

PURIFICAÇÃO DE METABÓLITOS FÚNGICOS COM EFEITOS TÓXICOS SOBRE *Meloidogyne incognita**

GERALDO H. SILVA^{1**}, DENILSON F. OLIVEIRA² & VICENTE P. CAMPOS²

¹Departamento de Química, Universidade Federal de Lavras, e-mail: geraldoh@posgrad.iq.unesp.br; ²Departamento de Química, Universidade Federal de Lavras, e-mail: denilson@ufla.br; ³Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Cx. Postal 37, CEP 37200-000, Lavras, MG

(Aceito para publicação em 18/09/2002)

Autor para correspondência: Denilson F. Oliveira

SILVA, G.H., OLIVEIRA, D.F. & CAMPOS, V.P. Purificação de metabólitos fúngicos com efeitos tóxicos sobre *Meloidogyne incognita*. Fitopatologia Brasileira 27:594-598. 2002.

RESUMO

Objetivando o desenvolvimento de novas metodologias de controle de fitonematóides, este trabalho buscou purificar as substâncias nematicidas produzidas por *Cunninghamella elegans*, *Fusarium* sp., *Paecilomyces lilacinus* e *P. variotii*. Esses fungos foram cultivados em meio líquido Czapek-Dox durante 15 dias, a 25 °C, em agitador orbital. Em seguida, filtraram-se as misturas, o que permitiu a obtenção de soluções que foram concentradas sob vácuo e submetidas à purificação direcionada por testes *in vitro* com *Meloidogyne incognita*. Observou-se que os filtrados de *P. lilacinus* e *P. variotii* perdiam suas atividades nematicidas após a concentração sob vácuo,

sugerindo que as substâncias ativas produzidas por esses fungos são consideravelmente voláteis. Para o filtrado de *Fusarium* sp., observou-se perda total da atividade contra *M. incognita* após fracionamento em coluna de sílica gel, indicando instabilidade da substância nematicida frente às condições empregadas. Do filtrado de *C. elegans* isolou-se uma substância que, em solução aquosa na concentração de 250 ppm, imobilizou 94% dos juvenis do segundo estágio de *M. incognita* expostos a tal solução durante 48 h.

Palavras-chave adicionais: metabólitos fúngicos, nematóide, nematicida.

ABSTRACT

Purification of fungal metabolites with toxic effects on *Meloidogyne incognita*

In a search for new molecules toxic to plant parasitic nematodes, procedures were set up to purify nematode toxic molecules produced by *Cunninghamella elegans*, *Fusarium* sp., *Paecilomyces lilacinus* and *P. variotii*. Those fungi were grown in Czapek-Dox liquid medium during 15 days, at 25 °C, in an orbital shaker. After fungus mycelium removal by filtration, the solutions were concentrated under vacuum and submitted to purification, guided by *in vitro* assays with *Meloidogyne incognita* juveniles. As a result, it was observed that *P. lilacinus*

and *P. variotii* filtrates lost their activity after vacuum concentration, which suggests that the nematocides produced by those fungi are considerably volatile. In the case of *Fusarium* sp. filtrate, the active substance seems to be unstable, as the activity against *M. incognita* juveniles completely disappeared after chromatography in a silica gel column. The *C. elegans* filtrate rendered one isolated substance that immobilized 94% of the *M. incognita* juveniles exposed during 48 h to an aqueous solution of the substance at 250 ppm.

