



Universidade de Brasília
Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Agronomia

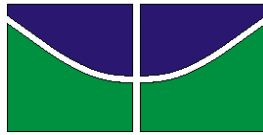
Avaliação da Patogenicidade de Isolados de *Pochonia chlamydosporia* e *Purpureocillium lilacinum* Sobre Ovos de *Meloidogyne enterolobii*.

Silas Dutra Silva

Dissertação de Mestrado em Agronomia

Publicação: 87/2015

**Brasília/DF
Março/2015**



**Universidade de Brasília
Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Agronomia**

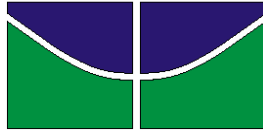
Avaliação da Patogenicidade de Isolados de *Pochonia chlamydosporia* e *Purpureocillium lilacinum* Sobre Ovos de *Meloidogyne enterolobii*.

Silas Dutra Silva

**Orientadora: Pesq. Dra. Rose Gomes Monnerat Sólton de Pontes
Co-Orientadora: Pesq. Dra. Regina Maria Dechechi Guimarães Carneiro**

Dissertação de Mestrado em Agronomia

**Brasília/DF
Março/2015**



Universidade de Brasília
Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Agronomia

Avaliação da Patogenicidade de Isolados de *Pochonia chlamydosporia* e *Purpureocillium lilacinum* Sobre Ovos de *Meloidogyne enterolobii*.

Silas Dutra Silva

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de mestre em Agronomia.

APROVADA POR:

Rose Gomes Monnerat Sólton de Pontes, Ph.D / Embrapa

Carlos Marcelo Silveira Soares, Ph.D / Instituto Mato-Grossense do Algodão

Cleber Furlanetto, Ph.D / Universidade de Brasília

Brasília/DF, 06 de março de 2015.

FICHA CATALOGRÁFICA

Silva, Silas Dutra.

Avaliação da patogenicidade de isolados de *Pochonia chlamydosporia* e *Purpureocillium lilacinum* sobre ovos de *Meloidogyne enterolobii*. / Silas Dutra Silva; orientação de Rose G. M. S. de Pontes. - Brasília, 2015.

Dissertação de Mestrado (M) – Universidade de Brasília / Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2015.

1. Controle Biológico 2. *Pochonia chlamydosporia* 3. *Purpureocillium lilacinum* 4. *Meloidogyne enterolobii*

I. Pontes, R. G. M. S. II. Dra.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

SILVA, S.D. (2015) Avaliação da patogenicidade de isolados de *Pochonia chlamydosporia* e *Purpureocillium lilacinum* sobre ovos de *Meloidogyne enterolobii*. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária. Universidade de Brasília. 108 páginas. Dissertação de Mestrado.

CESSÃO DE DIREITOS

Nome do Autor: SILAS DUTRA SILVA

Título da Monografia de Conclusão de Curso: Avaliação da patogenicidade de isolados de *Pochonia chlamydosporia* e *Purpureocillium lilacinum* sobre ovos de *Meloidogyne enterolobii*.

Grau: Mestre

Ano: 2015.

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta monografia de graduação e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva-se a outros direitos de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem autorização por escrito do autor. Citações são estimuladas, desde que citada à fonte.

Silas Dutra Silva

CPF: 091.221.206-37

End.: Cond. Verde, rua Jatobá, lote 7. SHJB. Brasília/DF. CEP: 71.680-608
(61) 9808-9166 / 8286-9166 / e-mail: sd_silva@hotmail.com

*Dedico a minha família: minha força e
minha inspiração que, com amor,
paciência, confiança e sacrifício,
contribuíram para que eu chegasse até
aqui.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, pelas bênçãos e pelas oportunidades postas em meu caminho.

À minha família pelo amor, exemplo de vida, força e determinação, pela confiança, paciência, incentivo e apoio: meus pais Danusa, Paulo Roberto, João Guilherme e Adriana; e meus avós Ruth, Newton (*in memoriam*), Neusa, Dulcinéia, Luiz Manuel e Fátima.

À minha família em Cristo pelo apoio e orações: Pr. Mazinho, Pr. Weber, Paulo, Cleia, Rebecka, Rudinho, Luana, Pedro, Carolina, Ricardo, Tatiane, Eliel, Vanessa, Fernanda, Lucas, Jonathas, Catarine, Nicolle, Pauline, Anne, Andressa, Fabiana, Jônatas, Filipe, Pedro, Luis Felipe, Isabela, Thalita Neves, Fernanda, Marcel Cintra, Marcel Magalhães, Henrique, Leonardo, Thalita Honorato, Talita Naira, Daniela, Mariane, Dayane, Ana Larissa, Daniel, Bruno, Adriano e demais irmãos da IPJB, FEMOB-DF e MPC.

Aos meus amigos e companheiros pela amizade e apoio: Eduardo, Renan, Renata, Daniela, Saluana, Fernando, Renê, André, Simone, Mayara, Vanessa, Ana Paula, Guilherme, Ariane, Carolina Boechat, Gabriela Emiliana, Dannielle, Juliana, Vanessa; Gabriela, Carla e Cristina.

Ao pesquisador Dr. Rogério Lopes, pelo valioso auxílio, pela confiança, apoio, compreensão, ensinamentos, conselhos e pela contribuição inestimável para minha formação como profissional.

À Dra. Regina Carneiro por ter aceitado ser minha co-orientadora, pela contribuição e apoio notáveis para a realização deste trabalho.

À Dra. Rose Monnerat pelo apoio e auxílio para a realização e conclusão desse trabalho.

A Daniela Aguiar de Souza por tudo: amizade, apoio, confiança, conselhos, risadas, brincadeiras, ajudas, cinemas, ensinamentos e aprendizados.

A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e a seus funcionários por possibilitarem a realização deste trabalho.

À Embrapa Mandioca e Fruticultura pelo envio das mudas para experimento.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida durante os anos do curso.

À Universidade de Brasília (UnB) pelos recursos oferecidos para a concretização deste trabalho.

Aos professores e funcionários da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária e Departamento de Fitopatologia (UnB), pelos preciosos ensinamentos e assistência durante os anos de mestrado.

***“Confiai nele, ó povo, em todo tempo; derramai perante ele o vosso
coração; Deus é o nosso refúgio.”
Salmos 62.8***

SUMÁRIO

RESUMO.....	x
ABSTRACT	xii
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	13
2 REVISÃO LITERÁRIA.....	17
2.1 Nematóide das galhas	17
2.2 Medidas de controle de <i>Meloidogyne</i> spp.....	22
2.3 Taxonomia e ciclo de vida do gênero <i>Pochonia</i>	24
2.4 <i>Pochonia chlamydosporia</i> como agente de biocontrole	26
2.5 Taxonomia e ciclo de vida do gênero <i>Purpureocillium</i>	28
2.6 <i>Purpureocillium lilacinum</i> como agente de biocontrole	29
2.7 Produção e comercialização de <i>Pochonia chlamydosporia</i> e <i>Purpureocillium lilacinum</i>	30
3 OBJETIVO GERAL	33
4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
5 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	34
CAPÍTULO I	50
1 INTRODUÇÃO	50
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	52
2.1 Preparo da suspensão de ovos de <i>Meloidogyne enterolobii</i> e do inóculo dos fungos <i>Pochonia chlamydosporia</i> e <i>Purpureocillium lilacinum</i>	52
2.2 Seleção <i>in vitro</i> de linhagens de <i>Pochonia chlamydosporia</i> e <i>Purpureocillium lilacinum</i> sobre ovos de <i>Meloidogyne enterolobii</i>	56
2.3 Parasitismo de massas de ovos de <i>Meloidogyne enterolobii</i> por linhagens selecionadas de <i>Pochonia chlamydosporia</i> e <i>Purpureocillium lilacinum</i>	57
2.4 Associação em mistura de linhagens selecionadas de <i>Pochonia chlamydosporia</i> e <i>Purpureocillium lilacinum</i> sobre ovos de <i>Meloidogyne enterolobii</i>	58

3 RESULTADOS.....	60
3.1 Seleção <i>in vitro</i> de linhagens de <i>Pochonia chlamydosporia</i> e <i>Purpureocillium lilacinum</i> sobre ovos de <i>Meloidogyne enterolobii</i>	60
3.2 Parasitismo de massas de ovos de <i>Meloidogyne enterolobii</i> por linhagens selecionadas de <i>Pochonia chlamydosporia</i> e <i>Purpureocillium lilacinum</i>	62
3.3 Associação em mistura de linhagens selecionadas de <i>Pochonia chlamydosporia</i> e <i>Purpureocillium lilacinum</i> sobre ovos de <i>Meloidogyne enterolobii</i>	64
4 DISCUSSÃO.....	66
5 CONCLUSÕES.....	70
6 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	71
CAPÍTULO II	77
1 INTRODUÇÃO.....	77
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	80
2.1 Análise do solo.....	80
2.2 Produção de inóculo dos fungos <i>Pochonia chlamydosporia</i> e <i>Purpureocillium lilacinum</i> para bioensaios em casa de vegetação.....	80
2.3 Preparo da suspensão de ovos de <i>Meloidogyne enterolobii</i>	81
2.4 Potencial de controle de <i>M. enterolobii</i> por linhagens pré-selecionadas de <i>P. chlamydosporia</i> e <i>Purpureocillium lilacinum</i> em cultivos de ciclo curto (tomateiro) e longo (bananeira)	81
2.4.1 Cultivo de ciclo curto - Tomate	82
2.4.2 Cultivo de ciclo longo - Bananeira	82
2.5 Efeito de linhagens de <i>P. chlamydosporia</i> e <i>P. lilacinum</i> sobre <i>M. enterolobii</i> em plantas submetidas à alta e baixa infestação do nematóide	83
2.6 Avaliação dos experimentos em casa de vegetação	84
2.6.1 Presença dos fungos nas raízes e colonização de massas de ovos ...	84
2.6.2 Persistência dos fungos no solo	85
2.6.3 Avaliação da população de nematoides	85
3 RESULTADOS.....	86

3.1	Colonização do solo e raízes de tomateiro e bananeira pelos fungos <i>P. chlamydosporia</i> e <i>P. lilacinum</i> em casa de vegetação	86
3.2	Potencial de controle de <i>M. enterolobii</i> por linhagens pré-selecionadas de <i>P. chlamydosporia</i> e <i>Purpureocillium lilacinum</i> em cultivos de ciclo curto (tomateiro) e longo (bananeira)	87
3.2.1	Cultivo de ciclo curto - tomateiro	87
3.2.2	Cultura de ciclo longo - banana	89
3.3	Potencial ovicida de isolados de <i>P. chlamydosporia</i> e <i>P. lilacinum</i> no controle de <i>M. enterolobii</i> em plantas submetidas à alta e baixa infestação	90
4	DISCUSSÃO	92
5	CONCLUSÕES.....	99
6	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	100

RESUMO

Meloidogyne enterolobii vem sendo detectado parasitando goiabeiras e hortaliças. O impacto negativo dos agrotóxicos tem levado ao uso restrito de alguns nematicidas. O potencial de fungos nematófagos vem sendo avaliado como estratégia complementar de controle dessa doença. O objetivo do presente estudo foi avaliar a patogenicidade de isolados de *Pochonia chlamydosporia* e *Purpureocillium lilacinum* (= *Paecilomyces lilacinus*) em ovos de *Meloidogyne enterolobii* em ensaios *in vitro* e em casa de vegetação. Foram avaliados 19 isolados de *P. chlamydosporia* e 17 isolados de *Paecilomyces*-like pertencentes à Coleção de Fungos de Invertebrados (CFI) da Embrapa Cenargen. Foram conduzidos três experimentos em placas de Elisa com o objetivo de: 1) avaliar a ação patogênica dos isolados sobre ovos do nematoide 2) avaliar os quatro melhores isolados de cada gênero quanto a patogenicidade sobre massas de ovos; 3) avaliar os dois melhores isolados de cada gênero quanto a patogenicidade sobre ovos quando aplicados em conjunto. Foram selecionados os isolados: CG1006, CG1044 (*P. chlamydosporia*), CG179 (*P. lilacinum*) e o produto Rizotec® (*P. chlamydosporia*) para avaliação do controle exercido por esses fungos, sobre a reprodução de *M. enterolobii*, em cultura de ciclo curto (tomate) e longo (banana), em condições de casa de vegetação. Na avaliação *in vitro* os isolados CG1006, CG1044, CG1042 e CG1101 (*P. chlamydosporia*) e CG179, CG1038, CG348 e CG959 (*Paecilomyces*-like) proporcionaram reduções superiores a 66%, quando aplicados sobre ovos. Na avaliação sobre massas de ovos, os mesmos apresentaram um resultado inferior. A aplicação em conjunto, não alterou a eclosão dos juvenis de segundo estágio (J2) de *M. enterolobii*. Nos experimentos em casa de vegetação se observou uma alta suscetibilidade da bananeira ao nematoide, embora a cultivar Terra tenha apresentado tolerância ao parasita. O isolado CG1006 proporcionou uma redução de 33% no número de ovos nessa cultura. No experimento com tomateiros, o isolado CG179 apresentou redução de 44,2% no número de ovos no tratamento sob baixa densidade populacional do nematoide; o isolado CG1006 causou uma redução de 33,6%. Não houve controle do nematoide em tomateiros em altas infestações de *M. enterolobii*, em condições de casa de vegetação. Essa pesquisa sugere que os agentes de

controle biológico não podem substituir outros métodos de controle, mas podem ser integrados a outras estratégias de manejo que visem o reestabelecimento do equilíbrio biológico do solo.

Palavras chave: controle biológico, *Meloidogyne enterolobii*, *Pochonia chlamydosporia*, *Purpureocillium lilacinum*.

ABSTRACT

Meloidogyne enterolobii has been detected parasitizing guava and vegetables. The negative impact of pesticides has led to restricted use of some nematicides. The potential of nematophagous fungi has been evaluated as a complementary strategy to control this disease. The aim of this study was to evaluate the pathogenicity of *Pochonia chlamydosporia* and *Purpureocillium lilacinum* (= *Paecilomyces lilacinus*) on *Meloidogyne enterolobii* eggs *in vitro* and in greenhouse conditions. Were evaluated 19 isolates of *P. chlamydosporia* and 17 isolates of *P. lilacinum* belonging to the Fungi Invertebrates Collection (CFI) of Embrapa Genetic Resources and Biotechnology. Three experiments were conducted in Elisa plates in order to: 1) evaluate the pathogenic action of these isolates on nematode eggs; 2) select the best four isolates of each genus for pathogenicity on egg masses; 3) evaluate the best two isolates of each genus for pathogenicity on eggs when applied together. *In vitro* evaluation isolates CG1006, CG1044, CG1042 and CG1101 (*P. chlamydosporia*) and CG179, CG1038, CG348 and CG959 (*P. lilacinum*) provided reductions of more than 66% when applied on eggs. When applied on egg masses, they show a lower result. The application together, did not alter the hatching of second stage juveniles (J2) of *M. enterolobii*. The experiments in greenhouse showed a high susceptibility of banana cv. Terra to *M. enterolobii*, although this plant had shown tolerance to the parasite. The isolated CG1006 provided a 33% of reduction in the number of eggs on this culture. On the experiment with tomato, isolated CG179 decreased 44.2% the number of eggs in the treatment under low nematode; population density; the isolate CG1006 caused a reduction of 33.6%. No control was observed on high infestations of *M. enterolobii* on tomato, under greenhouse conditions. This research suggests that biological control agents cannot replace other methods of control, but can be integrated with other management strategies to re-establish the biological balance of the soil.

Key words: biological control, *Meloidogyne enterolobii*, *Pochonia chlamydosporia*, *Purpureocillium lilacinum*

1 INTRODUÇÃO GERAL

O gênero *Meloidogyne* por sua ampla disseminação e alta capacidade destrutiva, é considerado o grupo de nematoides mais importante na agricultura mundial (Campos *et al.*, 1997). O controle da meloidoginose é dificultado devido principalmente ao grande número de plantas hospedeiras, sendo a maior parte das plantas agricultáveis em geral boas hospedeiras de *Meloidogyne* spp. (Hutchinson *et al.*, 1999). Um fator que tem facilitado a sobrevivência desses nematoides em áreas cultivadas são as plantas daninhas por possibilitarem a sua reprodução, mesmo na ausência das culturas economicamente importantes.. Dentre os representantes do gênero *Meloidogyne*, a espécie *M. enterolobii* [= *M. mayaguensis*] é considerada uma das mais agressivas em comparação com outras espécies encontradas nas regiões tropicais (Brito *et al.*, 2004).

Os danos causados por *M. enterolobii* são bastante severos, levando a morte súbita das plantas de goiaba (Carneiro *et al.*, 2001). Essa espécie foi detectada em áreas nativas de Mata Atlântica no estado do Rio de Janeiro (Lima *et al.*, 2005) e no estado de São Paulo, parasitando porta-enxerto de pimentão e tomateiros resistentes à *Meloidogyne* spp. Esse nematoide vem sendo disseminado entre os produtores através de mudas contaminadas, e representa uma praga agressiva, que parasita plantas com genes de resistência e poderá vir a causar sérios prejuízos a vários cultivos (Carneiro *et al.*, 2006).

Vários métodos de controle vêm sendo testados nos últimos anos, como o uso de nematicidas, genótipos de planta resistentes, pousio e o controle biológico, porém sem resultados satisfatórios até o momento. (El-Borai & Duncan, 2005). O uso de nematicidas químicos é uma das principais formas de controle dos nematoides, entretanto, apesar de apresentar resultados eficientes em algumas culturas, o impacto negativo desses produtos sobre o ambiente e na saúde humana (Roberts, 1993; Hidalgo-Díaz *et al.*, 2000; Bent *et al.*, 2008) têm levado à proibição ou uso restrito de algumas moléculas nematicidas. No caso de *M. enterolobii*, produtos químicos se mostraram ineficientes no seu controle (Cuadra *et al.*, 1999; Moreira & Henriques-Neto, 2001) e, mesmo que

alguma molécula química venha a ser disponibilizada para utilização a campo, o período de carência do produto deve ser observado, em se tratando de plantas de ciclo curto, como as hortaliças.

Considerando a perspectiva de manejo integrado de pragas, que visa à manutenção das populações de pragas em nível de equilíbrio, o controle biológico exerce um importante papel. Dentre os agentes de controle biológico de nematoides parasitas de plantas, destacam-se os fungos parasitas. Os fungos que parasitam ovos são promissores agentes de controle biológico de *Meloidogyne* spp., devido à facilidade de produção *in vitro* e pela possibilidade de algumas espécies colonizarem a rizosfera. Os nematoides formadores de galhas depositam seus ovos em massas envoltas por uma substância gelatinosa de constituição lipoproteica, o que facilita a rápida colonização dos fungos endoparasitas. Esses fungos induzem desordens fisiológicas nos ovos, interrupção no desenvolvimento embriogênico e, em alguns casos, rompimento físico (Dackman et al., 1989). Além disso, são parasitas facultativos, o que facilita a sua multiplicação e sua sobrevivência no solo após a aplicação.

Entre os fungos endoparasitas, destacam-se como agentes de controle biológico de *Meloidogyne* spp.: *Pochonia chlamydosporia* [= *Verticillium chlamydosporium*] (Goddard) Zare & W. Gams e *Purpureocillium lilacinum* [= *Paecilomyces lilacinus*] (Thom) Samson. Ambos os fungos têm sido utilizado no manejo integrado de pragas para o controle de nematoides das galhas em cultivos orgânicos de hortaliças (Hidalgo-Díaz, 2000; Santiago et al., 2006).

