foram comparadas com 150 mg de aldicarb em um experimento com cinco repetições. Os produtos foram incorporados a 2 cm de profundidade e o solo irrigado com 100 mL de água destilada. Uma testemunha, com solo autoclavado, foi incluído, para comparação do crescimento das plantas. Dez dias depois da aplicação de endotoxinas e aldicarb, uma plântula de soja, depois da emergência, foi transplantada em cada vaso contendo 1 kg de solo. Passados oitenta e três dias, avaliou-se peso de grãos/planta para diferentes doses de toxinas. Os tratamentos com endotoxina Btk-HD-1 na dosagem de 1500 mg/kg de solo e solo autoclavado diferiram significativamente ($P < 0.05$) da dose zero. Os pesos dos grãos nos tratamentos com a endotoxina Btk-HD-1 dosagem de 1500 mg/kg de solo e solo autoclavado foram respectivamente 61 e 85 % maiores. Nenhuma das endotoxinas usadas neste estudo reduziu significativamente ($P < 0,05$) a população final de nematóides em relação o controle.

Termos para indexação: Nematóide-do-cisto da soja, *Bacillus sphaericus*, *B. thuringiensis* var. *Israelensis*, *B. thuringiensis* var. *Kurstaki*, controle biológico.

¹ Eng. Agrôn., D.Sc., Embrapa Cerrados, sharma@cpac.embrapa.br

² Eng. Agrôn., D.Sc., wellington@cpatsa.embrapa.br

³ Eng. Agrôn., Ph.D. Embrapa Cerrados, ralves@cpac.embrapa.br

Efficiency of *Bacillus* spp. Endotoxins to Control *Heterodera glycines* Ichonohe on Soybean

Abstract - In a greenhouse pot experiment, efficiency of endotoxins obtained from pure cultures of *Bacillus sphaericus* (Bs 2362), *B. thuringiensis* var. *israelensis* (Bti-H-14) and *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (Btk-Hd-1) was evaluated against soybean cyst nematode, *Heterodera glycines* on soybean cv. *Cristalina*. Five doses (0, 250, 500, 1000 and 1500 mg) of each endotoxin with 1.108 spores per gram and 150 mg aldicarb were incorporated in upper 2-cm soil layer followed by application of 100 mL distilled water/kg of soil. Autoclaved soil was used as control for comparing plant growth with treatments. The experimental design was a completely randomized, with five replicates. Ten days after the application of endotoxins, a three-day after emergence soybean seedling was transplanted in each pot. Eighty-three days later, the increase in grain weight/plant and final populations of soybean cyst nematodes were evaluated. In general, grain production was very low. Grain weights for treatments with endotoxin Btk-HD-1 dose 1500 mg/Kg of soil and autoclaved soil differed significantly ($P < 0.05$) from the control, yielding respectively 61% and 85 % higher than the control. None of the endotoxins used in this study could significantly ($P < 0.05$) reduce the final nematode populations in relation to the untreated control (autoclaved soil).

Index terms: Soybean cyst nematode, bacterial endotoxins, biocontrol, *Bacillus sphaericus*, *B. thuringiensis* var. *israelensis*, *B. thuringiensis* var. *kurstaki*.

Introdução

O nematóide-do-cisto (*Heterodera glycines* Ichinohe, 1952), um dos patógenos mais sérios da soja, foi identificado pela primeira vez no ano agrícola 1991/92 no Brasil Central ([Anjos & Sharma, 1992](#); [Lima et al., 1992](#); [Lordello et al., 1992](#); [Mendes & Dickson, 1992](#); [Monteiro & Morais, 1992](#)). Na atualidade, a área infestada no Brasil foi estimada em aproximadamente três milhões de hectares, em 103 municípios dos Estados do Rio Grande do Sul, Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, Bahia e Tocantins (Silva et al., 2003).