INTRODUÇÃO

Nematóides causam extensos danos a diversas culturas, ocasionando grandes perdas na produção agrícola (Campos, 1992). Conseqüentemente, o controle desses patógenos é vital para a exploração agrícola comercial, o que pode ser feito com o uso de nematicidas sintéticos, resultantes da indústria petroquímica (Campos *et al.*, 1990; Campos, 1997). Essas substâncias podem contaminar águas subterrâneas, intoxicar aplicadores ou deixar resíduos em alimentos, o que fez surgir pesquisas sobre o uso de moléculas menos danosas ao homem

e ao meio ambiente. Uma possível alternativa consiste no emprego de fungos, uma vez que vários desses microrganismos produzem metabólitos tóxicos aos nematóides (Mankau, 1979). Tais substâncias podem afetar a motilidade (Costa, 2000), capacidade de penetração na planta, atração do juvenil pelo hospedeiro, eclosão ou casuar a morte desses fitoparasitas (Kerry *et al.*, 1984), podendo atuar como moléculas nematos-táticas ou nematicidas (Saifullah, 1996; Hallman & Sikora, 1996).

Nas interações entre fungos e nematóides, acredita-se que os metabólitos fúngicos podem ser empregados tanto no ataque quanto na defesa contra fitonematóides (Stadler *et al.*, 1993). No caso dos fungos nematófagos, por exemplo, Barron & Thorn (1987) observaram que vários produzem toxinas que podem estar envolvidas na imobilização e morte

*Parte da Dissertação de Mestrado do primeiro autor. Universidade Federal de Lavras (2001).

**Bolsista do CNPq

dos nematóides. De forma análoga, também já se tem conhecimento de fungos que, para não serem ingeridos por nematóides, protegem as hifas com substâncias tóxicas (Hutchison *et al.*, 1996; Riffle, 1967, 1971). Há, ainda, fungos que aparentemente não interagem diretamente com nematóides fitoparasitas, mas são capazes de produzir substâncias com propriedades nematocidas (Chen *et al.*, 2000). Como exemplo pode-se citar *Fusarium equiseti* (Corda) Sacc. (1886). Nítao *et al.* (1999) cultivaram este fungo em meio líquido e, após filtração do meio, observaram considerável atividade nematocida do líquido obtido em testes com *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood. De forma análoga, Hallman & Sikora (1996) e Costa (2000) obtiveram filtrados de vários isolados de *Fusarium oxysporum* Schlecht tóxicos a nematóides.

Cientes da importância de isolar e identificar metabólitos fúngicos tóxicos a nematóides, Kimura *et al.* (1996) submeteram o filtrado de *Aspergillus melleus* Yukawa às técnicas de partição líquido-líquido e cromatográficas, o que permitiu isolar a aspirona, que é a substância tóxica a *Pratylenchus penetrans* (Cobb, 1917) Filipjev & Schuurmans Stekhoven, 1941 produzida pelo referido fungo. De forma análoga, Quaghebeur *et al.* (1994) isolaram duas substâncias nematocidas do filtrado fúngico de *Cylindrocarpon olidum* Wollenw. (Wollenw.); Kawazu *et al.* (1993) obtiveram as bursaphelocidas A e B do filtrado de um isolado identificado como D1084.

Em decorrência do exposto, em estudo preliminar, vários fungos tiveram os filtrados correspondentes submetidos a testes toxicológicos *in vitro* e *in vivo* com *M. incognita*, o que permitiu observar que aqueles obtidos de *Cunninghamella elegans* Lendner, *Fusarium* sp., *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson e *Paecilomyces variotii* Bainer, eram os mais ativos contra o referido nematóide (Costa, 2000). Com base em tais resultados, o presente trabalho teve por objetivo purificar as substâncias nematocidas produzidas por esses fungos, através de fracionamentos direcionados por testes *in vitro* com *M. incognita*.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção dos filtrados fúngicos

Os fungos *C. elegans*, *Fusarium* sp., *P. lilacinus* e *P. variotii*, previamente isolados e selecionados por Costa (2000), foram repicados para placas de Petri contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar. Após sete dias de incubação a 27 °C, discos de 5 mm de diâmetro dessas culturas foram colocados em frascos de 500 ml, contendo 200 ml de meio líquido Czapek-Dox (0,5 g de KCl, 1 g de KH₂PO₄, 2g de NaNO₃, 30 g de sacarose, 0,01 g de FeSO₄.H₂O e 0,5 g de MgSO₄.7 H₂O por 1000 ml de água destilada), previamente esterilizado a 120 °C por 20 min. Colocaram-se seis discos de cada cultura por frasco, que foi mantido em incubadora a 25 °C, com agitação orbital por 15 dias. Após esse período, a cultura foi filtrada em papel Whatman n° 1, por duas vezes, com o auxílio de uma bomba de vácuo, obtendo-se, assim, as fases líquidas denominadas

filtrados fúngicos. Cerca de 1 l de cada filtrado foi liofilizado e mantido a 4 °C, até ser submetido ao fracionamento.