Pochonia chlamydosporia é um parasita facultativo de ovos e fêmeas de nematoides sedentários formadores de galhas e de cistos e está associado a solos supressivos a nematoides (Kerry et al., 1993). Ademais, tem a habilidade de crescer endofiticamente nas raízes de plantas sem causar lesões ou afetar negativamente o crescimento das mesmas (Maciá-Vicente et al., 2008; Maciá-Vicente et al., 2009b), o que facilita sua sobrevivência no solo na ausência dos nematoides. Entretanto, esse fungo apresenta variabilidade genética intraespecífica, o que demanda uma seleção de isolados com potencial como agentes de controle biológico (Kerry & Bourne, 2002).

Diversos isolados cubanos de *P. chlamydosporia* foram avaliados para o controle de *M. incognita*. Desses, foi selecionado o isolado CG1044 da variedade *catenulata* como a mais promissora, por ter causado uma redução significativa em infestações de nematoides em sistemas de produção comercial de vegetais em combinação com rotação de culturas (Hidalgo-Díaz, 2000; Hidalgo-Díaz et al., 2000; Atkins et al., 2003a, 2003b). No entanto, *P. chlamydosporia* foi pouco testado em *M. enterolobii*. O isolado CG1003 de *P. c. var chlamydosporia* obtido de massas de ovos de *M. enterolobii* coletadas de galhas de raízes de goiabeira infectadas apresentou bons resultados na redução do número de ovos desse nematoide em casa de vegetação. No entanto, essa redução não foi suficiente para minimizar o número de galhas e os sintomas causados por *M. enterolobii* em plantas de goiaba em casa de vegetação (Carneiro et al., 2011).

Purpureocillium lilacinum caracteriza-se por penetrar nos ovos dos nematoides, destruindo o embrião e pela possibilidade de exercer forte pressão na capacidade reprodutiva das fêmeas que são colonizadas e posteriormente mortas (Dunn et al., 1982). No Brasil, existem registros de *P. lilacinum* em diversos tipos de solo, cultivados ou não, em diversas profundidades (Carneiro, 1986). Seu isolamento pode ser feito a partir de diferentes hospedeiros ou de substratos provenientes de várias localidades (Faria & Tigano, 1996; Sosa-Gomez, 2002). Freitas et al. (1995) compararam a eficiência do parasitismo de isolados de *P. lilacinus* a ovos de *M. javanica* e observaram que alguns isolados apresentaram 100% de parasitismo.

Em tomateiros infectados por *M. javanica*, *P. chlamydosporia* apresentou uma redução no número de ovos de 56 a 61% e o número de galhas de 36 a 47% (Coutinho et al., 2009), e *P. lilacinum* um controle de até 65% do nematoide (Sabet et al., 2013). Esses resultados indicam o potencial de *P. chlamydosporia* e *P. lilacinum* para o controle de *Meloidogyne*, desde que sua aplicação seja conduzida em uma estratégia de manejo integrado, isto é, utilizando o fungo e pelo menos mais um método de controle, tal como rotação de culturas com outras hortaliças que reproduzam menos o nematoide, como é o caso da alface (Arévalo et al., 2012b).

O Brasil produz micopesticidas para o controle de certas pragas agrícolas, no entanto, poucos visam o controle de nematoides. Adicionalmente, a maioria desses produtos biológicos não é formulada conforme as normas internacionais e poucos estão registrados no Brasil, sendo que os não registrados estão sendo vendidos mas não apresentam garantia quanto a qualidade dos produtos comercializados (Faria & Magalhães, 2001). A produção em larga escala de fungos nematófagos, viabilizando o fornecimento de grandes quantidades do microrganismo, é importante para a evolução desse método de controle no país. Muitos programas de controle biológico com fungos no mundo utilizam a estratégia de inundação, na qual o agente de controle deve estar disponível em grandes quantidades. Mesmo para estratégias inoculativas, que ocorrem com determinada periodicidade, a disponibilidade de um produto microbiano para o agricultor nas épocas mais favoráveis à aplicação é imprescindível. A produção *in vitro* pode ser feita por meio de fermentações líquidas, semi-sólidas ou em sistemas bifásicos, que utilizam as fermentações líquida e sólida em diferentes etapas. Avanços nestes parâmetros são essenciais para o desenvolvimento de micopesticidas visando o uso em programas de controle biológico de nematoides.

A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia possui uma Coleção de Fungos de Invertebrados - CFI, estabelecida no Laboratório de Micologia de Invertebrados - LMI, que tem suas atividades voltadas para o isolamento, identificação, caracterização, conservação, realização de intercâmbio de fungos e avaliação de isolados como potenciais agentes de controle biológico de pragas agrícolas e de vetores de doenças. Dentre os isolados presentes podemos encontrar 41 acessos de *Pochonia chlamydosporia* e 17 de *Purpureocillium-like*. O objetivo do trabalho foi avaliar *in vitro* e em casa de vegetação, isolados de *Pochonia chlamydosporia* e *Purpureocillium lilacinum* quanto à eficácia no controle de *Meloidogyne enterolobii*.

2 REVISÃO LITERÁRIA

2.1 Nematóide das galhas

Os nematoides estão entre os mais numerosos grupos de animais no planeta, sendo estimados em um milhão de espécies (Viglierchio, 1991). Muitas espécies de nematoides são importantes para agricultura, umas por causar danos à produção. Outras, de vida livre, por causar um efeito benéfico à mesma. Os nematoides fitoparasitas causam distúrbios do sistema radicular, induzindo a formação de alterações morfológicas e fisiológicas, prejudicando a absorção e translocação de nutrientes e água (Perry et al., 2010).

A quantificação de perdas na produção agrícola no Brasil não é precisa devido principalmente as interações com danos provocados por pragas e outras doenças, condições climáticas adversas, presença de plantas invasoras e inadequação de tratos culturais (Ritzinger & Fancelli, 2006). Os nematoides podem se tornar fator limitante e até chegar a causar perda total em muitas culturas (Tihohod, 1993) como feijão, algodão, soja, café e tomate. Em solos agrícolas, o número dos nematoides pode alcançar vinte milhões por metro quadrado (Barron, 2003). De acordo com Kerry (2000) e Persson & Jansson (1997), os nematoides de plantas são parasitas obrigatórios e estão abundantemente presentes na rizosfera. A identificação de gêneros e espécies de fitonematoides encontrados nos solos tem grande importância para o controle desses patógenos.

Segundo Sasser (1980) um dos maiores obstáculos à produção de alimentos no mundo é o parasitismo por nematoides de galhas (*Meloidogyne* spp.). Eles apresentam ampla distribuição geográfica, com ocorrência registrada em quase todos os países do mundo, possuem uma alta gama de plantas hospedeiras, interagem com fungos, bactérias, vírus e outros nematoides e ainda são de difícil controle.

As espécies de *Meloidogyne* Goeldi, 1887 constituem uma pequena parte do Filo Nematoda, que compreende os parasitas do homem, de animais, de plantas e nematoides de vida livre, encontrados no solo, em água doce e no

mar (Maggenti, 1981). O gênero *Meloidogyne* faz parte da classe Chromadorea, ordem Rhabditida, subordem Tylenchina, Infraordem Tylenchomorpha, Superfamília Tylenchoidea e família Meloidogynidae (De Ley & Blaxter, 2002; Karssen & Moens, 2006). Até junho de 2009, havia 97 espécies válidas pertencentes ao gênero *Meloidogyne* (Hunt & Handoo, 2009).

O ciclo de vida do *Meloidogyne* (Figura 1) se inicia com a deposição de ovos, em um único local da raiz, formando uma massa de ovos envolta por uma matriz gelatinosa. Cada massa de ovos contém de 400 a 500 ovos, normalmente. O desenvolvimento embrionário resulta no juvenil de primeiro estágio (J1) que sofre uma ecdise, ainda no ovo, dando origem ao juvenil de segundo estágio (J2), vermiforme. Nesse estágio, o juvenil móvel infectivo migra através do solo atraído por substâncias que emanam das plantas, penetrando nas raízes da hospedeira (Taylor & Sasser, 1983).

Os J2 movem-se por entre as células dos tecidos da raiz perfurando-as com o estilete, migrando até a zona de alongação, na periferia do cilindro central, estabelecendo-se no parênquima vascular, seu sítio de alimentação e iniciando um complexo relacionamento com a planta (Taylor & Sasser, 1983). Liberam uma secreção esofagiana, que dá origem às chamadas células gigantes (sítio de alimentação), próximo ao cilindro central da raiz. Ocorre então a segunda (J2 > J3), terceira (J3 > J4) e quarta ecdises (J4 > fêmea jovem) (Eisenback & Triantaphyllou, 1991). Logo após a última ecdise, a fêmea jovem já estabelecida, começa a se alimentar e permanece ali por toda a sua vida. A partir desse momento começa a ocorrer a hiperplasia e hipertrofia das células das raízes resultando na formação da galha radicular. Durante esse desenvolvimento pós-embrionário, o sistema reprodutivo se desenvolve e crescem as gônadas funcionais nas fêmeas (Eisenback & Triantaphyllou, 1991).

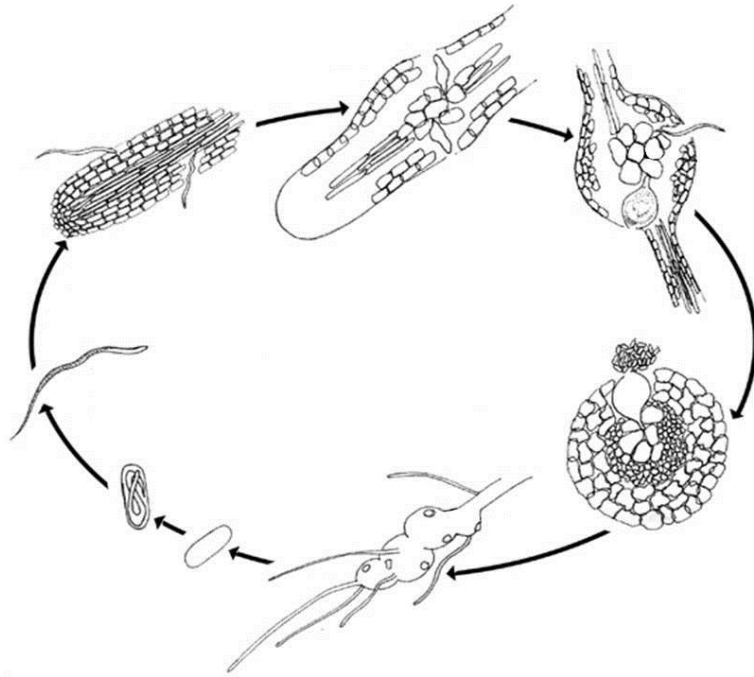


Figura 1. Ciclo de vida do gênero *Meloidogyne*. (Fonte: cortesia V. Breuster)

A mudança de forma nos machos ocorre após a terceira ecdise, durante o quarto estágio juvenil (J4). Nesse período ocorre uma metamorfose na qual o corpo se alonga, fazendo com que o macho adulto mude da forma salsichoide para a vermiforme (Eisenback & Triantaphyllou, 1991). O J4 está envolvido pelas cutículas do segundo e terceiro estádios e, após a última ecdise, o macho emerge inteiramente desenvolvido (Taylor & Sasser, 1983). Os machos adultos não se alimentam e, após a mudança, saem da raiz e movem-se livremente no solo. Nas espécies partenogênicas não há acasalamento, permanecendo os machos no solo até a morte (Eisenback & Triantaphyllou, 1991).

Em condições normais, praticamente todos os adultos formados de *Meloidogyne* spp. são fêmeas. Porém, sob condições ambientais desfavoráveis, como resistência da planta hospedeira ou elevada população de nematoides na raiz, os juvenis que se desenvolveriam em fêmeas, tornam-se machos, pois seu primórdio sexual se desenvolve em testículos em vez de ovários. Tal fenômeno é conhecido por reversão sexual e é um dos mecanismos de sobrevivência desses nematoides, uma vez que um menor

número de ovos será produzido e o parasitismo sobre a planta infectada será mais brando, garantindo a sobrevivência das fêmeas já formadas (Freitas et al., 2006).

O ciclo de vida do nematoide das galhas é muito dependente da temperatura, umidade e planta hospedeira. As fêmeas produzem ovos por três semanas, depois cessam a produção, podendo viver por mais um tempo naquele local. Os J2 podem viver de poucos dias a meses e os machos adultos vivem até semanas (Taylor & Sasser, 1983).

Dentre os representantes do gênero *Meloidogyne*, a espécie *M. enterolobii* é considerada a mais agressiva em comparação com outras espécies encontradas nas regiões tropicais (Brito et al., 2004). Essa espécie foi descrita por Yang & Eisenback (1983) a partir de uma população encontrada em raízes de *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong, na China. De acordo com os mesmos autores, algodão, fumo 'NC 95', pimentão, melão e tomate são boas hospedeiras de *M. enterolobii*.

Meloidogyne enterolobii é uma espécie polífaga, além da goiabeira parasita culturas olerícolas, plantas ornamentais, fumo, soja, café, mamão, acerola e araçá (Maranhão et al., 2001; Lima et al., 2003; Carneiro, 2003, Brito et al., 2007, Almeida & Santos, 2011). Essa espécie foi detectada em áreas nativas de Mata Atlântica no estado do Rio de Janeiro, (Lima et al., 2005), sugerindo-se que esse nematoide não tenha sido introduzido no Brasil, como havia sido cogitado por ocasião de sua detecção (Carneiro et al., 2001). Populações de *M. enterolobii* têm atacado plantas resistentes a outras espécies de *Meloidogyne*, como o tomate com o gene *Mi-1* (Cantu et al., 2009; Kiewnick et al., 2009), a soja cv. Forest, e a batata doce cv. CDH no Oeste da África (Prot, 1984).

Almeida & Santos (2011) registraram a primeira ocorrência do nematóide em produção de goiaba na região do Triângulo Mineiro, mostrando o aumento de áreas com a presença da praga. *M. enterolobii* também foi encontrado em espécies consideradas plantas invasoras no município de São João da Barra (RJ), como fedegoso (*Senna* spp.), urtiga (*Cnidocolus urens*) e maracujá-do-

mato (*Passiflora mucronata*) (Lima et al., 2003). Segundo Brito et al. (2007), *M. enterolobii* foi detectado em diversas espécies vegetais nos Estados Unidos, incluindo algumas hortaliças.

Dentre as hortaliças, o tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) é uma das culturas mais cultivadas e tem os fitonematoides como um de seus principais patógenos do sistema radicular, sendo o gênero *Meloidogyne* o mais importante, devido às complexas interações com seus hospedeiros. No mecanismo de resistência ligado ao gene *Mi*, os nematoides penetram as raízes e migram em direção ao cilindro vascular de maneira semelhante em plantas resistentes e suscetíveis. Entretanto, em plantas resistentes, não ocorre o desenvolvimento do sítio de alimentação. Ao invés disso, de acordo com Dropkin (1969) e Ho et al. (1992), se desenvolve uma região pontual de células necróticas, também chamada de reação de hipersensibilidade (RH). Apesar de cultivares apresentarem essa resistência, populações de *M. enterolobii* já possuem a capacidade de infectar raízes de tomate com o gene *Mi* (Cantu et al., 2009; Kiewnick et al., 2009).

A bananeira (*Musa* spp.) é uma das principais fruteiras em exploração no Brasil, correspondentes a 16,5% do volume das frutas (IBGE, 2010). A principal região produtora é o Nordeste alcançando 34% da produção nacional (Gonçalves et al., 2012). Atualmente estão descritos na literatura 26 gêneros e 70 espécies de nematoides que parasitam frutíferas (Campos, 2002). As bananeiras produtoras de frutos comestíveis são plantas monocotiledôneas pertencentes a ordem Scitaminales, família Musaceae, subfamília Musoideae e gênero *Musa*, constituído por quatro séries ou seções: *Australimusa*, *Callimusa*, *Rhodochlamys* e *Eumusa* (Simmond, 1973).

A seção *Eumusa* apresenta a maior dispersão geográfica e inclui 11 espécies conhecidas (Tezenas & Montcell, 1988). Teoricamente, todas as bananeiras comestíveis cultivadas são originárias de espécies pertencentes a essa seção e a grande maioria das cultivares é resultante do cruzamento entre duas espécies: *Musa acuminata* e *Musa balbisiana* (INIBAP, 2004). Ao longo de suas fases de crescimento e produção, a bananeira e seus frutos são

afetados por problemas fitossanitários sérios, entre os quais se destacam os nematoides.

Os danos causados por fitonematoides em cultivos de bananeira são diretamente proporcionais ao aumento de suas populações (Costa *et al.*, 1998). As estimativas de perdas em *Musa* spp. causadas por *Meloidogyne* spp. estão em torno de 8% (Costa, 2000). Diversas espécies de fitonematoides têm sido identificadas associadas às raízes e ao solo da rizosfera de plantas de bananeira: *Radopholus similis*, *Helicotylenchus multicinctus*, *Pratylenchus coffeae* e *Meloidogyne* spp. (Bridge *et al.*, 1997; Collingborn & Gowen, 1997; Boas *et al.*, 2002; Jesus & Wilcken, 2010). Segundo Cofcewicz *et al.* (2004), entre as espécies do gênero *Meloidogyne*, *Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood e *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood são as mais frequentes em regiões brasileiras produtoras de banana. Em um levantamento realizado em bananais do Paraná, Pereira *et al.* (2006) constataram que em 59% das amostras foram observados nematoides do gênero *Meloidogyne*.

2.2 Medidas de controle de *Meloidogyne* spp.

O controle do gênero *Meloidogyne* é muito dispendioso, principalmente devido ao fato da erradicação ser praticamente impossível. Deve ser planejado com a integração de vários métodos e apresentar baixo custo, sendo recomendados, com frequência, a rotação de culturas, o uso de genótipos resistentes e o controle químico e biológico (Almeida *et al.* 2005). Porém, as medidas de controle mais eficientes são a rotação/sucessão com culturas não hospedeiras ou más hospedeiras e a utilização de cultivares resistentes. A rotação de culturas deve ser bem planejada, uma vez que a maioria das espécies cultivadas permite a multiplicação dos nematoides de galhas.

O plantio de mudas certificadas isentas de *Meloidogyne* spp., é a medida de controle mais importante. A utilização de porta-enxertos resistentes ou tolerantes é uma alternativa barata que pode ser adotada pelo agricultor quando detectada a presença do nematoide no local de plantio. A remoção de plantas daninhas da área também é de grande importância por atuarem como

hospedeiras alternativas para os nematoides, além de competir por água, nutrientes e luz com a cultura plantada.

O controle químico de nematoides através do uso de nematicidas (Terbufos, Carbofuran, Aldicarb) apresenta resultados rápidos, mas em muitos casos é antieconômico, pouco eficiente, podem causar sérios problemas à saúde humana e contaminar o meio ambiente (Roberts, 1993; Hidalgo-Díaz et al., 2000; Verdejo-Lucas et al., 2003; Pires et al., 2005; Barela & Christoffoleti, 2006; Bent et al., 2008). Além de poder causar o desenvolvimento de resistência aos agrotóxicos quando aplicados com frequência (Huang et al., 2004), favorecendo a rápida evolução de resistência em populações da praga.