Para controle desse patógeno, diferentes medidas foram consideradas como: rotação de culturas, uso de variedades resistentes ou tolerantes além de outras medidas e práticas culturais. Há poucas informações sobre controle biológico desse nematóide utilizando *Bacillus* spp. No Brasil, os meios de cultura de *B. thuringiensis* var. *Thuringiensis* (Btt) e *B. thuringiensis* var. *Israelensis* (Bti) mostraram-se muito tóxicos aos diferentes estádios desse nematóide ([Sharma, 1994](#)). *Bacillus thuringiensis* (Bt) é bem conhecido pela capacidade de produção de proteínas inclusas ou endotoxinas, que são tóxicas para diferentes espécies de insetos. A exotoxina purificada termoestável foi relatada como tóxica para ovos de *Meloidogyne* sp. *In vitro* na concentração de 1:10 ([Prasad et al., 1972](#)). O nematóide causador de lesões (*Pratylenchus scribneri*) é susceptível ao Bt delta-endotoxinas, mas sua eficácia não foi determinada devido à fraca solubilidade dessas toxinas ([Bradfish et al., 1991](#)).

Segundo [Sharma \(1993\)](#), Btt e Bti controlaram significativamente *M. incognita* em cevada em condições de casa de vegetação. [Oka et al., \(1993\)](#) relatou atividade nematicida do *B. cereus* sobre ovos e juvenis, e a exposição de *M. javanica* a essa bactéria no solo inibiu penetração do nematóide nas raízes de tomateiro. Segundo [Zuckerman et al. \(1993\)](#), o isolado CR-371 de *B. thuringiensis*, apresentou controle sobre nematóides fitoparasitas. Tomateiro e pimentão tratados com CR-371 apresentaram redução no número de galhas nas raízes por *M. incognita* em relação a plantas não tratadas. Em casa de vegetação, os mesmos autores observaram que plantas de morango tratados com CR-371 apresentavam pequenas populações de *Pratylenchus penetrans*.

Na Índia, [Siddiqui & Mahmood \(1993\)](#) relataram que *B. subtilis* reduziu o número de galhas nas raízes e a multiplicação do nematóide *M. incognita* raça 3 em grão-de-bico, resultando num aumento no crescimento das plantas.

O presente trabalho objetiva avaliar a eficiência de delta-endotoxinas obtidas de culturas puras de *Bacillus sphaericus* (Bs), *B. thuringiensis* var. *Israelensis* (Bti) e *B. thuringiensis* var. *Kurstaki* (Btk) no controle de nematóide-do-cisto da soja em condições de casa de vegetação.

Material e Métodos

Preparo do inóculo do nematóide

O nematóide-do-cisto da soja raça 3 foi obtido inicialmente de área infestada em Chapadão do Céu, Goiás e multiplicado em soja cv. Cristalina, sob condições de casa de vegetação. O substrato utilizado para multiplicação foi constituído de 50% de solo Latossolo Vermelho Escuro e areia lavada (tamanho < 1 mm). Essa mistura recebeu uma aplicação de 1,72 g de calcário dolomítico (60% PRNT), 4,67 g de superfosfato simples, 0,41 g de cloreto de potássio e 0,0025 g de micronutrientes por kg de solo para o cultivo da soja. A composição química da mistura comercial de micronutrientes foi: Zn (9%), Bo (2,7%), Cu (0,80%), Fe (3,62%), Mn (3,47%) e Mo (0,132%).

Preparo do inóculo da bactéria

O experimento incluiu três fontes de delta-endotoxina da bactéria: *Bacillus sphaericus* (BS 2362), *B. thuringiensis* var. *Israelensis* (Bti-H-14) e *B. thuringiensis* var. *Kurstaki* (Btk-HD-1) cada um com 1×10^8 esporos/mL. Cada fonte de bactéria apresentou quatro concentrações (250, 500, 1000 e 1500 mg/recipiente). Culturas puras de diferentes cepas das bactérias foram fornecidas pelo instituto Pasteur de Paris, França. Essas cepas foram multiplicadas assepticamente pela Geratck S.A., Cruz Alta, RS, Brasil em meio de cultura industrial com fermentadores de 150 litros. As culturas fermentadas foram submetidas centrifugação para separar exotoxinas da biomassa. Esta foi submetida à secagem por ar quente e misturadas com SiO₂ e diatômito para obtenção de aproximadamente 1×10^8 esporos viáveis por grama do produto. Bioensaios foram realizados para determinar nível de toxicidade por grama do produto final.

Montagem, condução e avaliação do bioensaio

Para cada toxina estudada utilizaram-se quatro concentrações em delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições. A unidade experimental consistiu de um recipiente, em 15 tratamentos, os quais incluíram controle (solo infestado com nematóide), uso de nematicida (150 mg de aldicarb por recipiente) apenas

no solo infestado com nematóide e solo autoclavado para comparação de crescimento das plantas (Tabela 1).