Fracionamento dos filtrados fúngicos por extração e precipitação

O fracionamento dos filtrados de *C. elegans*, *Fusarium* sp., *P. lilacinus* e *P. variotii* seguiu o esquema mostrado na Figura 1.

Alíquotas das frações combinadas de acetato de etila (AcOEt) e de metanol foram concentradas sob vácuo e dissolvidas em solução de Tween 80 a 1% (g/ml) em água, até volume 4,4 vezes superior ao das alíquotas. As soluções resultantes foram submetidas ao teste *in vitro* com juvenis do segundo estágio (J2) de *M. incognita*.

No caso específico de *C. elegans*, ao se adicionar AcOEt ao filtrado concentrado houve a formação de precipitado (A1), que foi separado por centrifugação. Após a separação de A1, o sobrenadante foi extraído conforme o processo descrito anteriormente (Figura 1). O precipitado A1, um sólido amarelado, foi consecutivamente lavado com clorofórmio, metanol e HCl 2 M. Depois da concentração das frações clorofórmica e metanólica sob vácuo, prepararam-se soluções a 500 ppm (500 µg/ml) em Tween 80 a 1% para os testes *in vitro*. Quanto à fração em HCl 2 M, foi alcalinizada com hidróxido de amônio (NH₄OH) concentrado, dando lugar a formação de um novo precipitado (A2), que foi separado por centrifugação. Após a secagem, foram preparadas soluções a 500 e 250 ppm de A2 em HCl 10⁻⁵ M para os testes *in vitro*.

Fracionamento do extrato em acetato de etila do filtrado de *Fusarium* sp.

O extrato em acetato de etila, obtido a partir de 4 l de filtrado de *Fusarium* sp., foi submetido à cromatografia em coluna com 2 x 20 cm de sílica gel. Os solventes utilizados

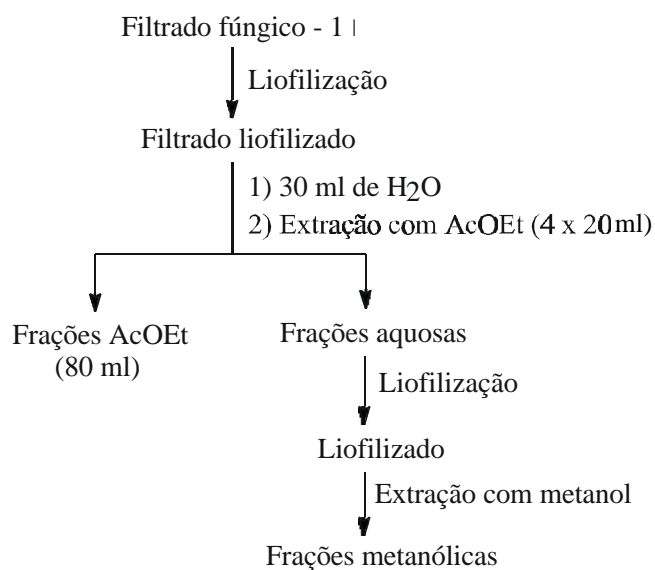


FIG. 1 - Fluxograma da extração dos filtrados fúngicos de *Cunninghamella elegans*, *Fusarium* sp., *Paecilomyces lilacinus* e *P. variotii*.