Dentre todos os métodos de controle, considerando a perspectiva de manejo integrado de pragas na agricultura, que visa à manutenção do equilíbrio dos níveis populacionais de pragas, o controle biológico pode exercer um papel importante (Ferraz & Santos, 1995). No caso da meloidoginose podemos encontrar vários agentes biológicos que são utilizados para controlar a praga, como ácaros de solos, nematoides predadores (*Seinura* sp.), bactérias (*Pasteuria penetrans*, *Bacillus thuringiensis* e *B. megaterium*), fungos formadores de armadilhas (*Arthrobotrys* spp., *Monacrosporium* spp., *Duddingtonia* spp., *Nematoctonus* spp. e *Tolypocladium* (= *Verticillium*) *balanoides*) e fungos parasitas (*P. chlamydosporia*, *P. lilacinum* [= *Paecilomyces lilacinus*] e *Trichoderma* sp.).

Dos microrganismos que atuam no controle de nematoides, os fungos são particularmente atrativos e tem mostrado algum potencial de controle. Eles apresentam estratégias sofisticadas para infectar ou capturar os nematoides, podendo ser divididos em: predadores, endoparasitas, oportunistas (parasitas de ovos e fêmeas sedentárias) e produtores de metabólitos tóxicos aos nematoides (Stirling, 1991). Dentre eles, os parasitas de ovos são os que apresentam uma maior perspectiva de utilização por sua facilidade de produção *in vitro* e capacidade de algumas espécies de colonizar a rizosfera sem causar prejuízos à planta (López-Llorca et al., 2002). Também pela presença da matriz gelatinosa que envolve os ovos dos nematoides formadores de galhas, que facilita a rápida colonização do fungo (Carneiro, 1992).

Dentre os fungos predadores que capturam e matam nematoides no solo, *Arthrobotrys* é um dos gêneros mais importante e mais promissor (Barron, 2003). A ação predadora é estimulada pela presença de nematoides ou substâncias derivadas deles (Araújo, 2001) e tem sido considerado um fungo saprofítico, podendo crescer em substratos disponíveis do solo, diferentemente dos fungos essencialmente parasitas (Persmark et al., 1996).

Espécies de *Trichoderma*, fungo de vida livre, são comumente encontrados no solo e rizosfera. São oportunistas e exercem uma simbiose com a planta (Sharon et al., 2007). Avaliações vêm sendo feitas usando esse fungo como agente de biocontrole de nematoides fitoparasitas (Windham et al., 1989; Reddy et al., 1996; Rao et al., 1998; Abd-Elgawadi & Kabeil, 2012; Freitas et al., 2012). A aplicação de *Trichoderma* spp. no pré-plantio pode reduzir significativamente a densidade de J2 nas raízes e no solo, a produção de ovos e a formação de galhas radiculares. Além de apresentar uma alta colonização das raízes até mesmo em solos arenosos, onde o controle por pesticidas sintéticos não é tão efetivo (Affokpon et al., 2011).

Fungos dos gêneros *Fusarium* (Gao et al., 2008), *Cylindrocarpon*, *Phoma* e *Gliocladium* podem ser encontrados parasitando ovos e fêmeas de nematoides fitoparasitas e se desenvolvem saprofiticamente (Siddiqui & Mahmood, 1995). Porém, dentre os fungos endoparasitas, as espécies mais conhecidas são pertencentes aos gêneros *Pochonia* e *Purpureocillium*.

2.3 Taxonomia e ciclo de vida do gênero *Pochonia*

As espécies do gênero *Pochonia* constituem uma pequena parte do filo Ascomycota, que compreende o maior filo do reino Fungi com mais de 64.000 espécies. O gênero *Pochonia* faz parte da classe Sordariomycetes, ordem Hypocreales e família Clavicipitaceae (Zare et al., 2001).

Pochonia é um fungo na fase anamórfica que se reproduz através de duas estruturas, os conídios e os clamidósporos. Conídios são estruturas unicelulares responsáveis pela rápida disseminação do fungo, enquanto que os clamidósporos são esporos multicelulares, de parede espessa, constituídos de

reserva nutritiva que tem como principal função a sobrevivência; ambos são formados assexuadamente. Os clamidósporos são o tipo de propágulo mais efetivo para o estabelecimento do fungo no solo e na rizosfera, pois não requerem nutrientes adicionais (Bourne & Kerry, 1999) e, por possuir a parede celular mais rígida, o clamidósporo tem maior resistência, assegurando a persistência do fungo no solo.

De acordo com Gams (1971, 1988) e revisado por Zare *et al.* (2001), as 6 espécies encontradas dentro do gênero *Pochonia* são: *P. bulbillosa*, *P. chlamydosporia*, *P. gonioides*, *P. microbactrospora*, *P. rubescens* e *P. suchlasporia*. As espécies *P. suchlasporia* e *P. chlamydosporia* possuem duas variedades cada: *suchlasporia* e *catenata*; *chlamydosporia* e *catenulata*, respectivamente. Zare *et al.* (2001) consideraram que observar o arranjo dos conídios (em cadeia ou massa mucilaginosa) é suficiente para distinguir isolados das variedades de *P. chlamydosporia* e que os conídios de *P. c.* var. *catenulata* são mais arredondados que os da var. *chlamydosporia*, que são mais elipsoidais (Figura 2). As variedades de *P. suchlasporia* só podem ser diferenciadas molecularmente.

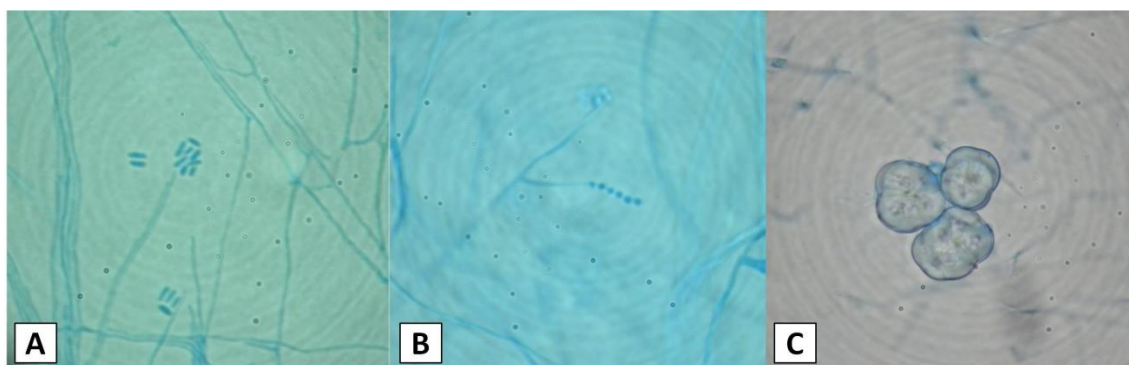


Figura 2. *Pochonia chlamydosporia*: A) *P.c.* var *chlamydosporia* - conídios com formato elipsoidal e formação em cabeça; B) *P.c.* var *catenulata* - conídios com formato arredondado e formação em cadeia; C) clamidósporos.

Pochonia chlamydosporia é uma espécie com grande importância na agricultura. Por ser um parasita facultativo de ovos e fêmeas de nematoides sedentários formadores de galhas e cistos (Atkins *et al.*, 2003b), o fungo vem

sendo associado a solos supressivos a nematoides (Kerry et al., 1993) e se mostrando eficiente no controle de *Meloidogyne* spp. (Hernández & Hidalgo-Díaz, 2008). Esse fungo apresenta capacidade de solubilização de fosfato (Gomezjurado, 2011), pode colonizar saprofiticamente a rizosfera sem causar lesões ou afetar o desenvolvimento da planta (De Leij & Kerry, 1991), características que facilitam sua sobrevivência no solo na ausência de nematoides. Mas, apesar do fungo não necessitar do hospedeiro para se desenvolver, Puertas & Hidalgo-Díaz (2007) observaram que *Pochonia* alcança uma maior colonização da rizosfera quando há a presença de nematoides na raiz.

2.4 *Pochonia chlamydosporia* como agente de biocontrole

Desde a primeira confirmação do parasitismo de *P. chlamydosporia* sobre nematoides fitoparasitas (Willcox & Tribe, 1974; Kerry, 1975) estudos vem sendo realizados para avaliar o seu potencial como agente de controle da praga (De Leij & Kerry, 1991; Sankaranaryanan et al., 2000; Atkins et al., 2003b; Montes de Oca et al., 2005; Tzortzakakis, 2007; Carneiro et al., 2011; Arévalo et al., 2012a; Arévalo et al., 2012b). *P. chlamydosporia* induz desordens fisiológicas nos ovos, interrupção no desenvolvimento embriogênico e, em alguns casos, rompimento físico (Dackman et al., 1989).

Jacobs et al. (2003) avaliaram o crescimento de isolados dos fungos *P. lilacinum*, *Plectosphaerella cucumerina* e *P. chlamydosporia* em meios sólidos com os tratamentos contendo, separadamente, nematicida (Oxamil) e fungicidas (Pencycuron, Fenpiclonil e Tolclofos-methyl) utilizados para controle de *Rhizoctonia solani*, *Chaetomium globosum*, *Fusarium oxysporum* e *Penicillium bilaii*; e observou-se que *P. chlamydosporia* foi o isolado menos afetado tendo um desenvolvimento parecido em todos os tratamentos, incluindo a testemunha. Característica favorável para o fungo, pois permite que o agricultor trabalhe em consórcio com outras medidas de controle, sejam elas para patógenos ou pragas.

Experimentos feitos com *P. chlamydosporia*, na cultura de tomate, mostraram que o fungo controlou de forma efetiva *Meloidogyne* sp., reduzindo

o número de ovos entre 56 e 61% e o número de galhas entre 36 e 47% (Coutinho et al., 2009). Viggiano et al. (2012) observaram que na produção de mudas de alface (*Lactuca sativa* L.), a utilização de arroz colonizado por *P. chlamydosporia* proporciona um maior desenvolvimento das plantas após o transplante quando comparado as mudas transplantadas sem o fungo.

Santos et al. (2012) avaliaram *in vitro* o crescimento colonial e a ação ovicida de isolados de *P. chlamydosporia* sob estresse hídrico, alterando o potencial osmótico do meio. Os autores observaram que os isolados tiveram um menor desenvolvimento micelial durante o estresse, mas, ao entrar em contato com ovos de *Globodera rostochiensis*, alguns isolados apresentaram uma maior capacidade de infecção. Propágulos do microrganismo permaneceram viáveis por períodos prolongados de estresse, o que sugere que os mecanismos de osmorregulação do fungo, utilizados para compensar o estresse hídrico, afetaram a esporulação e aumentou patogenicidade.

Embora existam inúmeros trabalhos estudando o controle biológico de nematoides, a grande maioria tem sido baseada no uso de um único antagonista (Siddiqui & Shaukat, 2002). Porém, é provável que em muitos casos onde ocorre um controle biológico natural, tal evento seja resultado da ação de mais de uma antagonista, muito mais do que a alta população de apenas um deles (Siddiqui & Shaukat, 2002; 2003). No entanto, deve-se conhecer previamente se estes organismos podem ser aplicados conjuntamente, pois um fungo poderia inibir o crescimento do outro.

Ferreira et al. (2008) avaliaram o parasitismo de *P. chlamydosporia* e *Trichoderma* spp. sob ovos de *M. exigua* *in vitro*. Os melhores isolados apresentaram um parasitismo de 68,8% e 53,3%, respectivamente. Após análise, o melhor de cada gênero foi submetido à análise de compatibilidade: confrontação direta, antibiose, interação entre hifas e efeito de metabólitos voláteis. O teste de metabólitos voláteis apresentou uma redução no desenvolvimento de *P. chlamydosporia* por *Trichoderma* sp., nos demais testes não se observou nenhum efeito no crescimento dos isolados.

2.5 Taxonomia e ciclo de vida do gênero *Purpureocillium*

Purpureocillium é um fungo na fase anamórfica antes pertencente ao gênero *Paecilomyces* (Thom.) Samson (1974) e constitui uma pequena parte do filo Ascomycota. Sung et al., 2007 fizeram uma reclassificação do gênero *Paecilomyces*, conservando classe (Eurotiomycetes) e ordem (Hypocreales) porém, o dividindo em três famílias (Ophiocordycipitaceae, Clavicipitaceae e Cordycipitaceae) e dois gêneros (*Paecilomyces* e *Isaria*). Com a reclassificação, as espécies foram identificadas nas seguintes famílias: Ophiocordycipitaceae - *P. lilacinus*; Clavicipitaceae - *P. carneus* e *P. marquandii*; e Cordycipitaceae - *Isaria amoenosa*, *I. cateniannulata*, *I. cateniobliqua*, *I. cicadae*, *I. coleopterora*, *I. farinosa*, *I. fumosorosea*, *I. ghanensis* e *I. tenuipes*. Em 2011, foi feita uma nova classificação da espécie *Paecilomyces lilacinus* e, de acordo com Luangsa-ard et al., 2011 a espécie passa a ser *Purpureocillium lilacinum* (Figura 3).

Purpureocillium lilacinum, é um fungo altamente adaptável quanto a sua estratégia de sobrevivência, dependendo da disponibilidade de nutrientes, pode ter ação entomopatogênica, micoparásita, saprófita ou nematófaga. Assim como *P. chlamydosporia*, é um parasita facultativo de ovos.

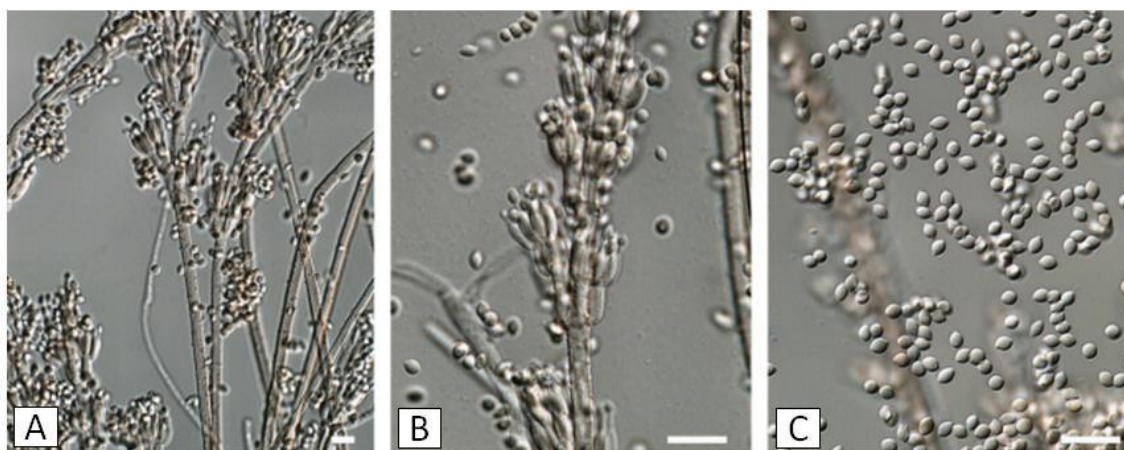


Figura 3. *Purpureocillium lilacinum*: A e B) conidióforos característicos; C) conídios fusiformes típicos. Escala = 10 µm. (Fonte: Luangsa-ard et al., 2011)

2.6 *Purpureocillium lilacinum* como agente de biocontrole

Inicialmente, *P. lilacinum* foi isolado de ovos de *Meloidogyne incognita* no Peru (Jatala et al., 1979) e mais tarde foi relatado colonizando *Meloidogyne* spp. e *Heterodera* spp. em outras partes do mundo (Dackman et al., 1985; Stirlin et al., 1991). Esse fungo possui ótimos atributos como agente de biocontrole de nematoides (Adiko, 1984; Jatala, 1986), a espécie parasita ovos de *Meloidogyne* spp. (Godoy et al., 1983) e também pode parasitar fêmeas jovens do nematoide de galhas e fêmeas de nematoides dos cistos (Gintis et al., 1983; Jatala, 1986), podendo exercer forte pressão na sua capacidade reprodutiva devido a infecção e, posteriormente, morte (Dunn et al., 1982).

Santiago et al. (2006) avaliaram a ação de *P. lilacinum* no controle de *Meloidogyne paranaensis* em tomateiro e foi observada uma variação entre 54,98 e 99,93% na redução do número de ovos em comparação com a testemunha. Sabet et al. (2013) avaliaram essa mesma espécie sobre ovos de *Meloidogyne javanica* e observaram um controle de até 65%. Esses estudos mostram o alto potencial desse fungo para a redução da população de nematoide em hortaliças.

Além da ação sobre *Meloidogyne*, *P. lilacinum* vem apresentando capacidade para controlar outros nematoides. Walters & Barker (1994) constataram que *P. lilacinum* reduziu populações de *Rotylenchulus reniformis* em 36% em casa de vegetação e 59% em ensaios com tomateiro e Liu et al. (2009) avaliaram *in vitro* a ação de metabólitos de isolados de *P. lilacinum* sobre *Bursaphelenchus xylophilus* e *Panagrellus redivivus* em diferentes fontes de nutrientes e, após 24 horas, alguns isolados apresentaram uma ação nematicida superior a 90% e 95%, respectivamente.

Carvalho et al. (2010) avaliaram *in vitro* a ação de isolados de *Purpureocillium lilacinum* e *Pochonia chlamydosporia* sobre ovos de *Toxocara canis*. O experimento foi realizado em placas de Petri e avaliado em diferentes períodos após inoculação dos ovos com as linhagens fúngicas. Foram observados três efeitos diferentes do fungo sobre os ovos e constatado que todas as linhagens ocasionaram alterações morfológicas no embrião e cório de

ovo, com penetração de hifas e colonização interna (Figura 4C). Posteriormente, Araújo et al. (2012) utilizou a melhor linhagem de *P. chlamydosporia* selecionada por Carvalho et al. (2010) e realizaram experimentos *in vivo*, onde se testou a ação do fungo sobre ovos *T. canis* após passar pelo sistema digestório de cachorros que continham o nematoide. O isolado se mostrou como uma possível ferramenta no controle biológico apresentando 37,2% de controle de ovos.