Tabela 1. Efeito de endotoxinas de *Bacillus sphericus* (Bs), *B. thuringiensis* var. *Israelensis* (Bti) e *B. thuringiensis* var. *Kurstaki* (Btk) no crescimento e desenvolvimento da soja, cv. Cristalina, em solo infestado com *Heterodera glycines* em casa de vegetação.

Tratamento	Dose (mg/kg)	Matéria fresca da planta (g)		
		Parte aérea	Raiz	Grãos (g)
Bs 2362	250	10,76 ab	5,30 abc	2,40 abcd
	500	13,32 a* +	6,44 abc	1,60 cd +
	1000	11,72 ab	6,42 abc	1,58 cd +
	1500	12,00 ab*	5,82 abc	1,56 cd +
Bti-H-14	250	10,10 ab	6,30 abc	1,46 d +
	500	10,16 ab	6,22 abc	1,38 d +
	1000	7,46 b	4,96 abc	2,54 abcd
	1500	6,78 b	3,26 c*	1,96 bcd
Btk-HD-1	250	8,40 ab	4,30 abc	2,46 abcd
	500	8,88 ab	4,82 abc	2,92 abc
	1000	8,28 ab	4,64 abc	2,76 abcd
	1500	9,64 ab	5,86 abc	3,22 ab*
Aldicarb	50 a.i.	8,62 ab	3,78 bc*	2,96 abc
Autoclavado	0	11,16 ab	7,60 a +	3,70 a *
Control	0	7,24 b	7,36 ab +	2,00 bcd
LSD (5%)	Tukey	5,511	3,766	1,401
LSD (5%)	Dunnett	4,522	3,090	1,149

¹ Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%,

² O teste de Dunnett foi utilizado para comparação de todos os tratamentos frente à testemunha (*) para alfa = 0,05 e símbolo mais (+) indica comparação entre tratamento aldicarb e demais tratamentos.

O solo infestado com nematóide-do-cisto da soja em casa de vegetação foi homogeneizado antes de ser dividido em porções de 1 kg para preencher tubos cilíndricos de PVC com 7,5 cm de diâmetro e capacidade de 1 litro, com os fundos fechados por tela de náilon. A densidade populacional do nematóide foi determinada utilizando-se dois métodos: 1) cistos maduros em 50 g de solo de acordo com [Fenwick \(1940\)](#), e 2) juvenis de segundo estágio em 50 g de solo

pelo método modificado de Coolen ([Sharma, 1985](#)). A população inicial de nematóides por kg de solo por recipiente foi igual a 2.537 (390 juvenis de segundo estágio J2 mais 2.147 cistos maduros).

As diferentes concentrações de toxinas da bactéria e do nematicida aldicarb foram espalhadas sobre o solo em cada recipiente e incorporada com espátula em 2 cm de profundidade no solo. Depois da aplicação das toxinas, uma plântula de soja cv. Cristalina, três dias depois da emergência foi transplantada para cada recipiente. Em seguida foi feita uma aplicação de 100 mL de água destilada em todos os recipientes. Uma mistura de fertilizantes (Super Ouro Verde) foi aplicada quinzenalmente. Os recipientes foram dispostos sobre mesas em casa de vegetação. A temperatura média variou entre 25 °C e 32 °C durante a condução deste experimento.

Passados oitenta e três dias da aplicação das diferentes toxinas foi feita a colheita da soja e mediu-se peso da matéria fresca da parte aérea, peso de raízes, peso de grão e população final do nematóide no solo e nas raízes. Os dados foram analisados segundo procedimento estatístico padrão ([Dunnnett, 1955](#); [Snedecor & Cochran, 1967](#)). O teste de Dunnnett foi utilizado para comparação de todos os tratamentos frente à testemunha (*) para alfa = 0,05 e símbolo mais (+) indica comparação entre tratamento aldicarb e demais tratamentos. A população do nematóide foi transformada em log (x + 1) antes de realizar a análise de variância. As médias foram comparadas com base no teste de Tukey (HSD) a 5% de probabilidade.