na eluição das substâncias através da coluna foram hexano, AcOEt e metanol. Coletaram-se 51 frações, que foram combinadas de acordo com o observado por cromatografia em camada delgada. Com isso, ao final havia doze frações: Fs1-Fs12. A fração Fs11 foi submetida a nova cromatografia em coluna com 2 x 20 cm de sílica gel. Os solventes utilizados para eluição foram clorofórmio e metanol com 5% de NH₄OH. Coletaram-se 24 frações que, ao serem combinadas de acordo com os resultados das análises por cromatografia em camada fina, forneceram as frações Fs13-Fs16. Alíquotas das frações foram concentradas sob vácuo para darem origem a resíduos, com os quais se prepararam soluções a 500 ppm em Tween 80 a 1% ou HCl 10⁻⁵ M, para serem submetidas aos testes *in vitro*.

Análise do sólido A2, obtido de *Cunninghamella elegans*

Através de análise por cromatografia em camada fina com sílica gel, empregando-se diclorometano/metanol (1:1) como eluente, verificou-se que havia apenas uma mancha com R_f (distância percorrida pela substância/distância percorrida pelo eluente) igual a 0,47, que foi revelada com ninidrina (Harborne, 1998). Durante a tentativa de observar o ponto de fusão, A2 começou a decompor em 195 °C, antes de fundir. Na análise por espectrometria de infravermelho (Shriner *et al.*, 1983), em pastilha de KBr, obtiveram-se as seguintes bandas: 3330, 1654, 1402, 1082, 1008, 887, 565 e 540 cm⁻¹

Obtenção de ovos de *Meloidogyne incognita*

Ovos de *M. incognita* foram obtidos de raízes de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) (cv. Kada) pela técnica de Hussey & Barker (1973), modificada por Boneti & Ferraz (1981). A suspensão de ovos obtida foi submetida a desinfestação superficial pela técnica de Coolen & D'Herde (1972).

Teste de motilidade e mortalidade de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita* em placa de Petri

Os ovos obtidos foram colocados em câmara de eclosão formada com tela e papel de espessura fina, posicionados em béquer esterilizado, sem aeração, para evitar contaminação. Os J2 obtidos a cada 24 h eram contados até que perfizessem número suficiente para a montagem do experimento. Em placa de Petri de 4,5 cm de diâmetro foi colocado 1 ml de suspensão contendo 100 J2 de *M. incognita* e 5 ml do tratamento. Empregaram-se cinco repetições em delineamento inteiramente casualizado (DIC), sendo testemunhas os veículos aquosos empregados nas solubilizações das amostras. As avaliações de motilidade foram realizadas com 24 e 48 h de exposição do J2 às amostras. Após a última avaliação de motilidade, os J2 foram recolhidos em uma peneira de 0,025 mm e transferidos para água. Foram então, lavados em água corrente até a retirada da amostra e colocados novamente nas placas de Petri. Após 24 h, foi realizada a avaliação de mortalidade. Efetuaram-se todas as contagens em microscópio de objetiva invertida, sendo os números obtidos transformados em percentagem para serem submetidos à análise estatística.

Teste de motilidade de juvenis do segundo estágio (J2) de *M. incognita* em placa Elisa

Os J2 eclodidos foram suspensos em água e a suspensão calibrada para 1.250 J2/ml. Cem microlitros da amostra a ser testada e uma alíquota de 20 µl contendo 25 J2 foram colocados em células de placa Elisa. Realizaram-se cinco repetições, sendo utilizadas como controles as soluções aquosas empregadas na dissolução das amostras. As avaliações consistiram na contagem de J2 móveis e imóveis com o auxílio de microscópio de objetiva invertida. Os dados foram transformados para percentagem e submetidos à análise de variância.