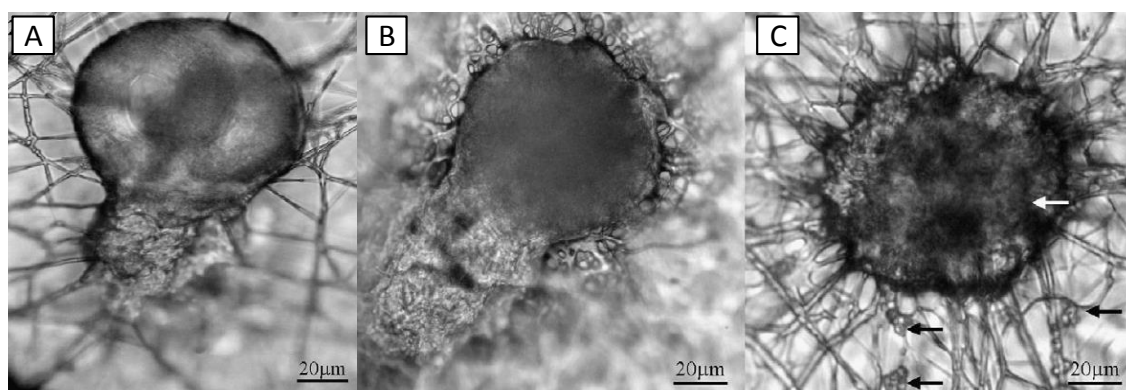


Figura 4. Ovos de *Toxocara canis* colonizados por *Pochonia chlamydosporia* e *Purpureocillium lilacinum* (= *Paecilomyces lilacinus*). A) Ovo rompido pela ação física de *P. chlamydosporia*; B) ovo rompido pela ação física de *P. lilacinum*; C) ovo colonizado por *P. chlamydosporia* (seta branca) e a presença de clamidósporos (setas pretas). (figura retirada de Carvalho et al., 2010)

2.7 Produção e comercialização de *Pochonia chlamydosporia* e *Purpureocillium lilacinum*

Alguns fungos nematófagos são grandemente influenciados por componentes do substrato de crescimento e condições de cultura (Sankaranaryanan et al., 2001; Peteira et al., 2005; Esteves et al., 2009b). A taxa de crescimento e a capacidade de esporulação desses fungos em meios artificiais são características importantes para avaliá-los como agentes de controle biológico, especialmente quando os esporos são o ingrediente ativo do produto microbiano. Para se utilizar fungo de forma comercial, é necessária uma produção em larga escala e para isso, deve-se utilizar um meio de cultivo que compense a produção. Dallemole-Giaretta et al. (2011) avaliaram

diferentes fatores para produção *in vitro* de clamidósporos de *P. chlamydosporia* e observaram que o melhor meio de cultivo para produção, dentre os avaliados, é o substrato contendo grãos de arroz.

Hoje já existem produtos comerciais a base de *P. chlamydosporia* e *P. lilacinum*. O KlamiC[®] (Hernández & Hidalgo-Díaz, 2008), desenvolvido em Cuba, é um bionematicida produzido através de uma fermentação bifásica onde o ingrediente ativo são clamidósporos de *P. chlamydosporia* var. *catenulata*. O tempo médio necessário para produção é de 21 dias. Outro exemplo é o Rizotec[®] (desenvolvido em Viçosa/MG), o produto é composto basicamente por clamidósporos de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* e está em fase de liberação para comercialização. Produtos comerciais à base de *P. lilacinum* estão sendo muito utilizados: MeloCon[®] WG, para o manejo de nematoides em culturas hortícolas e NemOut[®] WP para produção agrícola (Crow, 2013), comercializados nos Estados Unidos; Biostat[®] WP, indicado para o tratamento de semente e comercializado no México pela Bayer; Myco-Nema[®] WG, comercializado na Espanha, o produto é indicado para as culturas de berinjela, batata e tomate. No Brasil, o Nemat[®] foi o primeiro nematicida microbiológico a base de *P. lilacinum* registrado (e o único até o momento). O produto foi desenvolvido pela Ballagro Agro Tecnologia sendo uma formulação em pó molhável e indicado para cultivos hortícolas (alface) (Agrofit, 2015).

Nos últimos anos se tem favorecido o uso de pesticidas biológicos para o controle de pragas, essa ação se tornou um componente importante dos sistemas ambientalmente amigáveis por apresentarem baixo impacto ambiental (Glare et al.; 2012). Em 2009 os biopesticidas representaram 3,5% (1,6 bilhões de dólares) do mercado global de pesticidas (Lehr, 2010). Essa parcela pequena, mas significativa do mercado é tomada principalmente por produtos para o controle de insetos, mas há também fungicidas microbianos, herbicidas e nematicidas.

O mercado de bionematicidas esta crescendo, porém, o efeito dos fungos nematófagos sobre organismos não-alvo tem sido pouco estudado (Wang et al., 2001). Apesar de *P. lilacinum* ser um fungo que apresente bons resultados no controle de nematoides, este vem sendo relatado como patógeno

humano (Takayasu et al., 1977; Luangsa-ard et al., 2011). O fungo aparenta agir de forma oportunista e geralmente não mostra uma patogenicidade severa (Cabanillas & Barker, 1989), mas *P. lilacinum* é um patógeno incomum, pode produzir infecções graves em pacientes imunodeprimidos e a incidência de infecções em hospedeiros imunocompetentes está aumentando (Carey et al., 2003). Nesse caso, *P. chlamydosporia* se apresenta como uma opção mais segura, García et al. (2004) fizeram testes toxicológicos e o fungo foi classificado como não irritante, apresentando índice zero para irritação ocular.

3 OBJETIVO GERAL

Caracterizar isolados de *Pochonia chlamydosporia* e *Purpureocillium lilacinum* (*Paecilomyces*-like) presentes na CFI quanto a sua patogenicidade a ovos de *Meloidogyne enterolobii* em condições *in vitro* e em casa de vegetação.

4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Capítulo I - Seleção *in vitro* de isolados de *Pochonia chlamydosporia* e *Purpureocillium lilacinum* patogênicos a ovos de *Meloidogyne enterolobii*.

- Avaliar *in vitro* a patogenicidade de isolados de *P. chlamydosporia* e *P. lilacinum*, individualmente e em conjunto, sobre ovos e massas de ovos de *Meloidogyne enterolobii*.

Capítulo II - Avaliação de isolados de *Pochonia chlamydosporia* e *Purpureocillium lilacinum* selecionados *in vitro* para o controle de *Meloidogyne enterolobii* em cultivos de ciclo curto e longo.

- Avaliar isolados de *P. chlamydosporia* e *P. lilacinum* quanto à capacidade de controlar *M. enterolobii* em cultivos de ciclo curto e longo, comparando-os com um produto comercial.
- Avaliar isolados de *P. chlamydosporia* e *P. lilacinum* quanto à capacidade de controlar *M. enterolobii* em cultivo de tomate sob alta e baixa infestação do nematoide.

5 REFERÊNCIA BIBLIOGRAFICA

- ABD-ELGAWADI, M. M. M. & KABEIL, S. S. A. 2012. Biological controle of *Meloidogyne incognita* by *Trichoderma harzianum* and *Serratia marcescens* and their related enzymatic changes it tomato roots. **African Journal of Biotechnology**. 11(96):16248-16252.
- ADIKO, A. 1984. Biological control of *Meloidogyne incognita* with *Paecilomyces lilacinus*. **M.S. thesis**. North Carolina State University, Raleigh.
- AFFOKPON, A.; COYNE, D. L.; HTAY, C. C.; AGBÈDÈ, R. D.; LAWOUIN, L. & COOSEMANS, J. 2011. Biocontrol potential of native *Trichoderma* isolates against root-knot nematodes in West African vegetable production systems. **Soil Biology & Biochemistry**. 43:600-608.
- ALMEIDA, A. M. R.; FERREIRA, L. P.; YORINORI, J. T.; SILVA, J. F. V.; HENNING, A. A.; GODOY, C. V.; COSTAMILAN, L. M. & MEYER, M. C. 2005. Doenças da soja (*Glycine max*). In: Kimati, H.; Amorim, L.; Rezende, J. A. M.; Bergamim Filho, A. & Camargo, L. E. A. (Eds.) Manual de Fitopatologia. Vol. 2. Doenças das plantas cultivadas. 4^a ed. Ceres. Piracicaba-SP. pp. 569-588
- ALMEIDA, E. J. & SANTOS, J. M. 2011. Ocorrência de *Meloidogyne enterolobii*, no município de Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. **Biosci. J.** Uberlândia. 27(6):877-878.
- ANASTASIADES, I. A.; GIANNAKOU, I. O.; PROPHETOU-ATHANASIADOU, D. A. & GOWEN, S. R. 2008. The combined effect of the application of a biocontrol agent *Paecilomyces lilacinus*, with various practices for the control of root-knot nematodes. *Crop Protection*. 27:352-361.
- ARAÚJO, J. M.; ARAÚJO, J. V.; BRAGA, CARVALHO, R. O.; SILVA, A. R. & CAMPOS, A. K. 2009. Interaction and ovicidal activity of nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* on *Taenia saginata* eggs. **Experimental Parasitology**. 121 :338–341.
- ARAÚJO, J. M.; ARAÚJO, J. V.; BRAGA, F. R.; ARAÚJO, D. M.; FERREIRA, S. R.; SOARES, F. E. F. & BENJAMIN, L. A. 2012. Survival of *Pochonia chlamydosporia* in the gastrointestinal tract of experimentally treated dogs. **Res. in Veterinary Science**, 93:803–806.
- ARAÚJO, J. V. 2001. Inibição de captura de larvas infectantes de *Cooperia punctata* por fungos do gênero *Arthrobotrys*, utilizando carboidratos e lectinas. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. 10(1):7-11.
- ARÉVALO, J., SILVA, S. D., CARNEIRO, M. D. G.; LOPES, R. B.; CARNEIRO R. M. D. G.; TIGANO, M. S. & HIDALGO-DÍAZ, L. 2012a. *Pochonia chlamydosporia* (Goddard) Zare y Gams como potencial agente de control biológico de *Meloidogyne enterolobii* (Yang y Eisenback) en cultivos hortícolas. **Rev. Protección Vegetal**. 27(2) 123-129.

- ARÉVALO, J., SILVA, S. D., CARNEIRO, M. D. G.; LOPES, R. B.; CARNEIRO R. M. D. G.; TIGANO, M. S. & HIDALGO-DÍAZ, L. 2012b. Efecto de la presencia de abono orgánico sobre la actividad de *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* (Kamyschko ex Barron y Onions) Zare y Gams frente a *Meloidogyne enterolobii* Yang y Eisenback. **Rev. Protección Vegetal**. 27(3):167-173.
- ARIEIRA, C. R. D.; MOLINA, R. O. & COSTA, A. T. 2008. Nematoides causadores de doenças em frutíferas. **Agro@ambiente On-line**. 2(1):46-56.
- ATKINS, S. D.; HIDALGO-DÍAZ, L.; CLARK, I. M.; MORTON, C. O.; MONTES DE OCA, N.; GRAY, P.A. & KERRY, B.R. 2003a. Approaches for monitoring the release of *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata*, a biocontrol agent of root-knot nematodes. **Mycological Research**. 107(2):206–212.
- ATKINS, S. D.; HIDALGO-DÍAZ, L.; KALISZ, H.; MAUCHLINE, T. H.; HIRSCH, P. R. Y & KERRY, B. R. 2003b. Development of a new management strategy for the control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) in organic vegetable production. **Pest Management Science**. 59:183-189.
- BARELA, J.F. & CHRISTOFFOLETI, P.J. 2006. Seletividade de herbicidas aplicados em pré-emergência da cultura da cana-de-açúcar (RB 867515) tratada com nematicidas. **Planta Daninha**. Viçosa, MG. 24(2):371-378.
- BARRON, G. L. 2003. Predatory fungi, wood decay, and the carbon cycle. **Biodiversity**, Canberra. 4:3-9.
- BATISTA, A.C. & FONSECA, O.M. 1965. *Pochonia humicola* n. gen. e n. sp., uma curiosa entidade fúngica dos solos do Nordeste do Brasil. **Publ. Inst. Micol**. Recife, 462:1-11.
- BENT, E.; LOFFREDO, A.; MCKENRY, M. V.; BECKER, J. O. & BORNEMAN J. 2008. Detection and Investigation of Soil Biological Activity against *Meloidogyne incognita*. **Journal of Nematology**. 40(2):109–118.
- BOAS, L. C. V.; TENENTE, R. C. V.; GONZAGA, V. NETO, S. P. S. & ROCHA, H.S. 2002. Reação de clones de bananeira (*Musa* spp.) ao nematoide *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1949, raça 2. **Rev. Bras. Frutic**. 24(3):690-693.
- BORDALLO, J. J.; LLOPEZ-LORCA, L. V.; JANSSON, H. B.; SALINAS, J. & ASENSIO, L. 2002. Colonisation of plant roots by egg-parasitic and nematode-trapping fungi. **New Phytologist**. 154:491-499.
- BRIDGE, J. 2000. Keynote: Nematodes of bananas and plantains in Africa: research trends and management strategies relating to the small scale farmer. **Acta Horticulturae**. 540:391-408

- BRIDGE, J.; R. FOGAIN ; P. SPEIJER. 1997. The root lesion nematodes of banana, *Pratylenchus coffeae* (Zimmermann, 1898) Fili. & Schu., 1941 and *Pratylenchus goodeyi* Sher & Allen, 1953. Montpellier, France: INIBAP. (INIBAP Musa Pest Fact Sheet, 2).
- BRITO, J.; POWERS, T. O.; MULLIN, P. G.; INSERRA, R. N. & DICKSON, D. W. 2004. Morphological and molecular characterization of *Meloidogyne mayaguensis* isolates from Florida. **Journal of Nematology**. 36:232–240.
- BRITO, J.A.; STANLEY, J.D.; MENDES, M.L.; CETINTAS, R & DICKSON, D.W. 2007. Host status of selected cultivars plants to *Meloidogyne mayaguensis* from Florida. **Nematropica**.37:65-71.
- CABANILLAS, E. & BARKER, K. R. 1989. Impact of *Paecilomyces lilacinus* Inoculum Level and Application Time on Control of *Meloidogyne incognita* on Tomato. **Journal of Nematology**. 21(1):115-120.
- CAMPOS, A. S. 2002. Distribuição de *Tylenchulus semipenetrans* e *Pratylenchus jaehni* em citros, no Estado de São Paulo, e estudo morfométrico comparativo de populações anfigmáticas de *Pratylenchus* spp. **Dissertação (Mestrado em Entomologia Agrícola)**. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. UNESP, Jaboticabal.
- CAMPOS, V. P.; SIVAPALAN, P. & GNANAPRAGASAM, N. C. 1997. Nematode parasites of coffee, cocoa and tea. In: M. Luc, R.A.S., and J. Bridge eds. (Ed.) **Plant parasitic nematodes in tropical and subtropical agriculture**. Wallingford, UK. CAB International. 387-470.
- CANTU, R. R.; WILCKEN, S. R. S.; ROSA, J. M. O.; GOTO, R. 2009. Reação de porta-enxertos de tomateiros a *Meloidogyne mayaguensis*. **Summa Phytopathologica**. Botucatu. 35:124-126.
- CARDOSO, E. R.; ASSIS, L. C. & NAHAS, E. 2009. Nutrição e crescimento do fungo nematófago *Arthrobotrys oligospora*. **Summa Phytopathol.**, Botucatu. 35(4):267-272.
- CAREY, J.; D'AMICO, R.; SUTTON, D.A. & RINALDI, M.G. 2003. *Paecilomyces lilacinus* vaginitis in an immunocompetent patient. **Emerg. Infect. Dis.** 9:1155-1158.
- CARNEIRO, R. M. D. & ALMEIDA, M. R. A. 2001. Técnica de eletroforese usada no estudo de enzimas dos nematóides de galhas para identificação de espécie. **Nematologia Brasileira**. 25:35-44.
- CARNEIRO, R. M. D. G. 1986. Etude des Possibilities D'utilisation du Champignon Nematophage *Paecilomyces lilacinus* (Thom.) Samson, 1974, Comme Agent de Lutte Biologique contre *Meloidogyne arenaria* (Neal, 1889), Chitwood, 1949. Tese (Doutorado) - **Cours do Pos Graduation in Parasitologie, Academie de Montpellier**. Université des Sciences et Techniques du Languedoc, France.

- CARNEIRO, R. M. D. G. 1992. Princípios e tendências do controle biológico de nematóides com fungos nematófagos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília. 27:113-121.
- CARNEIRO, R. M. D. G. 2003. Uma visão mundial sobre a ocorrência e patogenicidade de *Meloidogyne mayaguensis* em goiabeira e outras culturas. In: **XXIV Congresso Brasileiro de Nematologia**. p. 22 (resumos).
- CARNEIRO, R. M. D. G., MOREIRA, W. A.; ALMEIDA, M. R. A. & GOMES, A. C. M. M. 2001. Primeiro registro de *Meloidogyne mayaguensis* em goiabeira no Brasil. **Nematologia Brasileira**. 25(2):223-228.
- CARNEIRO, R. M. D. G.; ALMEIDA, M. R. A.; BRAGA, R. S.; ALMEIDA, C. A. & GIORIA, R. 2006. Primeiro registro de *Meloidogyne mayaguensis* parasitando plantas de pimentão e tomate resistentes à meloidoginose no Estado de São Paulo. **Nematologia Brasileira**. 30(1):81-86.
- CARNEIRO, R. M. D. G.; ALMEIDA, M. R. A.; MARTINS, I.; SOUZA, J. F.; PIRES, A. Q. & TIGANO, M. S. 2008. Ocorrência de *Meloidogyne* spp. e Fungos Nematófagos em Hortaliças no Distrito Federal, Brasil. **Nematologia Brasileira**. 32(2):135-141.
- CARNEIRO, R. M. D. G.; HIDALGO-DÍAZ, L.; MARTINS, I.; SILVA, K. F. A. S.; SOUZA, M. G. & TIGANO, M. S. 2011. Effect of nematophagous fungi on reproduction of *Meloidogyne enterolobii* on guava (*Psidium guajava* L.) plants. **Nematology**. 13(6):721-728.
- CARNEIRO, R. M. D. G.; NEVES, D. I.; FALCÃO, R.; PAES, N. S.; CIA, E.; GROSSI-DE-SÁ, M.F. 2005. Resistência de genótipos de algodoeiro a *Meloidogyne incognita* raça 3: reprodução e histopatologia. **Nematologia Brasileira**. Brasília. 29(1):1-10.
- CARNEIRO, R. M. D. G.; TIGANO, M. S.; RANDIG, O.; ALMEIDA, M. R. A. & SARAH, J. L. 2004. Identification and genetic diversity of *Meloidogyne* spp. (Tylenchida: Meloidogynidae) on coffee from Brazil, Central America and Hawaii. **Nematology**. 6:287-298.
- CARVALHO, R. O.; ARAÚJO, J. V.; BRAGA, F. R.; ARAÚJO, J. M. & ALVES, C. D. F. 2010. Ovicidal activity of *Pochonia chlamydosporia* and *Paecilomyces lilacinus* on *Toxocara canis* eggs. **Veterinary Parasitology**. 169:123–127.
- CARVALHO, R. O.; ARAÚJO, J. V.; BRAGA, F. R.; ARAÚJO, J. M. & ALVES, C. D. F. 2010. Ovicidal activity of *Pochonia chlamydosporia* and *Paecilomyces lilacinus* on *Toxocara canis* eggs. **Veterinary Parasitology**. 169:123–127.
- CHEN, S. Y. & CHEN, F. J. 2003. Fungal Parasitism of *Heterodera glycines* Eggs as Influenced by Egg Age and Pre-colonization of Cysts by Other Fungi. **Journal of Nematology**. 35(3):271–277.