Resultados e Discussão

O peso da matéria fresca da parte aérea da planta no tratamento Bs 500 mg foi mais alto e diferiu significativamente ($p < 0,05$) do tratamento controle (solo não tratado), Bti 1.000 mg e Bti 1.500 mg. De acordo com teste de Dunnnett, o tratamento Bs 1.500 mg diferiu significativamente ($p < 0,05$) do tratamento controle. O tratamento solo autoclavado teve mais alto peso das raízes que diferiu ($p < 0,05$) do tratamento com aldicarb e Bti 1.500 mg. O peso do sistema radicular do tratamento aldicarb diferiu significativamente ($p < 0,05$) do tratamento controle ([Tabela 1](#)).

O peso do grão de soja é um dos parâmetros mais importantes para medir a eficiência das diferentes toxinas no controle de doenças e pragas. Em geral, a produção de grão foi muito baixa em todos tratamentos. O peso do grão no

tratamento com solo autoclavado foi mais alto; e o peso dos grãos no tratamento Btk 1.500 mg e solo autoclavado diferiu significativamente ($p < 0,05$) do controle ([Tabela 1](#)).

Em geral, a população de machos em todos os tratamentos foi muito baixa em comparação com outros estádios do nematóide. A densidade populacional mais alta do nematóide ocorreu no tratamento Bti 250 mg e a mais baixa no tratamento Bs 250 mg. Não houve diferença significativa na população final (ovos, juvenis, machos e fêmeas) do nematóide entre controle e os demais tratamentos. A densidade populacional de cistos no tratamento com aldicarb foi baixa e diferiu significativamente ($p < 0,05$) dos tratamentos Bs 500 mg, Bs 1.000 mg, Bs 1.500 mg, Bti 250, Btk 1.500 e do controle ([Tabela 2](#)).

As densidades populacionais de juvenis do segundo estágio (J2) no tratamento Bs 1.500 mg e Bti 250 foram mais altas em relação os demais tratamentos que diferiram ($p < 0,05$) do tratamento Bs 250 mg. As densidades de J2 aumentaram linearmente com aumento da concentração de toxinas Bs, enquanto para Bti a tendência foi oposta. No caso da toxina Btk houve um leve aumento na densidade de J2 no tratamento Btk 500 mg em relação Btk 250 mg, mas acima dessa concentração as densidades foram reduzidas consideravelmente. Não houve diferença significativa entre diferentes concentrações de Btk ([Tabela 2](#)).

O maior número de ovos foi observado no tratamento Bs 1.000 mg que diferiu significativamente ($p < 0,05$) dos tratamentos Bs 250 mg e aldicarb. A densidade de nematóides por grama de raiz foi mais baixa no tratamento Bs 250 mg e diferiu significativamente ($p < 0,05$) das altas densidades nos tratamentos Bti 250 mg, Bs 1.500 mg e Bs 1.000 mg ([Tabela 2](#)).

Embora não tenha havido diferença significativa entre tratamentos para população total de nematóides, certas tendências interessantes foram observadas. Com o aumento da concentração de toxinas, houve um aumento linear na densidade de nematóides resultando na redução do rendimento e vice-versa. No caso do tratamento Bs 500 mg e superior e também nas concentrações de Bti 250 mg e Bti 500 mg e superior, afetaram seriamente o rendimento. Resultados semelhantes foram obtidos por [Sharma \(1994\)](#) quando o meio de cultura puro de Bti foi utilizado. Na toxina de Btk, o rendimento aumentou significativamente em todas as doses utilizadas e foram superiores aos com Bs 250 mg que teve mais baixo nível de população total de nematóides ([Tabela 1](#)).

Tabela 2. Efeito de endotoxinas de *Bacillus sphaericus* (Bs), *B. thuringiensis* var, *Israelensis* (Bti) e *B. thuringiensis* var, *Kurstaki* (Btk) na reprodução de *Heterodera glycines* em soja, cv, Cristalina, em casa de vegetação.