Com as amostras provenientes de *Fusarium* sp., as avaliações foram efetuadas com 24 e 48 h. Para as amostras de *C. elegans*, as avaliações foram realizadas com 24, 36 e 48 h.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente, buscou-se extrair as substâncias ativas contra *M. incognita* através do uso de AcOEt, que é um solvente de polaridade intermediária, com emprego já relatado na purificação de substâncias nematocidas de outros filtrados fúngicos (Kawazu *et al.*, 1993; Quaghebeur *et al.*, 1994; Kimura *et al.*, 1996; Nitao *et al.*, 1999). A exposição de J2 de *M. incognita* ao extrato em AcOEt de *Fusarium* sp. por 24 e 48 h reduziu a motilidade dos J2 a 56% e 5%, respectivamente (Tabela 1). A percentagem de J2 vivos foi de apenas 12%, o que corresponde a um valor 7,2 vezes menor do que o observado para as testemunhas (Tabela 1).

Como ainda julgava-se possível que as frações aquosas contivessem substâncias ativas contra *M. incognita*, foram liofilizadas e lavadas com metanol, que apresenta polaridade mais acentuada do que AcOEt. No entanto, nenhuma das frações metanólicas (Figura 1) mostrou-se ativa (Tabela 1).

No caso específico de *P. lilacinus*, cujo filtrado promoveu até 99% de mortalidade de J2 de *M. incognita* em estudo preliminar (Costa, 2000), o ácido acético já tinha sido caracterizado como a substância responsável por tal atividade (Djian *et al.*, 1991). Como tal substância é relativamente volátil, provavelmente foi perdida durante a etapa de liofilização. Talvez o mesmo tenha ocorrido com *P. variotii*, cujo filtrado também apresentava atividade contra *M. incognita* (Costa, 2000).

Como a fração em AcOEt de *Fusarium* sp. era a única apresentando atividade contra *M. incognita* (Tabela 1), ela foi submetida ao processo de purificação por cromatografia em coluna de sílica gel, utilizada com sucesso no isolamento de substâncias do filtrado fúngico de *F. equiseti* (Nitao *et al.*, 1999). Infelizmente, as frações resultantes não se mostraram diferentes das testemunhas nos testes *in vitro*, indicando que a substância nematocida era instável frente às condições empregadas.

A formação do sólido A1 obtido de *C. elegans* pode ter ocorrido devido à remoção de substâncias surfactantes da fase aquosa pelo solvente acetato de etila. O extrato de A1

TABELA 1- Efeito de extratos fúngicos em metanol e acetato de etila na motilidade e mortalidade de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita*

Tratamento	(% J2 móveis)		(% J2 vivos)
	24 h	48 h	72 h
Extratos em acetato de etila de:			
<i>Cunninghamella elegans</i>	84 b*	83 b*	81 b*
<i>Fusarium</i> sp.	56 a	5 a	12 a
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	94 b	90 b	84 b
<i>P. variotii</i>	96 b	82 b	85 b
Extratos em metanol de:			
<i>C. elegans</i>	91 b	85 b	87 b
<i>Fusarium</i> sp.	90 b	90 b	90 b
<i>P. lilacinus</i>	91 b	77 b	88 b
<i>P. variotii</i>	92 b	78 b	93 b
Testemunhas			
água	93 b	91 b	87 b
Tween 80 a 1%	90 b	87 b	87 b

*Médias seguidas da mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

em metanol reduziu a motilidade de J2 de *M. incognita* a 78% com exposição de 48 h (Tabela 2), demonstrando fraca atividade tóxica. Já o precipitado A2, mesmo em concentração de 250 ppm, reduziu significativamente a motilidade de J2 após 36 h (Tabela 2). Na concentração de 500 ppm a motilidade de J2 foi de apenas 8% em 36 h de exposição e caiu para 1% com 48 h de exposição (Tabela 2).

O sólido A2 foi considerado puro, uma vez que se observou apenas uma mancha quando analisado por cromatografia em camada fina. Buscou-se confirmar o resultado da análise cromatográfica por meio de observação da fusão de A2, já que a amplitude da faixa de temperatura na qual a transição da fase sólida para a líquida ocorre pode indicar o grau de pureza da substância (Shriner *et al.*, 1983). No entanto, isso não foi possível, pois A2 começou a decompor-se antes de fundir-se.