- CHEN, S. Y.; DICKSON, D. W. & MITCHELL D. J. 1996. Pathogenicity of Fungi to Eggs of *Heterodera glycines*. **Journal of Nematology**. 28(2):148-158.
- COFCEWICZ, E. T.; CARNEIRO, R. M. D. G.; CORDEIRO, C. M. T.; QUÉNÉHERVÉ, P. & FARIA, J. L. C. 2004. Reação de cultivares de bananeira (*Musa* spp.) a diferentes espécies de nematóides das galhas. **Nematologia Brasileira**. 28(1):11-22.
- COLLINGBORN, F. M. B.; GOWEN, R. 1997. Screening of banana cultivars for resistance to *Radopholus similis* and *Pratylenchus coffeae*. **Infomusa**. Montpellier, France. 6(2):3 1997.
- COSTA, D. C. 2000. Nematoses em banana e abacaxi no Brasil: danos e manejo. In: **XXII CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA**. Uberlândia. **Anais** 50-58p.
- COSTA, D. C.; SILVA, S. O. & ALVES, F. R. 1998. Reação de genótipos de bananeira (*Musa* spp.) a *Radopholus similis* e *Meloidogyne incognita*. **Nematologia Brasileira**. 22(2):49-57.
- COUTINHO, M. M.; FREITAS, L. G.; DALLEMOLE-GIARETTA, R.; NEVES, W. S.; LOPES, E. A. & FERRAZ, S. 2009. Controle de *Meloidogyne javanica* com *Pochonia chlamydosporia* e farinha de sementes de mamão. **Nematologia Brasileira**. 33(2):169-175.
- CROW, W. T. 2013. Effects of a Commercial Formulation of *Paecilomyces lilacinus* Strain 251 on Overseeded Bermudagrass Infested with *Belonolaimus longicaudatus*. **Journal of Nematology**. 45(3):223–227.
- CUADRA, R.; PEREZ, J. A.; MACHADO, J.; VAZQUEZ, J. 1999. Effect of nemacur, terracur and furadan on root-knot nematodes in coffee plantations. **Revista de Proteccion Vegetal**. 14:111-115.
- DACKMAN, C. & NORDBRING-HERTZ, B. 1985. Fungal parasites of the cereal cyst nematode *Heterodera avenae* in southern Sweden. **J. Nematol.** 17:50-55.
- DACKMAN, C.; CHET, I. & NORDBRING-HERTZ, B. 1989. Fungal parasitism of the cyst nematode *Heterodera schachtii*: infection and enzymatic activity. **Microbiology Ecology**. 62:201-208.
- DALLEMOLE-GIARETTA, R.; FREITAS, L. G.; CAIXETA, L. B.; XAVIER, D. M.; FERRAZ, S. & FABRY, C. F. S. 2011. Produção de clamidósporos de *Pochonia chlamydosporia* em diferentes substratos. **Ciênc. agrotec.** Lavras. 35(2):314-321.
- DALLEMOLE-GIARETTA, R.; FREITAS, L. G.; LOPES, E. A.; PEREIRA, O. L.; ZOOCA, R. J. F.; FERRAZ, S. 2012. Screening of *Pochonia chlamydosporia* Brazilian isolates as biocontrol agents of *Meloidogyne javanica*. **Crop Protection**. 42:102-107.

- DE LEIJ, F. A. A. M., and KERRY, B. R. 1991. The nematophagous fungus, *Verticillium chlamydosporium* Goddard, as a biological control agent for *Meloidogyne arenaria* (Neal) Chitwood. **Révue de Nematologie**. 14:157-194.
- DE LEY, P. & BLAXTER, M.L. 2002. Systematic position and phylogeny. In: **D.L. Lee (ed.) The Biology of Nematodes**. Taylor and Francis, London.1-30.
- DIAS, A. S.; ARAÚJO, J. V.; BRAGA, F. R.; ARAÚJO, J. M.; PUPPIN, A. C.; FERNANDES, F. M.; RAMOS, R. F.; BERTONCELI, R. M.; SILVA, R. G. & PERBONI, W. R. 2012. Biological control of *Fasciola hepatica* eggs with the *Pochonia chlamydosporia* fungus after passing through the cattle gastrointestinal tract. **Parasitol Res**. 110:663–667.
- DIAS, A. S.; ARAÚJO, J. V.; BRAGA, F. R.; PUPPIN, A. C. & PERBONI, W. R. 2013. *Pochonia chlamydosporia* in the biological control of *Fasciola hepatica* in cattle in Southeastern Brazil. **Parasitol Res**. 112:2131–2136.
- DONG, L. Q. & ZHANG, K. Q. 2006. Microbial control of plant-parasitic nematodes: a five-party interaction. **Plant Soil**. 288:31–45.
- DROPKIN, V. H. 1969. The necrotic reaction of tomatoes and other hosts resistant to *Meloidogyne*: reversal by temperature. **Phytopathology**, Palo Alto. 59(11):1632-1637.
- DUNN, M. T.; SAYRE, R. M.; CARREL, A. & WERGIN, W. P. 1982. Colonization of nematode eggs by *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson as observed with scanning electron microscope. **SEM/1982/III**. Scanning Electron Microscopy. Inc. Chicago, IL. 1351- 1357.
- EAPEN, S. J.; BEENA, B. & RAMANA, K.V. 2005. Tropical soil microflora of spice-based cropping systems as potential antagonists of root-knot nematodes. **Journal of Invertebrate Pathology**. 88:218-225.
- EISENBACK, J. D. & TRIANTAPHYLLOU, H. H. 1991. Root-knot nematode: *Meloidogyne* sp. and races. In: **Nickle, W. R.(ed). Manual of agricultural Nematology**. New York, 191-274.
- EL-BORAI, F. E. & DUNCAN, L. W. 2005. Nematode parasites of subtropical and tropical fruit tree crops. In: LUC, M.; SIKORA, R. A.; BRIDGE, J. (Eds). **Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture**. 2. Ed. Wallingford: CABI Publishing, 467-492.
- ESTEVEES, I.; PETEIRA, B.; ATKINS, S. D.; MAGAN, N. & KERRY, B. 2009a. Production of extracellular enzymes by different isolates of *Pochonia chlamydosporia*. **Mycological Research**. 30:1-10.
- ESTEVEES, I.; PETEIRA, B.; POWERS, S.; MAGAN, N. & KERRY, B. 2009b. Effects of osmotic and matric potential on radial growth and accumulation

of endogenous reserves in three isolates of *Pochonia chlamydosporia*. **Biocontrol Science and Technology**. 19(2):185-199.

- FARIA, M. R. & MAGALHÃES, B. P. 2001. O uso de fungos entomopatogênicos no Brasil. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. Brasília, 4(22):18-21.
- FARIA, M. R. & TIGANO, M. S. 1996. Coleção de fungos entomopatogênicos do Cenargen. **Brasília: Embrapa Cenargen, Serviço de Produção e Informação**. 76p.
- FARIA, M. R. & WRAIGHT, S. P., 2007. Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biol. Control*. 43, 237-256.
- FERRAZ, S. & M. A. SANTOS. 1995. Controle Biológico de Fitonematóides pelo uso de fungos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. Passo Fundo, RS, 3:283-314.
- FERREIRA, P. A.; FERRAZ, S.; LOPES, E. A. & FREITAS, L. G. 2008. Parasitismo de ovos de *Meloidogyne exigua* por fungos nematófagos e estudo da compatibilidade entre os isolados fúngicos. **Revista Trópica. Ciências Agrárias e Biológicas**. 2(3):15-21.
- FREIRE, F. C. O. & BRIDGE, J. 1985. Parasitism of eggs, females and juveniles of *Meloidogyne incognita* by *Paecilomyces lilacinus* and *Pochonia chlamydosporia*. **Fitopatol. Bras.** 10:577-596.
- FREITAS, L. G.; FERRAZ, S. & MUCHOVEJ, J. J. 1995. Effectiveness of different isolates of *Paecilomyces lilacinus* and an isolate of *Cylindrocarpon destructans* on the control of *Meloidogyne javanica*. **Nematropica**. 25(2):109-115.
- FREITAS, L. G.; OLIVEIRA, R. D. L. & FERRAZ, S. 2006. Introdução à Nematologia. 3ª edição. Ed. UFV. Viçosa-MG.
- FREITAS, M. A.; PEDROSA, E. M. R.; MARIANO, R. L. R. & MARANHÃO, S. R. V. L. 2012. Seleção de *Trichoderma* spp. Como potenciais agentes para controle biológico de *Meloidogyne incognita* em cana de açúcar. **Neotropica**. 42:115-122.
- GAMS, W. 1971. Cephalosporium-artige Schimmelpilze (Hyphomycetes). Gustav Fischer, Stuttgart.
- GAMS, W. 1988. A contribution to the knowledge of nematophagous species of *Verticillium*. **Netherlands J. Pl. Pathol.** 94:123-148.
- GAO, C.; YIN, B.; BORNEMAN, J. & OLE BECKER, J. 2008. Assessment of Parasitic Activity of *Fusarium* Strains Obtained from a *Heterodera schachtii*-Suppressive Soil. **Journal of Nematology**. 40(1):1-6.

- GARCÍA, L.; GLEIBY, M.; MONTES DE OCA, N. & HIDALGO, L. 2004. Estudio de la irritación ocular y dérmica de *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata*. **Rev. Toxicol.** 21:103-107.
- GINTIS, B. O.; MORGAN-JONES, G. & RODRIGUEZ-KÁBANA, R. 1983. Fungi associated with several developmental stages of *Heterodera glycines* from an Alabama soybean field soil. **Nematropica.** 13(2):198-200.
- GODOY, G.; RODRÍGUEZ-KÁBANA, R. & MORGAN-JONES, G. 1983. Fungal parasites of *Meloidogyne arenaria* eggs in an Alabama soil. A mycological survey and greenhouse study. **Nematropica.** 13:201-213.
- GOMEZJURADO, M. E. G. Solubilização de fosfato por fungos do solo e eficiência de sua inoculação em caupi e milho. 2011. 79 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.
- GONÇALVES, Z. S.; AMORIM, T. B.; XAVIER, C. S.; AMORIM, E. P.; LESSA, L. S.; LEDO, C. A. S.; ROQUE, R. L. 2012. Comportamento agrônômico de cultivares de banana em função de diferentes lâminas de irrigação. Embrapa Mandioca e Fruticultura.
- HERNÁNDEZ, M. A. & HIDALGO-DÍAZ, L. 2008. KlamiC®: BIONEMATICIDA AGRÍCOLA PRODUCIDO A PARTIR DEL HONGO *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata*. **Rev. Protección Veg.** 23(2):131-134.
- HIDALGO, L.; SÁNCHEZ, L. & GÓMEZ, L. 1998. *Verticillium chlamydosporium* Goddard, parasito de huevos de *Meloidogyne incognita*. **Rev. Protección Veg.** 13(1):29-30.
- HIDALGO-DÍAZ, L. 2000. Potencialidades de cepas autóctonas de *Verticillium chlamydosporium* (Goddard) como agente de control biológico de *Meloidogyne* spp. **Tesis en opción al grado de Doctor en Ciencias Agrícolas.** UNAH-CENSA. 100p.
- HIDALGO-DÍAZ, L. 2000. Potencialidades de cepas autóctonas de *Verticillium chlamydosporium* (Goddard) como agente de control biológico de *Meloidogyne* spp. **Tesis en opción al grado de Doctor en Ciencias Agrícolas.** UNAH-CENSA. 100p.
- HIDALGO-DÍAZ, L.; BOURNE, J. M.; KERRY, B. R. & RODRÍGUES, M.G. 2000. Nematophagous *Verticillium* spp. in soils infested with *Meloidogyne* spp. in Cuba: isolation and screening. **International Journal of Pest Management.** 46(4):277-284.
- HIDALGO-DÍAZ, L.; BOURNE, J. M.; KERRY, B. R. & RODRÍGUES, M.G. 2000. Nematophagous *Verticillium* spp. in soils infested with *Meloidogyne* spp. in Cuba: isolation and screening. **International Journal of Pest Management.** 46(4):277-284.

- HIDALGO-DÍAZ, L.; BOURNE, J. M.; KERRY, B. R. & RODRÍGUEZ, M. G. 2000. Nematophagous *Verticillium* spp. in soils infested with *Meloidogyne* spp. in Cuba: isolation and screening. **International Journal of Pest Management**. 46(4):277-284.
- HIDALGO-DÍAZ, L.; BOURNE, J. M.; KERRY, B. R. & RODRÍGUEZ, M. G. 2000. Nematophagous *Verticillium* spp. in soils infested with *Meloidogyne* spp. in Cuba: isolation and screening. **International Journal of Pest Management**. 46(4):277-284.
- HO, J. Y.; WEIDE, R.; MA, H. M.; WORDRAGEN, M. F.; LAMBERT, K. N.; KOORNNEEF, M.; ZABEL, P.; WILLIAMSON, V. M. 1992. The root-knot nematode resistance gene (*Mi*) in tomato: construction of a molecular linkage map and identification of dominant cDNA markers in resistant genotypes. **Plant Journal**, London. 2:971-982.
- HUANG, X.; ZHAO, N. & ZHANG, K. 2004. Extracellular enzymes serving as virulence factors in nematophagous fungi involved in infection of the host. **Res. Microbiol.** 155:811–816.
- HUNT, D. J. & HANDOO, Z. A. 2009."Taxonomy, identification, and principal species".In Roland N. Perry, Maurice Moens & James L. Starr.Root-knot Nematodes. CAB International. 55–97.
- HUTCHINSON, C. M.; MCGIFFEN JR, M. E.; OHR, H. D.; SIMS, J. J. & BECKER, J. O. 1999. Evaluation of methyl iodide as a soil fumigant for root-knot nematode control in carrot production. **Plant Dis**. 83:33-36.
- INIBAP.2004. International Network for the Improvement of Banana and Plantain. Banana taxonomy..
- JACOBS, H.; GREY, S. N. & CRUMP, D. H. 2003. Interactions between nematophagous fungi and consequences for their potential as biological agents for the control of potato cyst nematodes. **Mycol. Res.** 107(1):47–56.
- JATALA, P. 1986. Biological control of plant parasitic nematodes. **Annual Review Phytopathology**. 24:453-489.
- JATALA, P.; KALTENBACH, R. & BOCANGEL, M. 1979. Biological control of *Meloidogyne incognita* and *Globodera pallida* on potatoes. Resumo. **J. Nematol.** 11:303.
- KARSSSEN, G. & MOENS, M. 2006.Root-Knot Nematodes. In: Perry RN, Moens M (Eds). **Plant Nematology**.Cambridge, USA, CABI North American Office.60-90p.
- KERRY, B. R. & BOURNE, J. M. 2002. A manual for Research on *Verticillium chlamydosporium*, as Potential Biological Control Agent for Root-Knot Nematodes.**Ed. WPRS/SROP**.

- KERRY, B. R. & HIDALGO-DÍAZ, L. 2004. Application of *Pochonia chlamydosporia* in the integrated control of root-knot nematodes on organically grown vegetable crops in Cuba. **Multitrophic Interactions in the Integrated Control**. 27:123-126.
- KERRY, B. R. 1975. Fungi and the decrease of cereal cyst-nematode populations in cereal monoculture. **EPPO Bulletin**. 5:353–361.
- KERRY, B. R. 2000. Rhizosphere interactions and the exploitation of microbial agents for the biological control of plant-parasitic nematodes. **Ann. Rev. Phytopathol.** 38:423–41.
- KERRY, B.R.; KIRKWOOD, I.A.; DE LEIJ, F.A.A.M.; BARBA, J.; LEIDJENS, M.B. & BROOKES, P.C. 1993. Growth and survival of *Verticillium chlamydosporium* Goddard, a parasite of nematodes in soil. **Biocontrol Science Technology**. 3:355-365.
- KIEWNICK, S.; DESSIMOZ, M. & FRANCK, L. 2009. Effects of the Mi-1 and the N root-knot nematode-resistance gene on infection and reproduction of *Meloidogyne enterolobii* on tomato and pepper cultivars. **Journal of Nematology**. 41:134–139.
- KUMAR, G. B.; KUMAR, P. R.; SINGH, R. K.; CHAITALI, B. & LOKENDRA, S. 2006. Integrated application of some compatible biocontrol agents along with mustard oil seed cake and furadan on *Meloidogyne incognita* infecting tomato plants. **J Zhejiang Univ SCIENCE B**. 7(11):873-875.
- LIMA, I. M.; DOLINKI, C. M. & SOUZA, R. M. 2003. Dispersão de *Meloidogyne mayaguensis* em goiabeiras de São João da Barra (RJ) e relato de novos hospedeiros dentre as plantas invasoras e cultivadas. **Nematologia Brasileira**. 27(2):257-258.
- LIMA, I. M.; SOUZA, R. M.; SILVA, C. P. & CARNEIRO, R. M. D. G. 2005. *Meloidogyne* spp. from preserved areas of Atlantic Forest in the State of Rio de Janeiro, Brazil. **Nematologia Brasileira**. 20:31-38.
- LIU, Y.-J.; ZHAI, C.-Y.; LIU, Y. & ZHANG, K.-Q. 2009. Nematicidal activity of *Paecilomyces* spp. and isolations of novel active compound. **The Journal of Microbiology**. 43(3):248-252.
- LOPEZ-LLORCA, L. V.; OLIVARES-BERNABEU, C.; SALINAS, J.; JANSSON, H. & KOLATTUKUDY, P. 2002. Pre-penetration events in fungal parasitism of nematode eggs. **Mycol. Res.** 106(4):499-506.
- LUANGSA-ARD, J.; HOUBRAKEN, J.; DOORN, T.V.; HONG, S.; BORMAN, A.M.; HYWEL-JONES, N.L. & SAMSON, R.A. 2011. *Purpureocillium*, a new genus for the medically important *Paecilomyces lilacinus*. **FEMS Microbiol Lett.** 321:141-149.
- MACIÁ-VICENTE, J. G.; JANSSON, H. B.; MENDGEN, K. & LOPEZ-LLORCA, L. V. 2008. Colonization of barley roots by endophytic fungi and their

reduction of take-all caused by *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. **Can J. of Microbiol.** 54:6000-6009.

MACIÁ-VICENTE, J. G.; JANSSON, H. B.; TALBOT, N. J. & LÓPEZ-LLORCA, L. V. 2009a. Real-time PCR quantification and live-cell imaging of endophytic colonization of barley (*Hordeum vulgare*) roots by *Fusarium equiseti* and *Pochonia chlamydosporia*. **New Phytologist.** 182(1):213-228.

MACIÁ-VICENTE, J. G.; ROSSO, L. C.; CIANCIO, A.; JANSSON, H. B. & LÓPEZ-LLORCA, L. V. 2009b. Colonization of barley roots by endophytic *Fusarium equiseti* and *Pochonia chlamydosporia*: Effects on plant growth and disease. **Ann. Appl. Biol.** 155(3):391-401.

MAGGENTI, A. 1981. General Nematology. New York: Springer-Verlag.

MANKAU, R. 1980. Biological control of nematode pests by natural enemies. **Ann. Rev. Phytopathol.** 18:415-40.

MARANHÃO, S. R. V. L.; MOURA, R. M. & PEDROSA, E. M. R. 2001. Reação de indivíduos segregantes de Goiabeira a *Meloidogyne incognita* 1 e *M. mayaguensis*. **Nematologia Brasileira.** 25(2):191-195.

MENSIN, S.; SOYTONG, K.; McGOVERN, R. J. & TO-ANUN, C. 2012. Selection of efficient nematophagous fungi against root-knot nematodes in the highland cultivated area. **Journal of Agricultural Technology.** 8(7):2259-2272.

MICHEREFF FILHO, M., FARIA, M., WRAIGHT, S. P., & SILVA, K. F. A. S., 2009. MicoInseticidas e micoacaricidas no Brasil: como estamos após quatro décadas? **Arq. Instituto Bio.** 76:769-779.