Tratamento	Dose mg/kg do solo	Solo (Nº /Kg)				Raiz (Nº /g)	
		Macho	Cisto	Juvenil	Estádio ovo		
Bs 2362	250	60	2051 ab	2940 b	2880 b	7931 a	1344 b
	500	40	2571 ab +	3860 ab	5020 ab	11491 a	1803 ab
	1000	100	4238 ab +	13560 ab	26420 a +	44318 a	6588 a
	1500	100	4133 a +	19580 a	20980 ab	44793 a	6588 a
Bti-H-14	250	80	3777 ab +	21080 a	24840 ab	49777 a	7240 a
	500	20	2856 ab	9720 ab	8760 ab	21356 a	3157 ab
	1000	20	2140 ab	6740 ab	11120 ab	20021 a	4483 ab
	1500	100	816 ab	5760 ab	12220 ab	18876 a	6197 ab
Btk-HD-1	250	100	1651 ab	8040 ab	9520 ab	9520 ab	4284 ab
	500	60	2842 ab	12440 ab	12180 ab	12180 ab	5064 ab
	1000	40	2358 ab	8380 ab	9440 ab	9440 ab	3985 ab
	1500	40	2179ab +	6760 ab	7120 ab	7120 ab	2732 ab
Aldicarb	50a,i,	40	578 b*	4440 ab	3080 ab	8138 a	2597 ab
Autoclavado	0	0	0	0	0	0	0
Controle	0	120	3451 a +	12660 ab	15620 ab	31851 a	3939 ab
LSD 5%)	Tukey	-	2,355	2,078	2,235	1,910	1,538
LSD (5%)	Dunnett	-	1,940	1,841	1,712	1,573	1,266

¹ Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%,

² O teste de Dunnett foi utilizado para comparação de todos os tratamentos frente à testemunha,

³ (*) para alfa = 0,05 e símbolo plus (+) indica comparação entre tratamento aldicarb e demais tratamentos,

⁴ Os dados originais de densidades de nematóides foram transformados e log (x + 1).

A razão principal para obter maior rendimento pode ser devida à inibição da eclosão dos ovos e à emergência dos juvenis na fase inicial de crescimento vegetativo das plantas. Isto pode ter resultado na penetração atrasada de nematóides nas raízes da soja resultando em escape. Resultados semelhantes foram obtidos por [Oka et al., \(1993\)](#), que expuseram *Meloidogyne javanica* a *B. cereus* no solo em experimento com tomateiro. De acordo com [Zuckerman et al., \(1993\)](#), tomateiro e pimentão tratados com isolado CR-371 do Bt desenvolveram poucas galhas de *M. incognita* nas raízes em relação às testemunhas não tratadas. Além de baixa população de *Rotylenchulus reniformis* em Porto Rico e plantas de morangos tratadas com o mesmo isolado do Bt também tinham baixas populações de *Pratylenchus penetrans* em Massachusetts, E.U.A. Na Índia, [Siddiqui & Mahmood \(1993\)](#), relataram que *B. subtilis* reduziu o engrossamento nas raízes e a multiplicação de *M. incognita* raça 3 em grão-de-bico, com reflexo positivo no crescimento da planta. Segundo [Sharma & Gomes \(1996\)](#), endotoxinas de Bs 2362 aplicadas nas concentrações de 0,2 a 2,0 mg/g de solo autoclavado e inoculado com 10 cistos de *H. glycines* por 100 g de solo sem hospedeiro resultaram na inibição significativa ($p < 0,05$) da emergência de juvenis, 15 dias depois da aplicação de toxinas. Ademais, estas podem estimular a eclosão de ovos e a emergência de juvenis resultando em uma penetração mais cedo. Altas populações iniciais, o que pode afetar seriamente o crescimento vegetativo das plantas. Em outro experimento, [Sharma & Gomes \(1996\)](#), observaram que endotoxinas de Bs 2362 e Btk-Hd-1, aplicadas em concentração de 1 mg/g do solo infestado com *H. glycines*, na ausência de hospedeiro, resultou em um aumento significativo ($p < 0,05$) na oviposição e emergência de juvenis, de cistos 15 dias depois da aplicação de toxinas, em casa de vegetação.

Conclusões

1. Nenhuma das toxinas utilizadas reduziu significativamente a população final de nematóides em relação à testemunha.
2. A dose de 1.500 mg/kg de solo de endotoxinas de *B. thuringiensis* var. *Kurstaki* (Btk-Hd-1), produziu significativamente maior rendimento em relação à testemunha com solo autoclavado.

Agradecimentos

Os autores agradecem a colaboração técnica de Emanoelita Cavalcanti de Lima, Valdeci Matos de Lima e Dr. Lúcio José Vivaldi para análise estatística e ao Engenheiro Agrônomo Airton Leite, da DEFENSA, Indústria de Defensivos Agrícolas Ltda. Pelo fornecimento das diferentes cepas das toxinas de *Bacillus*.