O fato de esse material (A2) ser solúvel em soluções aquosas fortemente ácidas e insolúvel naquelas com pH acima de 5, indica que possui átomos de nitrogênio cujos pares de elétrons não se encontram tão disponíveis como em uma amina simples, que geralmente não precisa de valores de pH tão baixos para ser solubilizada em soluções aquosas (Shriner *et al.*, 1983). A presença de um átomo de nitrogênio é uma proposta amparada na revelação de A2 com ninidrina durante as análises por cromatografia em camada fina, já que isso é o que tende a ocorrer quando a substância analisada possui grupamentos NH₂ (Shriner *et al.*, 1983; Harborne, 1998).

Vale destacar as bandas em 1654 cm⁻¹ no espectro infravermelho, que podem ser provenientes de ligações C = O de grupo amida. Esta hipótese obteve suporte devido à banda em 1.082 cm⁻¹, que pode ser decorrente de ligação C—N. Também se deve mencionar a banda em 565 cm⁻¹, que pode indicar a presença de um átomo de cloro na molécula (Lambert *et al.*, 1998).

TABELA 2 - Efeito das frações obtidas do precipitado A1 do filtrado de *Cunninghamella elegans* na motilidade de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita*

Tratamento	(% de J2 móveis *)		
	24 h	36 h	48 h
Testemunhas			
HCl 10 ⁻⁵ M	94 a	93 c	91 c
Tween 80 a 1%	95 a	92 c	90 c
Água	96 a	95 c	94 c
Frações de <i>C. elegans</i>			
Precipitado A2 500ppm	94 a	8 a	1 a
Precipitado A2 250ppm	93 a	54 b	6 a
Extrato MeOH de A1 a 500ppm	92 a	92 c	78 b
Extrato CHCl ₃ de A1 a 500ppm	93 a	92 c	92 c

*Médias seguidas da mesma letra nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade; MeOH: metanol; CHCl₃: clorofórmio

Ainda é importante relatar que A2 se mostrou insolúvel em metanol, diclorometano, éter etílico, AcOEt, piridina, ácido acético, acetona, clorofórmio e dimetil sulfoxido, o que é uma característica relativamente comum de bases purínicas ou pirimidínicas sem ou com substituintes pequenos (Harborne, 1998).

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro e ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por uma bolsa de Mestrado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARRON, G.L. & THORN, R.G. Destruction of nematodes by species of *Pleurotus*. Canadian Journal of Botany 65:774-778. 1987.
- BONETI, J.I.S. & FERRAZ, S. Modificação do método de Hussey e Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de cafeeiro. Fitopatologia Brasileira 6:553. 1981. (Resumo).
- CAMPOS, V.P. Controle de doenças: Doenças causadas por nematóides In: Vale, F.X.R. & Zambolim, L. (Eds.). Controle de Doenças de Plantas. Volume 1. Viçosa. UFV. 1997. pp. 141-179.
- CAMPOS, V.P. Implicação da sobrevivência dos nematóides em solos e raízes de plantas no controle dos fitopatógenos. Informe Agropecuário 16:15-16. 1992.
- CAMPOS, V.P., SIVAPALAN, P. & GNANAPRAGASAM, N.C. Nematode parasites of coffee, cocoa and tea. In: Luc, M., Sikora, R.A. & Bridge, J. (Eds.). Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture. Wallingford. CABI Publishing, CAB International. 1990. pp.387-430.
- CHEN, S.Y., DICKSON, D.W. & MITCHELL, D.J. Viability of *Heterodera glycines* exposed to fungal filtrates. Journal of Nematology 32:190-197. 2000.
- COOLEN, W.A. & D'HERDE, C.J. A Method for the Quantitative Extraction of Nematodes from Plant Tissue. Ghent. State Agriculture Research Centre. 1972.