MOOSAVI, M.; ZARE, R.; ZAMANIZADEH, H. & FATEMY, S. 2010. Pathogenicity of *Pochonia* species on eggs of *Meloidogyne javanica*. **Journal of Invertebrate Pathology.** 104:125–133.

MOREIRA, W. A.; HENRIQUE NETO, D. 2001. Attack by gall nematode (*Meloidogyne mayaguensis*) to seedlings of guava obtained from cuttings and grafting. **Comunicado Técnico/Embrapa Semi-Árido.** Petrolina, PE. 107:1-4.

NUNES, H. T.. 2008. Agentes microbianos no controle de nematóides e fungos fitopatogênicos de soja e sua compatibilidade com agroquímicos. Tese (doutorado) - Univ. Est. Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal.

PATRÍCIO, F.C.; RIGITANO, R.L.O.; GOUVÊA, A.V. & FRANCO, A.A. 2002. Toxicidade do inseticida-nematicida aldicarbe às espécies de peixes *Brachydanio rerio* (HAMILTON–BUCHANAN, 1822) e *Orthospinus franciscensis* (EIGENMANN, 1929). **Ciênc.agrotec.**, Lavras. 26(2):385-391.

- PEREIRA, A. M.; MACEDO, A.; DIAS ARIEIRA, C. R. & PELISSARI, A. 2006. Nematoides fitoparasitas asociados a cultura da bananeira (*Musa* spp.) no estado do Paraná. In: Reunião Internacional da Associação para a Cooperação nas Pesquisas sobre Banana no Caribe e na América Tropical. Joinville. **XVII REUNIÃO Internacional - Acorbat**. 2:818-825.
- PERRY, R. N.; MOENS, M. & STARR, J. L. 2010. Root-knot nematodes. Ed. CABI. 1-2p.
- PERSMARK, L.; BANCK, A. & JANSSON, H-B. 1996. Population dynamics of nematophagous fungi and nematodes in an arable soil: vertical and seasonal fluctuations. **Soil Biology and Biochemistry**. Oxford. 28(8):1005-1014.
- PERSSON, C. & JANSSON, H.B. 1997. Colonization of soil by nematophagous fungi. In: **Seminário científico internacional sobre sanidad vegetal**. Ciudad Habana. 127p. (Resúmenes).
- PETEIRA, B.; ESTÉVEZ, I.; ATKINS, S.; HIDALGO-DÍAZ, L.; De OCA, N. M. & Kerry, B. 2005. Estabilidad de la cepa IMI SD: 187 de *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* (Kamyscho Ex Barron y Onions) Zare y W. Gams. Parte II. Indicadores Bioquímicos. **Rev. Protección Veg.** 20(2):102-109.
- PETEIRA, B.; PUERTAS, A.; HIDALGO-DÍAZ, L. HIRSCH, P.; KERRY, B. & ATKINS, S. 2005. Real-time PCR to monitor and assess the efficacy of two types of inoculum of the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* against root-knot nematode populations in the field. **Biotecnología Aplicada**. 22(4):261-266.
- PIRES, D.X.; CALDAS, E.D. & RECENA, M.C.P. 2005. Intoxicações provocadas por agrotóxicos de uso agrícola na microrregião de Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil, no período de 1992 a 2002. **Cad. Saúde Pública**. Rio de Janeiro. 21(3):804-814.
- PISKIEWICZ, A. M.; DUYTS, H.; BERG, M. P.; COSTA, S. R. & PUTTEN, W. H. 2007. Soil microorganisms control plant ectoparasitic nematodes in natural coastal foredunes. **Oecologia**. 152:505–514.
- PROT, J.C. 1984. A naturally occurring resistance breaking biotype of *Meloidogyne arenaria* on tomato. Reproduction and pathogenicity on tomato cultivars Roma and Rossol. **Revue de Nématologie**. 7:23-28.
- PUERTAS, A. & HIDALGO-DÍAZ, L. 2007. Influencia de la planta hospedante y su interacción con *Meloidogyne incognita* sobre la efectividad de *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata*. **Rev. Protección Veg.** 22(2):104-109.
- RAO, M. S.; REDDY, P. P. & NAGESH, M. 1998. Evaluation of plant based formulations of *Trichoderma harzianum* for the management of *Meloidogyne incognita* on egg plant. **Nematologia Mediterranea**. 26:59–62.

- REDDY, P. P.; RAO, M. S. & NAGESH, M. 1996. Management of citrus nematode, *Tylenchulus semipenetrans*, by integration of *Trichoderma harzianum* with oil cakes. **Nematologia Mediterranea**. 24:265–267.
- RITZINGER, C. H. S. P. & FANCELLI, M. 2006. Manejo integrado de nematóides na cultura da bananeira. **Rev. Bras. Frutic.** 28(2):331-338.
- ROBERTS, P. A., 1993. The future of nematology: integration of new and improved management strategies. **J. Nematol.** 25:383–394.
- ROBERTS, P. A., 1993. The future of nematology: integration of new and improved management strategies. **J. Nematol.** 25:383–394.
- RUMBOS, C. I. & KIEWNICK, S. 2006. Effect of plant species on persistence of *Paecilomyces lilacinus* strain 251 in soil and on root colonization by the fungus. **Plant and Soil**. 283:25-31,
- SABET, F.; OLIA, M.; SHARIFNABI, B. & FADAEI-TEHRANI, A. A. 2013. BIOLOGICAL CONTROL OF THE ROOT-KNOT NEMATODE, *Meloidogyne javanica* BY FOUR ISOLATES OF *Paecilomyces lilacinus* AND AN ISOLATE OF *Isaria farinosa* ON TOMATO PLANTS. **Iran. J. Plant Path.** 49(2):65-67.
- SANKARANARAYANAN, C.; HUSSAINI, S. S. & KUMAR, P. S. 2000. Biological control of *Meloidogyne incognita* (Kofoid and White 1919) Chitwood 1949 on tomato by *Verticillium chlamyosporium* Goddard cultured on different substrates. **Journal of Biological Control**. 14:39–43.
- SANKARANARYANAN, C., HUSSAINI, S. S., KUMAR, P. S., RANGESHWARAN, R. 2001. Evaluation of substrates for the multiplication of *Verticillium chlamyosporium* Goddard and its biocontrol efficacy against *Heterodera cajani* Koshyon pigeonpea. **Annals of Plant Protection Science**. 9:73–76.
- SANTIAGO, D. C.; HOMECHIN, M.; SILVA, J. F. V.; RIBEIRO, E. R.; GOMES, B. C.; SANTORO, P. H.. 2006. Seleção de isolados de *Paecilomyces lilacinus* (Thom.) Samson para controle de *Meloidogyne paranaensis* em tomateiro. **Ciência Rural**. 36(4):1055-1064.
- SANTOS, M. C. V.; ESTEVES, I. & ABRANTES, I. 2012. *In vitro* water stress bioassays with the nematophagous fungus *Pochonia chlamyosporia*: Effects on growth and parasitism. **Biological Control**. 63:310–319.
- SANTOS, M. C. V.; ESTEVES, I. & ABRANTES, I. 2012. *In vitro* water stress bioassays with the nematophagous fungus *Pochonia chlamyosporia*: Effects on growth and parasitism. **Biological Control**. 63:310–319.
- SASSER, J.N. 1980. Root-knot nematodes: a global menace to crop production. **Plant Disease**. 64:36-41.

- SHARON, E.; CHET, I.; VITERBO, A.; BAR-EYAL, M. NAGAL, H.; SAMUELS, G. J. & SPIEGEL, Y. 2007. Parasitism of *Trichoderma* on *Meloidogyne javanica* and role of the gelatinous matrix. **Eur J Plant Pathol.** 118:247–258.
- SIDDIQUI, I. A. & SHAUKAT, S. S. 2002. Mixtures of plant disease suppressive bacteria enhance biological control of multiple tomato pathogens. **Biology and Fertility of Soils.** 36:260-268.
- SIDDIQUI, I. A. & SHAUKAT, S. S. 2003. Combination of *Pseudomonas aeruginosa* and *Pochonia chlamydosporia* for control of root-infecting fungi in tomato. **J. Phytopathology.** 151:215-222.
- SIDDIQUI, Z. A. & AKHTAR, M. S. 2009. Effects of antagonistic fungi and plant growth-promoting rhizobacteria on growth of tomato and reproduction of the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. **Australasian Plant Pathology.** 38:22–28.
- SIDDIQUI, Z. A. & MAHMOOD, I. 1995. Role of plant symbionts in nematode management: a review. **Bioresources Technologi.** 54(3):217–226.
- SIKORA, R. A. 1992. Management of the antagonistic potential in agricultural ecosystems for de biological control of plant parasitic nematodes. **Ann. Rev. Phytopathol.** 30:245-70
- SIKORA, R. A.; POCASANGRE, L.; FELDE, A.; NIERE, B.; VU, T. T. & DABABAT, A. A. 2008. Mutualistic endophytic fungi and in-planta suppressiveness to plant parasitic nematodes. **Biological Control.** 46:15–23.
- SILVA, G. S. S. & KRASUSKI, A. I. 2012. Reação de algumas frutíferas tropicais a *Meloidogyne enterolobii*. **Nematologia Brasileira.** 36(1-2):83-86.
- SIMMONDS, N. W. 1973. Los platanos. **Barcelons.** Blume. 539p.
- SOARES, F. E. F.; BRAGA, F. R.; ARAÚJO, J. V.; LIMA, W. S.; MOZER, L. R. & QUEIRÓZ, J. H. 2012. In vitro activity of a serine protease from *Monacrosporium thaumasium* fungus against first-stage larvae of *Angiostrongylus vasorum*. **Parasitol Res.** 110:2423–2427.
- SOSA-GOMEZ, D.R. 2002. Fungos entomopatogênicos: catálogo de isolados. **Londrina: Embrapa Soja.** 1:1-32. (Série Documentos).
- STIRLING, G.R. 1991. Biological Control of Plant Parasitic Nematodes: Progress, Problems and Prospects. **CAB International.** Wallingford, UK. 282p.
- SUNG, G.H.; HYWEL-JONES, N.L.; SUNG, J.M.; LUANGSA-ARD, J.J.; SHRESTHA, B.; SPATAFORA, J.W. 2007. Phylogenetic classification of

Cordyceps and the clavicipitaceous fungi. **Studies in Mycology**. 57(1):5-59.

TAKAYASU, S.; AKAZI, M. & SHIMIZU, Y. 1977. Cutaneous mycosis caused by *Paecilomyces lilacinus*. **Archives of Dermatology**. 113:1687-1690.

TAYLOR, D.T. & SASSER, J.N. (1983). Biología, identificación y control de los nematodos de nódulo de la raíz (*Meloidogyne* species). **A Coop. Publico of the Depart. PI Pathology**. N. Carolina St. Univ. and USAID. 111p.

TEZENAS, D. U. & MONTCEL, H. 1988. *Musa acuminata* subespecie *banksii* status and diversity. In: **Proceedings of Workshop on identification os genetic diversitu in the genus *Musa***. INIBAP. 12p.

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

TOBIN, J. D.; HAYDOCK, P. P. J.; HARE, M. C.; WOODS, S. R. & CRUMP, D. H. 2008. Effect of the fungus *Pochonia chlamydosporia* and fosthiazate on the multiplication rate of potato cyst nematodes (*Globodera pallida* and *G. rostochiensis*) in potato crops grown under UK field conditions. **Biological Control** 46:194-201.

TZORTZAKAKIS, E. A. 2007. The effect of the fungus *Pochonia chlamydosporia* on the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* in pots. **Russian Journal of Nematology**. 15:89–94.

VERDEJO-LUCAS, S.; SORRIBAS, F. J.; ORNAT, C. & GALEANO, M.. 2003. Evaluation *Pochonia chlamydosporia* in a double-cropping system of lettuce and tomato in plastic house infested with *Meloidogyne javanica*. **Plant Pathol**. 52:521–528.

VIGGIANO, J. R.; FREITAS, L. G. & FERREIRA, P. A. 2012. Resíduo da produção de *Pochonia chlamydosporia* no desenvolvimento de mudas e plantas de alface. **Pesquisa agropecuária brasileira** [online]. 47(7):983-990.

VIGLIERCHIO, D. R. 1991. The world of nematodes: a fascinating component of the animal kingdom. In: RITZINGER, C. H. S. & FANCELLI, M. 2006. Manejo integrado de nematóides na cultura da bananeira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 28:331-338.

WALTERS, S. A. & BARKER, K. R. 1994. Efficacy of *Paecilomyces lilacinus* in suppressing *Rotylenchulus reniformis* on tomato. **J. Nematol**. 26:600-605.

WANG, J.; WANG, J.; LIU, F. & PAN, C. 2010. Enhancing the virulence of *Paecilomyces lilacinus* against *Meloidogyne incognita* eggs by overexpression of a serine protease. **Biotechnol Lett**. 32:1159–1166.

WANG, Y.; CROKER, R. L.; WILSON, L. T.; SMART, G.; WEI, X.; NAILON, W. T. e COBB, P. P. 2001. Effect of nematode and fungal treatments on

nontarget turfgrass-inhabiting arthropod and nematode population.
Environ. Entomol. 30(2):196-203.

WILLCOX, J. & TRIBE, H.T. 1974. Fungal parasitism in cysts of *Heterodera* I. Preliminary investigations. **Transactions of the Brazilian Mycological Society.** 62:585–594.

WINDHAM, G. L.; WINDHAM, M. T. & WILLIAMS, W. P. 1989. Effects of *Trichoderma* spp. on maize growth and *Meloidogyne arenaria* reproduction. **Plant Disease.** 73:493–494.

YANG, B.; EISENBACK, J. D. 1983. *Meloidogyne enterolobii* n. sp. (Meloidogynidae), a root-knot nematode parasitising papaya tree in China. **Journal of Nematology.** Hanover. 15:381–391.

ZARE, R.; GAMS, W. & EVANS, H. C. 2001. A revision of *Verticillium* section *Prostrata*. V. The genus *Pochonia*, with notes on *Rotiferophthora*. **Nova Hedwigia.** 73:51-86.

CAPÍTULO I

Seleção *in vitro* de isolados de *Pochonia chlamydosporia* e *Purpureocillium lilacinum* patogênicos a ovos de *Meloidogyne enterolobii*.

1 INTRODUÇÃO

A busca de novas soluções para o controle de fitonematoides vem se tornando cada dia mais importante e demandando grande atenção da comunidade científica, uma vez que, o uso de nematicidas químicos, embora apresente resultados imediatos, em muitos casos vem se tornando antieconômico e pouco eficaz, além de causar sérios problemas à saúde humana, ao meio ambiente (Roberts, 1993; Hidalgo-Díaz et al., 2000; Verdejo-Lucas et al., 2003; Bent et al., 2008) e desenvolvendo resistência a agrotóxicos (Huang et al., 2004), incluindo fitonematoides, o que favorece a rápida evolução de resistência em populações da praga. Por essa razão, o controle biológico de fitonematoides surge como uma opção mais ecológica e vem sendo amplamente discutido pela comunidade científica (Sikora, 1992; Kerry, 2000; Dong & Zhang, 2006; Piskiewicz et al., 2007; Bent et al., 2008; Sikora et al., 2008).

Dentre os agentes de controle biológico, destacam-se os fungos parasitas de ovos de fitonematoides sedentários. As espécies mais estudadas desses organismos são *Pochonia chlamydosporia* [= *Verticillium chlamydosporium*] (Goddard) Zare & Gams e *Purpureocillium lilacinum* [= *Paecilomyces lilacinus*] (Thom) Samson, principalmente para uso no manejo de nematoides formadores de galhas e de cistos em cultivos diversos (Kerry, 1975; Freire & Bridge, 1985; Hidalgo-Díaz et al. 1998; Hidalgo-Díaz, 2000; Atkins et al., 2003a; Atkins et al., 2003b; Jacobs et al., 2003; Kumar et al., 2006; Santiago et al., 2006; Anastasiades et al., 2008; Tobin et al., 2008; Siddiqui & Akhtar, 2009; Carneiro et al., 2011) e para o controle de helmintos gastrointestinais em produção animal (Araújo et al., 2009; Braga et al., 2010; Carvalho et al. 2010; Araújo et al., 2012; Dias et al., 2012; Dias et al., 2013). A facilidade de produção massal *in vitro* (Kerry & Hidalgo-Díaz, 2004, Dallemore-

Giaretta et al., 2011) e a capacidade de colonizar a rizosfera (De Leij & Kerry, 1991; Peteira et al., 2005; Rumbos & Kiewnick, 2006; Arévalo et al., 2012a) tornam essas espécies potenciais no desenvolvimento de produtos microbianos para utilização em diversos cultivos.

Uma das etapas iniciais e indispensáveis para obtenção de um miconematicida eficaz é a seleção de linhagens com alta atividade biológica sobre o alvo. Em razão da riqueza da biodiversidade nacional, quanto maior o número de materiais avaliados, maior a chance de identificação de potenciais agentes de biocontrole. Diversos estudos *in vitro* vêm sendo conduzidos para se determinar o potencial de ação de um grande número de linhagens e selecionar materiais mais promissores para posteriores estudos a campo. Estudos dessa natureza também oferecem controle preciso das condições experimentais e levam a resultados rápidos e consistentes (Wang et al., 2010; Dallemole-Giaretta et al., 2012; Mensin et al., 2012). Entre eles incluem o efeito nematicida de metabólitos produzidos pelos fungos (Esteves et al., 2009; Braga et al., 2010; Soares et al., 2012) e a ação direta de parasitismo de ovos pelo agente de controle (Chen et al., 1996; Hidalgo-Díaz et al., 2000; Chen & Chen, 2003; Araújo et al., 2009; Carvalho et al. 2010; Moosavi et al., 2010). Embora metodologias *in vitro* pouco representem as condições reais de interação planta-nematoide-fungo na rizosfera, tais testes oferecem a possibilidade de avaliação de diversos mecanismos de ação e seus efeitos sobre o hospedeiro.

O presente estudo teve como objetivos selecionar linhagens de *P. chlamydosporia* e *P. lilacinum* sobre ovos e massas de ovos de *Meloidogyne enterolobii* e determinar o efeito da aplicação isolada ou conjunta desses microrganismos na redução da eclosão de juvenis do nematoide em laboratório.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Preparo da suspensão de ovos de *Meloidogyne enterolobii* e do inóculo dos fungos *Pochonia chlamydosporia* e *Purpureocillium lilacinum*

A suspensão de ovos de *M. enterolobii* foi preparada a partir de raízes de tomateiro infectadas com o nematoide, gentilmente cedidas pelo Laboratório de Nematologia da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Após três meses em casa de vegetação, as raízes das plantas foram lavadas cuidadosamente, cortadas e trituradas em liquidificador com hipoclorito de sódio (NaOCl) 0,5% por 1 minuto. Em seguida, o triturado foi passado em peneiras sobrepostas de 20, 100 e 500 mesh. Todo o material retido na peneira de 500 mesh (ovos do nematoide) foi lavado em água corrente e coletado em béquer (Boneti e Ferraz, 1981).