Referências Bibliográficas

ANJOS, J. R. N.; SHARMA, R. D. Ocorrência do nematóide do cisto da soja, *Heterodera glycines* no estado de Goiás. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 17 n. 2, p. 183, 1992. Resumo dos trabalhos apresentados no XXV Congresso Brasileiro de Fitopatologia.

BRADFISH, G. A; HICKLE, L. A.; FLORES, R.; SCHWAB, G. Nematocidal *Bacillus thuringiensis* toxins: opportunities in animal health and plant protection. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON BACILLUS THURINGIENSIS, 1., 1991, Oxford. **Abstracts**. Oxford: [s.n.], 1991. p. 33.

COOLEN, W. A. Methods for the extraction of *Meloidogyne* spp. and other nematodes from roots and soil. In: LAMBERTIL, F.; TAYLOR, C. E. (Ed.). **Root-knot nematodes (*Meloidogyne* species): systematics biology and control**. London: Academic Press, 1979. p. 317-329.

DUNNETT, C. W. A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. **JASA**, Washington, v. 50, p. 1096-1121, 1955.

FENWICK, D. W. Methods for the recovery and counting of cysts of *Heterodera schachtii* from soil. **Journal of Helminthology**, London, v. 33, p. 189-196, 1940.

LIMA, R. D.; FERRAZ, S.; SANTOS, J. M. Ocorrência de *Heterodera* sp. em soja no Tri-ângulo Mineiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, 16., 1992, Lavras, MG. **Resumos...** Lavras: ESAL: Sociedade Brasileira de Nematologia, 1992.

LORDELLO, A. I. L.; LORDDELLO, R. R. A.; QUAGGIO, J. A. Ocorrência do nematóide de cisto da soja *Heterodera glycines* no Brasil. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v. 67, n. 3, p. 223-225, 1992.

MENDES, M. L. O.; DICKSON, D. W. *Heterodera glycines* found on soybean in Brasil. **Journal of Nematology**, v. 24, p. 606, 1992.

MONTEIRO, A. R.; MORAIS, S. R. A. C. Ocorrência do nematóide do cisto da soja, *Heterodera glycines* Ichinohe, 1952, prejudicando a cultura no Mato Grosso do Sul. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, 16., Lavras, MG. **Resumos...** Lavras: ESAL: Sociedade Brasileira de Nematologia, 1992.

PRASAD, S. S. S. V.; TILAK, K. V. B. R. ; GOLAKOTE, K. G. Role of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* on the larval survivability and egg hatching of *Meloidogyne* spp., the causative agent of root-knot disease. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 20, p. 377-378, 1972.

OKA, Y.; CHET, I.; SPIEGEL, Y. Control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Bacillus cereus*. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 3, n. 2, p. 115-126, 1993.

SHARMA, R. D. Comparação de métodos para coletar ovos de *Meloidogyne* spp. de raízes, incluindo uma nova técnica. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 9, p. 18-19, 1985.

SHARMA, R. D. *Bacillus thuringiensis*: a biocontrol agent of *Meloidogyne incognita* on barley. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 17, n. 1, p. 5, 1993.

SHARMA, R. D. *Bacillus thuringiensis*: um agente biocontrolador do nematóide de cisto da soja. In: SEMINÁRIO NACIONAL SOBRE NEMATÓIDE DE CISTO DA SOJA HETERODERA GLYCINES, 1., 1993, Brasília. **Anais...** Brasília: Embrapa-SPI, 1994. p. 226-231.

SHARMA, R. D.; GOMES, A. C. Effect of *Bacillus* spp. toxins on oviposition and juvenile hatching of *Heterodera glycines*. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 20, n. 1, p. 53-62, 1996.

SIDDQUI, Z. A.; MAHMOOD, I. Biological control of *Meloidogyne incognita* race 3 and *Macrophomina phaseolina* by *Paecilomyces liliacinus* and *Bacillus subtilis* alone and in combination on chickpea. **Fundamental of Applied Nematology**, Montrouge, v. 16, p. 315-318, 1993.

SNEDECOR, G. W.; COCHRAN, W. G. **Statistical methods**. Ames: Iowa State University, 1967. 593 p.

ZUCKERMAN, B. M.; DICKLOW, M. B.; ACOSTA, N. A strain of *Bacillus thuringiensis* for the control of plant-parasitic nematodes. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 3, n. 1, p. 41-46, 1993.