- COSTA, M.J.N. Filtrados de culturas fúngicas e esterco animais, com ação antagonista a *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood (Tese de Mestrado). Lavras: Universidade Federal de Lavras. 2000.
- DJIAN, C., PIJAROWSKI, L., PONCHET, M., ARPIN, N. & BONVIN, F.J. Acetic acid: a selective nematocidal metabolite from culture filtrates of *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson and *Trichoderma longibrachiatum* Rifai. *Nematologica* 7:101-112. 1991.
- HALLMAN, J. & SIKORA, R.A. Toxicity of fungal endophyte secondary metabolites to plant parasitic nematodes and soilborne plant pathogenic fungi. *European Journal of Plant Pathology* 102:155-162. 1996.
- HARBORNE, J.B.. *Phytochemical Methods. A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*. 3rd ed. London. Chapman & Hall. 1998.
- HUSSEY, R.S. & BARKER, K.R. A comparison of methods for collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. *Plant Disease Reporter* 57:1025-1028. 1973.
- HUTCHISON, L.J., MADZIA, S.E. & BARRON, G.L. The presence and antifeedant function of toxin producing secretory cells on hyphae of the lawn-inhabiting agaric *Conocybe lactea*. *Canadian Journal of Botany* 74:431-434. 1996.
- KAWAZU, K., MURAKAMI, T., ONO, Y., KANZAKI, H., KOBAYASHI, A., MIKAWA, T. & YOSHIKAWA, N. Isolation and characterization of two novel nematocidal dipeptides from an imperfect fungus, strain D1084. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 5:98-101. 1993.
- KERRY, B.R., SIMONN, A. & ROVIRA, A.D. Observations on the introductions of *Verticillium chlamydosporium* and other parasitic fungi into soil for control of the cereal cyst-nematode *Heterodera avenae*. *Annals of Applied Biology* 105:509-516. 1984.
- KIMURA, Y., NAKAHARA, S. & FUJIKOKA, S. Aspyrone, a nematocidal compound isolated from the fungus *Aspergillus melleus*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 60:1375-1376. 1996.
- LAMBERT, J.B., SHURVELL, H.F., LIGHTNER, D.A. & COOKS, R.G. *Organic Structural Spectroscopy*. New Jersey. Prentice Hall. 1998.
- MANKAU, R. Biocontrol: fungi as nematode control agents. *Journal of Nematology* 12:1- 4. 1979.
- NITAO, J.K., MEYER, S.L.F. & CHITWOOD, D.J. In vitro assays of *Meloidogyne incognita* and *Heterodera glycines* for detection of nematode-antagonistic fungal compounds. *Journal of Nematology* 31:172-183. 1999.
- QUAGHEBEUR, K., COOSEMANS, J., TOPPET, S. & COMPERNOLLE, F. Cannabioci- and 8-Chlorocannabiocichromenic acid as fungal antagonists from *Cylindrocarpom olidum*. *Phytochemistry* 37:159-161. 1994.
- RIFFLE, J.W. Effect of an *Aphelenchoides* species on growth of a mycorrhizal and a pseudomycorrhizal fungus. *Phytopathology* 57:541-544. 1967.
- RIFFLE, J.W. Mycorrhizae. *Proceedings, 1st North American Conference on Mycorrhizae*. USDA Forest Service Misc. Publ. 1189. Washington, D. C. 1971. pp.97-113.
- SAIFULLAH, N. Nematocidal and nematostatic effect of cell-free culture filtrates of *Verticillium chlamydosporium* Goddard *in vitro*. *Afro Asian Journal of Nematology* 6:32-35. 1996.
- SHRINER, R.L., FUSON, R.C., CURTIN, D. Y. & MORRILL, T.C. *Identificação Sistemática dos Compostos Orgânicos*. 6^a. ed. Portland. Book News, Inc. 1983
- STADLER, M., ANKE, H. & STERNER, O. Linoleic-acid. The nematocidal principle of several nematophagous fungi and its production in trap-forming submerged cultures. *Archives of Microbiology* 160:401-405. 1993.