Após obtenção da suspensão de ovos, foi feita a distribuição da mesma em tubos de 50 mL e centrifugados a 360 G por 5 minutos. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e se adicionou uma solução de sacarose (30%), seguido de homogeneização. A suspensão foi então centrifugada na mesma velocidade por dois minutos. Em seguida, o sobrenadante foi repassado em peneira de 500 mesh e lavado com água destilada para retirada dos resíduos de sacarose. Os ovos retidos foram transferidos para tubos de 50 mL, o volume do tubo foi completado com água destilada e centrifugado por três minutos a 360 g. O sobrenadante foi retirado com auxílio de uma micropipeta. Com o auxílio de uma câmara de Peter e microscópio óptico, contabilizou-se e avaliou-se o número de ovos, juvenis de primeiro estágio (J1) e juvenis de segundo estágio (J2) (Figura 5 **Erro! Fonte de referência não encontrada.**), separadamente, e a suspensão final foi padronizada para 5×10^3 ovos/mL.

Foram utilizadas inicialmente 19 linhagens de *Pochonia chlamydosporia* (Tabela 1) e 14 de *Purpureocillium lilacinum*, além de três de *Isaria ghanensis* (Tabela 2). As linhagens de *I. ghanensis* foram utilizadas apenas como modo de comparação pelo fato de uma delas ter sido isolada de ovos de *Meloidogyne* sp.. Provindas da Coleção de Fungos de Invertebrados (CFI) da Embrapa

Recursos Genéticos e Biotecnologia. As linhagens preservadas e armazenados em freezer -80°C foram multiplicadas em placas de Petri contendo meio de cultura batata-destrose-ágar (BDA – Acumedia) + antibiótico (streptomicina, 0,5 g/L) e mantidos em câmara climatizada tipo BOD (26±1°C) para crescimento.

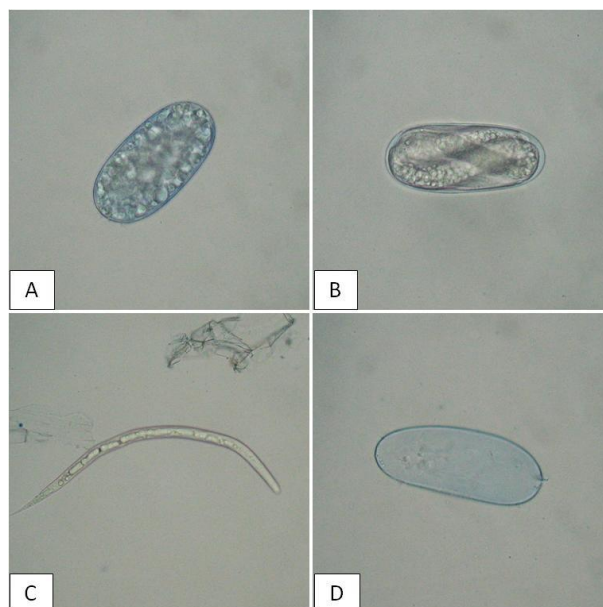


Figura 5. Fases de desenvolvimento de *Meloidogyne enterolobii* observadas durante as contagens em câmara de Peter. A) ovo; B) juvenil no ovo (J1); C) juvenil de segundo estágio eclodido (J2); D) ovo vazio.

Tabela 1. Relação de isolados de *Pochonia chlamydosporia* da CFI utilizados.

Isolado	Espécie	Hospedeiro
CG1003	<i>Pochonia chlamydosporia</i> var. <i>chlamydosporia</i>	Ovos de <i>M. enterolobii</i>
CG1006	<i>Pochonia chlamydosporia</i> var. <i>catenulata</i>	Ovos de <i>M. enterolobii</i>
CG1007	<i>Pochonia chlamydosporia</i> var. <i>chlamydosporia</i>	Ovos de <i>M. enterolobii</i>
CG1039	<i>Pochonia chlamydosporia</i> var. <i>chlamydosporia</i>	Massas de ovos de nematoides
CG1041	<i>Pochonia chlamydosporia</i> var. <i>chlamydosporia</i>	Massas de ovos de nematoides
CG1042	<i>Pochonia chlamydosporia</i> var. <i>chlamydosporia</i>	Ovos de <i>Globodera pallida</i>
CG1043	<i>Pochonia chlamydosporia</i> var. <i>chlamydosporia</i>	Ovos de <i>M. incognita</i>
CG1044	<i>Pochonia chlamydosporia</i> var. <i>catenulata</i>	Produto - Klamic®
CG1045	<i>Pochonia chlamydosporia</i> var. <i>chlamydosporia</i>	Ovos de <i>M. enterolobii</i>

CG1046	<i>Pochonia chlamydosporia</i> var. <i>chlamydosporia</i>	Ovos de <i>M. enterolobii</i>
CG1050	<i>Pochonia chlamydosporia</i> var. <i>chlamydosporia</i>	Ovos de <i>M. enterolobii</i>
CG1051	<i>Pochonia chlamydosporia</i> var. <i>chlamydosporia</i>	Massas de ovos de nematoides
CG1052	<i>Pochonia chlamydosporia</i> var. <i>chlamydosporia</i>	Massas de ovos de nematoides
CG1072	<i>Pochonia chlamydosporia</i> var. <i>chlamydosporia</i>	Massas de ovos de nematoides
CG1073	<i>Pochonia chlamydosporia</i> var. <i>chlamydosporia</i>	Massas de ovos de nematoides
CG1074	<i>Pochonia chlamydosporia</i> var. <i>chlamydosporia</i>	Ovos de <i>Meloidogyne</i> sp.
CG1075	<i>Pochonia chlamydosporia</i> var. <i>chlamydosporia</i>	Ovos de <i>Heterodera avenae</i>
CG1101	<i>Pochonia chlamydosporia</i> var. <i>chlamydosporia</i>	Ovos de <i>M. enterolobii</i>
CG1102	<i>Pochonia chlamydosporia</i> var. <i>chlamydosporia</i>	Ovos de <i>M. enterolobii</i>

Tabela 2. Relação de isolados de *Purpureocillium* e *Isaria* da CFI utilizados.

Isolado	Espécie	Hospedeiro
CG175	<i>Purpureocillium lilacinum</i>	<i>Meloidogyne</i> sp.
CG177	<i>Isaria ghanensis</i>	Ovos de <i>Meloidogyne</i> sp.
CG179	<i>Purpureocillium lilacinum</i>	Ovos de <i>Meloidogyne</i> sp.
CG180	<i>Purpureocillium lilacinum</i>	Ovos de <i>M. javanica</i>
CG265	<i>Isaria ghanensis</i>	Solo
CG303	<i>Purpureocillium lilacinum</i>	<i>Meloidogyne</i> sp.
CG313	<i>Purpureocillium lilacinum</i>	<i>M. javanica</i>
CG348	<i>Isaria ghanensis</i>	Solo
CG953	<i>Purpureocillium lilacinum</i>	Massas de ovos de nematoides
CG954	<i>Purpureocillium lilacinum</i>	Massas de ovos de nematoides
CG955	<i>Purpureocillium lilacinum</i>	Massas de ovos de nematoides
CG957	<i>Purpureocillium lilacinum</i>	Massas de ovos de nematoides
CG959	<i>Purpureocillium lilacinum</i>	Produto - Biostat® WP
CG1004	<i>Purpureocillium lilacinum</i>	Ovos de <i>M. enterolobii</i>

CG1038	<i>Purpureocillium lilacinum</i>	<i>Meloidogyne</i> sp.
CG1053	<i>Purpureocillium lilacinum</i>	Massas de ovos de nematoides
CG1068	<i>Purpureocillium lilacinum</i>	Massas de ovos de nematoides

Após 12 dias de incubação, as culturas (Figura 6) foram raspadas com o auxílio de uma espátula de metal e o material transferido para tubos com 10 mL de água destilada estéril (Tween 80 - 0,05%). As suspensões foram levadas ao vortex (1 min), ultrassom (2 min) e vortex (1 min) para homogeneização. Após esse processo, as suspensões passaram por filtragem com o auxílio de uma gaze para retenção de partículas de meio de cultura e fragmentos de micélio. A seguir diluídas para a quantificação de esporos (conídios para *P. lilacinum* e conídios e clamidósporos para *P. chlamydosporia*). A contagem dos esporos foi feita com o auxílio de uma câmara de Neubauer e microscópio óptico e a suspensão final, utilizada em todos os experimentos subsequentes, padronizada para a concentração de 1×10^6 propágulos/mL.

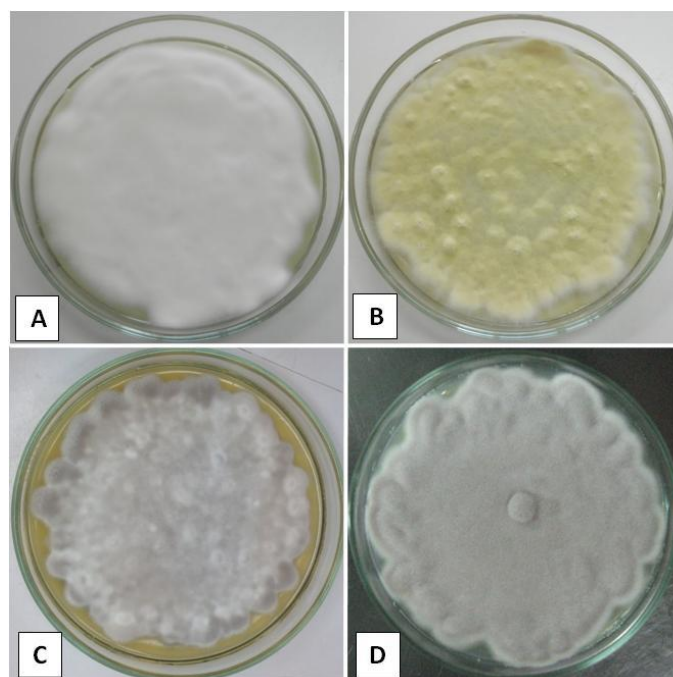


Figura 6. Culturas em meio BDA após 12 dias de incubação. A) CG1101 – *P. c.* var *chlamydosporia*; B) CG1044 – *P. c.* var *catenulata*; C) CG179 – *Purpureocillium lilacinum*; D) CG265 – *Isaria ghanensis*.

2.2 Seleção *in vitro* de linhagens de *Pochonia chlamydosporia* e *Purpureocillium lilacinum* sobre ovos de *Meloidogyne enterolobii*

Os experimentos foram conduzidos em placas de Elisa com 12 poços, contendo 3 mL de ágar-água (1,5%) solidificado. Os poços foram identificados com os tratamentos de forma randômica (Figura 7), com quatro repetições (poços) para cada tratamento, totalizando 80 poços. Cada poço recebeu 100 μ L da suspensão de ovos extraídos das raízes (item 2.1), o que correspondeu em média a 500 ovos. Após secagem do excesso de água em câmara de fluxo laminar vertical, os ovos foram inoculados com 150 μ L da suspensão dos diferentes isolados (item 2.1). O tratamento controle recebeu apenas água destilada com espalhante adesivo. Após secagem do excesso de água do inóculo, as placas foram cobertas com um papel filtro umedecido preso à tampa e incubadas sob condições controladas ($26\pm 1^\circ\text{C}$, 24 horas de escotofase e UR>95%) (Figura 8). Utilizou-se um datalogger para registro da umidade e temperatura durante todo o período experimental.



Figura 7. Placas de Elisa utilizadas nos experimentos com os poços identificados randômicamente.



Figura 8. Placas de Elisa incubadas sob condições controladas ($25\pm 1^\circ\text{C}$ e $\text{UR}>95\%$), com o datalogger.

As avaliações foram feitas 15 dias após a inoculação dos ovos. Os poços foram lavados individualmente com 3 mL de água destilada, com o auxílio de um bastão de vidro de ponta chata. A lavagem foi feita gentilmente em 3 etapas, com 1 mL de água em cada uma das etapas, evitando-se o rompimento de ovos ou de juvenis que eclodiram no período. Todo o volume aplicado foi coletado com um pipetador e contabilizou-se em câmara de Peter o número de juvenis (J2) por poço. Os experimentos com cada uma das espécies foram repetidos duas vezes em períodos diferentes. Os experimentos foram analisados conjuntamente por ter sido possível determinar uma homogeneidade da idade dos ovos nas contagens da suspensão estoque de ovos de ambos os experimentos. Os dados de eclosão de J2 foram submetidos conjuntamente a análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P<0,05$) através do programa Assistat 7.7.

2.3 Parasitismo de massas de ovos de *Meloidogyne enterolobii* por linhagens selecionadas de *Pochonia chlamydosporia* e *Purpureocillium lilacinum*

Nos estudos com massas de ovos, as linhagens CG1006 e CG1044 (*P. c. var. catenulata*), CG1042 e CG1101 (*P. c. var. chlamydosporia*), CG179, CG1038 e CG959 (*P. lilacinum*) e CG348 (*Isaria ghanensis*) foram

selecionadas. As massas de ovos de *M. enterolobii* foram extraídas diretamente de raízes infestadas do tomateiro com o auxílio de pinça e lupa e submersas em água destilada. Um grupo de cinco massas de ovos com tamanho homogêneo foi transferido para a superfície do ágar-água nos poços, preparados como descrito anteriormente (item 2.2). A inoculação do fungo foi feita conforme metodologia já descrita acima no mesmo volume e concentração (item 2.2). Foram selecionados para essa segunda etapa, apenas os quatro isolados dentre os que tiveram os melhores índices de redução de juvenis na etapa anterior. As condições experimentais e avaliações foram feitas como descrito no item 2.2. O experimento sobre massas foi repetido duas vezes em períodos diferentes. Nesse caso, em razão da possível variação da idade dos ovos dentro da massa os experimentos foram analisados separadamente. Os dados de eclosão de J2 de cada experimento foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$) pelo programa Assistat 7.7.

2.4 Associação em mistura de linhagens selecionadas de *Pochonia chlamydosporia* e *Purpureocillium lilacinum* sobre ovos de *Meloidogyne enterolobii*

Após a seleção inicial das linhagens, por meio da redução média da eclosão de J2 nos tratamentos em relação ao controle, foi avaliado o uso conjunto de *P. chlamydosporia* e *P. lilacinum*. As linhagens CG1006 e CG1044 (*P. c. var. catenulata*) e CG179, CG1038 (*P. lilacinum*) foram utilizadas para os estudos de associação de espécies. Toda a metodologia desta etapa é a mesma descrita acima para ovos (item 2.2). Os tratamentos em associação foram feitos com uma mistura de suspensões de cada espécie, na metade da concentração (5×10^5 esporos/mL por espécie), de modo a atingir a mesma quantidade de propágulos utilizada com as espécies isoladamente (1×10^6). Além do tratamento em mistura e do controle (apenas água destilada e espalhante adesivo), as espécies foram também aplicadas isoladamente. As condições experimentais e avaliações foram feitas como descrito no item anterior (item 2.2). O experimento de mistura de espécies foi repetido duas vezes em períodos diferentes. Também nesse caso os experimentos foram

analisados conjuntamente. Os dados de eclosão de J2 foram submetidos conjuntamente a análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$) através do programa Assistat 7.7.

3 RESULTADOS

3.1 Seleção *in vitro* de linhagens de *Pochonia chlamydosporia* e *Purpureocillium lilacinum* sobre ovos de *Meloidogyne enterolobii*

Durante a contagem de ovos para padronização da concentração da suspensão para aplicação nos poços, foi observada uma média de 84,2%, 13,2% e 2,6% na proporção de ovos, J1 e J2, respectivamente. A taxa de recuperação dos estádios do nematoide em cada poço, representada pela razão entre o número de ovos e J2 recuperados dos poços após 15 dias e o número de ovos inoculados nos poços, foi em média de 83,4% e o índice médio de eclosão de J2 observado nos tratamentos controle foi de 63%.

Nos experimentos com *P. chlamydosporia*, o percentual de eclosão de J2 no controle de foi de 69,3%. Apenas as linhagens CG1051, CG1043 e CG1007 não se diferenciaram do controle. A redução na eclosão de juvenis para os demais isolados variou entre 41,6% e 72,9%. As linhagens de *P. c. var catenulata* (CG1006 e CG1044) proporcionaram reduções superiores a 70% e estão entre as cinco melhores linhagens testadas. Dentre as linhagens de *P. c. var chlamydosporia*, CG1101 e CG1052 proporcionaram os maiores índices de controle (Tabela 3).

Tabela 3. Número de J2 de *Meloidogyne enterolobii* encontrados após exposição de ovos a diferentes isolados de *Pochonia chlamydosporia*.

Tratamentos	Média J2	% redução	
Testemunha	332,8 ± 18,7	-	A
CG1051	282,9 ± 13,7	15	A B
CG1043	230,3 ± 12,8	31	A B
CG1007	214,8 ± 12,1	35	A B
CG1074	194,3 ± 17,1	42	B
CG1003	193,3 ± 17,5	42	B
CG1039	173,3 ± 13,5	48	B
CG1046	164,0 ± 14,4	51	B C
CG1102	152,8 ± 18,9	54	B C
CG1041	149,0 ± 17,5	55	B C
CG1075	132,0 ± 12,7	60	B C
CG1050	127,0 ± 10,9	62	B C
CG1072	127,4 ± 17,7	62	B C
CG1045	123,5 ± 12,6	63	B C

CG1006	110,5 ± 14,7	67	C
CG1073	105,3 ± 16,0	68	C
CG1042	105,1 ± 22,2	70	C
CG1052	100,2 ± 8,5	70	C
CG1044	90,3 ± 15,7	73	C
CG1101	72,8 ± 8,3	78	C

Médias seguidas das mesmas letras não apresentam diferenças estatísticas pelo Teste de Tukey (5%).

De forma semelhante, o percentual de eclosão de J2 no tratamento controle dos experimentos com *P. lilacinum* foi de 59,6%. Todas as linhagens se diferenciaram da testemunha, proporcionando índices variáveis de redução de eclosão de J2, que variou entre 42% e 75%. As linhagens CG959, CG179 e CG1038 proporcionaram reduções superiores a 69% e estão entre os cinco melhores tratamentos. Redução semelhante foi observada para a linhagem CG348 de *I. ghanensis* isolada de solo. Contudo, essas linhagens se diferenciaram apenas dos isolados CG265 e CG1053 que apresentaram redução de 42% e 43%, respectivamente (Tabela 4).

Tabela 4. Número de J2 de *Meloidogyne enterolobii* encontrados após exposição de ovos a diferentes isolados de *Purpureocillium lilacinum*.

Tratamento	Média J2	% redução	
Testemunha	213,7 ± 12,2	-	A
CG265	124,9 ± 20,6	42	B
CG1053	122,3 ± 14,9	43	B
CG954	109,1 ± 7,5	49	B C
CG180	103,5 ± 9,0	52	B C
CG957	102,0 ± 7,5	52	B C
CG955	97,1 ± 11,7	55	B C
CG175	93,8 ± 10,3	56	B C
CG1068	87,4 ± 8,1	59	B C
CG313	86,6 ± 13,0	59	B C
CG177	86,3 ± 9,3	60	B C
CG953	82,9 ± 10,9	61	B C
CG303	78,8 ± 8,6	63	B C
CG1004	77,3 ± 7,8	64	B C
CG959	66,8 ± 7,0	69	C
CG179	58,5 ± 8,9	73	C
CG1038	57,0 ± 6,3	73	C
CG348	54,4 ± 4,1	75	C

Médias seguidas das mesmas letras não apresentam diferenças estatísticas pelo Teste de Tukey (5%).

3.2 Parasitismo de massas de ovos de *Meloidogyne enterolobii* por linhagens selecionadas de *Pochonia chlamydosporia* e *Purpureocillium lilacinum*

Observou-se uma grande diferença na eclosão de juvenis nos tratamentos controle entre os dois experimentos com *P. chlamydosporia*. Por isso, os experimentos foram analisados separadamente. Para *P. chlamydosporia* houve significativa variação nos índices de redução da eclosão de J2 entre os dois experimentos. No primeiro experimento, somente os isolados CG1006 e CG1044 diferenciaram do tratamento controle, reduzindo a eclosão de J2 em 73,1% e 51,3%, respectivamente (Figura 9A). Apesar dos tratamentos com *P. c. var chlamydosporia* terem causado uma diminuição superior a 35% na eclosão de J2, não houve diferença estatística em relação ao controle. No segundo experimento não foi observado diferença alguma entre os tratamentos (Figura 9B).

Nos experimentos realizados com *P. lilacinum*, a eclosão de juvenis nos tratamentos controle foi próxima (750 ± 115 e 990 ± 136 J2). No primeiro experimento os isolados CG179, CG1038 e CG348 diferenciaram da testemunha e apresentaram diminuição de 57,1%, 62,2% e 70,9% no número de juvenis eclodidos, respectivamente (Figura 10A). No segundo experimento (Figura 10B), apenas o isolado CG179 diferiu do controle, causando uma diminuição próxima aos resultados evidenciados no primeiro experimento (53,8%). O isolado CG959 apresentou um aumento no controle (47,1%) e os isolados CG1038 e CG348 mostraram um desempenho inferior (17,2% e 20,4%).

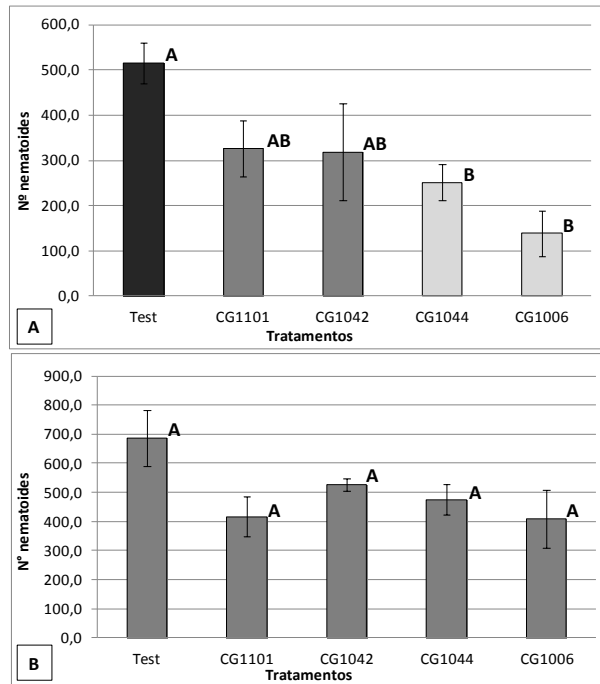


Figura 9. Número médio de J2 de *Meloidogyne enterolobii* obtidos a partir de massas de ovos expostas a isolados de *Pochonia chlamydosporia*. A) experimento 1; B) experimento 2.

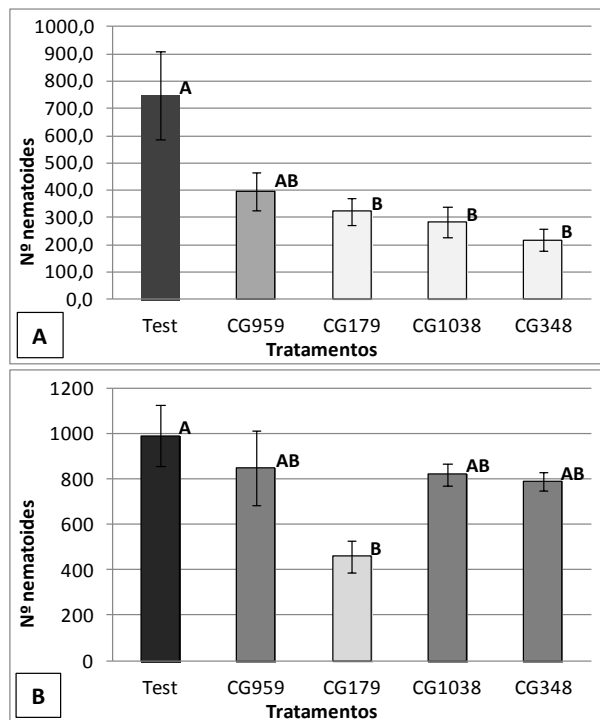


Figura 10. Número médio de J2 de *Meloidogyne enterolobii* obtidos a partir de massas de ovos expostas a isolados de *Purpureocillium lilacinum* e *Isaria ghanensis*. A) experimento 1; B) experimento 2.

3.3 Associação em mistura de linhagens selecionadas de *Pochonia chlamydosporia* e *Purpureocillium lilacinum* sobre ovos de *Meloidogyne enterolobii*

O percentual médio de eclosão de J2 no tratamento controle foi de 53,1%. As linhagens de *P. lilacinum* (CG1038 e CG179) apresentaram pior desempenho na redução da eclosão de J2 em relação às linhagens de *P. chlamydosporia* (CG1044 e CG1006), quando aplicados individualmente, embora, tenham proporcionado algum controle. A associação CG1044+CG179 não se diferenciou do controle, apresentando uma redução de apenas 23% na eclosão de J2 (Tabela 5). Os resultados obtidos com tratamentos com a linhagem CG1006 de *P. c. var catenulata*, aplicado de forma independente ou em combinação estão entre os que apresentaram melhor controle, variando de 60% a 73% de redução na eclosão de J2.

Tabela 5. Número de J2 de *Meloidogyne enterolobii* encontrados após exposição de ovos a linhagens de *Pochonia chlamydosporia* e *Purpureocillium lilacinum* em associação ou separadamente.

Tratamento	Média J2		% redução
Testemunha	296,0 ± 15,4	A	-
CG1044+CG179	229,1 ± 30,4	A B	23
CG1038	193,7 ± 26,9	B	35
CG179	170,4 ± 19,2	B	42
CG1044	130,0 ± 29,1	B C	56
CG1044+CG1038	125,8 ± 9,6	B C	57
CG1006+CG1038	117,8 ± 34,2	C	60
CG1006+CG179	105,2 ± 23,9	C	64
CG1006	81,1 ± 18,0	C	73

Médias seguidas das mesmas letras não apresentam diferenças estatísticas pelo Teste de Tukey (5%).



Figura 11. Ovos de *Meloidogyne enterolobii* parasitados por *Pochonia chlamydosporia*.



Figura 12. Juvenil de *Meloidogyne enterolobii* colonizado por *Pochonia chlamydosporia*.

4 DISCUSSÃO

A seleção de linhagens de agentes microbianos de controle de invertebrados é etapa inicial e indispensável no desenvolvimento de bioprodutos. A importância dessa etapa já foi demonstrada em diversos estudos de controle de algumas espécies de nematoides (Hidalgo-Díaz et al., 2000; Eapen et al., 2005; Santiago et al., 2006; Esteves et al., 2009; Dallemole-Giaretta et al., 2012). O presente estudo reforça a grande variabilidade genética que existe dentro das espécies dos fungos nematófagos *P. chlamydosporia* e *P. lilacinum*, e a necessidade de uma pré-seleção de linhagens quanto sua atividade biológica. Os resultados obtidos confirmam *P. chlamydosporia* e *P. lilacinum* como potenciais agentes de biocontrole de *M. enterolobii*. Ademais, trata-se do primeiro relato da suscetibilidade da espécie *M. enterolobii* ao fungo *P. lilacinum*.

O parasitismo de ovos de nematoides por fungos vem sendo amplamente relatado nas últimas décadas (Chen et al., 1996; Chen & Chen, 2003; Araújo et al., 2009; Araújo et al., 2012; Carvalho et al. 2010; Moosavi et al., 2010). Para tal, alguns parâmetros vêm sendo usados com o objetivo de medir a atividade biológica do microrganismo, especialmente os relacionados a alterações morfológicas no embrião, no cório do ovo e a presença de propágulos do fungo dentro e na superfície do ovo, vistos em microscópio óptico. Contudo, a redução da eclosão de juvenis após exposição dos ovos ao fungo, parâmetro utilizado nesse estudo, identifica mais precisamente o real potencial do microrganismo como agente de controle. Esse parâmetro utiliza como referência o número de J2 produzidos no tratamento controle (sem aplicação do fungo), que considera o potencial máximo de eclosão nas condições favoráveis fornecidas no experimento, e os compara com os demais tratamentos. A avaliação feita após 15 dias da inoculação dos ovos permitiu determinar a taxa de eclosão ótima, já que para as condições experimentais o desenvolvimento embrionário é de cerca de 15-20 dias. De fato, a metodologia sobre ágar-água proporcionou boa taxa de eclosão de J2 (de 59% a 73%), semelhante às observadas para os ovos em suspensão sob condições ótimas de incubação (26°C e 24 horas de escotofase por 15 dias e UR>95%). Cabe

ressaltar também, que a taxa de recuperação de ovos e juvenis sobre o ágar-água durante a avaliação foi satisfatória, permitindo determinar com precisão a eclosão de juvenis nos diferentes tratamentos e a atividade biológica dos fungos.

Na metodologia adotada nos experimentos *in vitro* com ovos e massas de ovos também foram apresentadas algumas modificações em relação às relatadas na literatura, mostrando ser uma metodologia prática e rápida para avaliação de um grande número de isolados. Na grande maioria dos estudos *in vitro*, a inoculação das linhagens sobre o ágar-água foi feita com discos de culturas, e os ovos ou massas aplicados nas placas (Chen et al., 1996; Eapen et al., 2005; Nunes, 2008; Carvalho et al., 2010; Moosavi et al., 2010). Nessas condições, células vegetativas (micélio) infectam os ovos durante o crescimento, que inclusive pode ser favorecido por nutrientes ainda disponíveis nos discos de cultura aplicados como inóculo. No presente estudo, a inoculação do fungo foi feita com uma suspensão de esporos com concentração conhecida e aplicada diretamente sobre ovos ou massas de ovos sobre o ágar-água. Em geral, produtos microbianos baseados em fungos para o controle de artrópodes apresentam esporos como ingrediente ativo (Faria & Wraight, 2007; Michereff-Filho et al., 2009), incluindo as formulações de *P. chlamydosporia* e *P. lilacinum* disponíveis no mercado cubano (Klamic[®]) (Hernández & Hidalgo-Díaz, 2008) e brasileiro (Nemat[®]) (Agrofit, 2015). Essa forma de aplicação melhor representa a interação que pode ocorrer entre ovos do nematoide no solo e o microrganismo em aplicações de um produto biológico. Adicionalmente, a padronização do inóculo e da forma de exposição do hospedeiro levam a menor variabilidade experimental e resultados mais comparativos.

Nunes (2008) observou uma colonização de ovos de *M. incognita* por *P. chlamydosporia* de 88%, enquanto que *P. lilacinum* colonizou 74%, após oito dias. De modo semelhante, Carvalho et al. (2010) observaram a ação de *P. lilacinum* em 79% dos ovos de *Toxocara canis* e linhagens de *P. chlamydosporia* apresentaram 74% e 82,5% de parasitismo no mesmo período do presente trabalho. A despeito das diferenças metodológicas e das espécies

de nematoides testadas, os resultados mais promissores alcançados são semelhantes aos observados no presente estudo (de 72,9% e 75% para *P. chlamydosporia* e *P. lilacinum*, respectivamente) e que confirmam a atividade biológica que essas duas espécies de fungos apresentam sobre ovos do nematoide.

O efeito sinérgico da mistura de linhagens de *P. chlamydosporia* e *P. lilacinum* não foi constatado no experimento de mistura. Em geral, o desempenho das linhagens de *P. chlamydosporia* aplicadas isoladamente foi semelhante ao controle proporcionado pela mistura com as linhagens de *P. lilacinum*, quando aplicadas em metade da dose para cada um dos componentes da mistura. Embora a linhagem CG1044 tenha apresentado uma redução numérica da eclosão de J2 superior a observada para a associação das linhagens CG1044 e CG179, o efeito antagônico também não ficou evidente, já que isso não ocorreu com as demais combinações. Curiosamente, observou-se em alguns tratamentos, juvenis sendo colonizados por fungo ao final do período experimental (Figura 12). Contudo, não é possível afirmar que houve uma infecção pelo patógeno e morte nessa fase de desenvolvimento do nematoide. *P. chlamydosporia* e *P. lilacinum* são relatados como parasita de ovos de nematoide e fêmeas sedentárias (Kerry, 1975; Freire & Bridge, 1985; Lopes-Llorca et al., 2002). Possivelmente, juvenis já mortos podem ter sido colonizados de forma saprofítica pelo patógeno. Khan et al. (2006) fizeram a mesma observação sobre a ação infectiva de *P. lilacinum*. Porém, neste caso a infecção ocorreu sobre nematoides adultos de *Radopholus similis*.

Assim como observado no presente estudo, Moosavi et al. (2010) relataram alta variabilidade entre isolados de *P. chlamydosporia* aplicados sobre massas de ovos, com variações entre 40% e 95% na colonização. Porém, esses autores observaram uma maior taxa de colonização quando comparado com os resultados de presente estudo. Possivelmente, o maior tempo de exposição dos ovos ao inóculo (3 semanas) ou a concentração de propágulos do fungo aplicada (não quantificado) promoveram maior infecção. Por outro lado, ovos inviáveis podem ter sido colonizados saprofiticamente e contabilizados em casos onde o critério de controle foi a avaliação visual da

estrutura colonizada. No presente estudo, uma maior precisão foi alcançada com a padronização do tamanho das massas, com a quantificação do inóculo aplicado e com a avaliação da taxa de eclosão de J2, mesmo com a variação intrínseca do número e taxa de eclosão de J2 em cada massa.

A variação na eclosão de juvenis entre os experimentos com *P. chlamydosporia* ocorreu possivelmente pela diferença da idade do inóculo (massas de ovos). Desta forma, o número de ovos em cada um dos grupos de massas e o desenvolvimento embrionário de grande parte dos ovos variou significativamente. Tal fato pode explicar a diferença na média de eclosão entre os experimentos e o efeito nulo das linhagens no segundo experimento, já que o fungo apresenta um parasitismo eficaz somente em ovos no estágios embrionários iniciais (Chen & Chen, 2003) (Figura 11). Carvalho et al. (2010) observaram, por exemplo, que em alguns ovos em estágio mais avançado houve a introdução de hifas pelo fungo mas não impediu o total desenvolvimento e eclosão do J2. Essa variação também foi constatada para os experimentos com *P. lilacinum* em que a taxa de eclosão nos tratamentos controle foi de $749,2 \pm 129,6$ e $991,1 \pm 136,6$ J2 para os experimentos 1 e 2.

5 CONCLUSÕES

- *P. chlamydosporia* e *P. lilacinum* são capazes de reduzir eclosão de J2 de *M. enterolobii*.
- A fase de desenvolvimento embrionário dos ovos interfere na eficácia da ação parasítica do fungo.
- A aplicação de linhagens de *P. chlamydosporia* e *P. lilacinum* em conjunto não aumenta o efeito de redução na eclosão de J2.
- A seleção *in vitro* indica o potencial de determinados isolados como agentes de biocontrole, porém, não substituem/excluem testes em condições de casa de vegetação e campo.

6 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ANASTASIADES, I. A.; GIANNAKOU, I. O.; PROPHETOU-ATHANASIADOU, D. A. & GOWEN, S. R. 2008. The combined effect of the application of a biocontrol agent *Paecilomyces lilacinus*, with various practices for the control of root-knot nematodes. *Crop Protection*. 27:352-361.
- ARAÚJO, J. M.; ARAÚJO, J. V.; BRAGA, CARVALHO, R. O.; SILVA, A. R. & CAMPOS, A. K. 2009. Interaction and ovicidal activity of nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* on *Taenia saginata* eggs. **Experimental Parasitology**. 121 :338–341.
- ARAÚJO, J. M.; ARAÚJO, J. V.; BRAGA, F. R.; ARAÚJO, D. M.; FERREIRA, S. R.; SOARES, F. E. F. & BENJAMIN, L. A. 2012. Survival of *Pochonia chlamydosporia* in the gastrointestinal tract of experimentally treated dogs. **Res. in Veterinary Science**, 93:803–806.
- ARÉVALO, J., SILVA, S. D., CARNEIRO, M. D. G.; LOPES, R. B.; CARNEIRO R. M. D. G.; TIGANO, M. S. & HIDALGO-DÍAZ, L. 2012a. *Pochonia chlamydosporia* (Goddard) Zare y Gams como potencial agente de control biológico de *Meloidogyne enterolobii* (Yang y Eisenback) en cultivos hortícolas. **Rev. Protección Vegetal**. 27(2) 123-129.
- ARÉVALO, J., SILVA, S. D., CARNEIRO, M. D. G.; LOPES, R. B.; CARNEIRO R. M. D. G.; TIGANO, M. S. & HIDALGO-DÍAZ, L. 2012b. Efecto de la presencia de abono orgánico sobre la actividad de *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* (Kamyschko ex Barron y Onions) Zare y Gams frente a *Meloidogyne enterolobii* Yang y Eisenback. **Rev. Protección Vegetal**. 27(3):167-173.
- ATKINS, S. D.; HIDALGO-DÍAZ, L.; CLARK, I. M.; MORTON, C. O.; MONTES DE OCA, N.; GRAY, P.A. & KERRY, B.R. 2003a. Approaches for monitoring the release of *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata*, a biocontrol agent of root-knot nematodes. **Mycol. Res.** 107 (2): 206–212.
- ATKINS, S. D.; HIDALGO-DIAZ, L.; KALISZ, H.; MAUCLINE, T.H.; HIRSCH, P. R. & KERRY, B. R. 2003b. Development of a new management strategy for the control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp) in organic vegetable Production. **Pest Management Science**. 59:183–189.
- BENT, E.; LOFFREDO, A.; MCKENRY, M. V.; BECKER, J. O. & BORNEMAN J. 2008. Detection and Investigation of Soil Biological Activity against *Meloidogyne incognita*. **Journal of Nematology**. 40(2):109–118.
- BENT, E.; LOFFREDO, A.; MCKENRY, M. V.; BECKER, J. O. & BORNEMAN J. 2008. Detection and Investigation of Soil Biological Activity against *Meloidogyne incognita*. **Journal of Nematology**. 40(2):109–118.

- BRAGA, F. R.; ARAÚJO, J. V.; CARVALHO, R. O.; SILVA, A. R.; ARAÚJO, J. M.; SOARES, F. E. F.; GENIÊR, H. L. A.; FERREIRA, S. R. & QUEIROZ, J. H. 2010. Ovicidal action of a crude enzymatic extract of the fungus *Pochonia chlamydosporia* against cyathostomin eggs. **Veterinary Parasitology**. 172:264–268.
- CARNEIRO, R. M. D. G.; HIDALGO-DÍAZ, L.; MARTINS, I.; SILVA, K. F. A. S.; SOUZA, M. G. & TIGANO, M. S. 2011. Effect of nematophagous fungi on reproduction of *Meloidogyne enterolobii* on guava (*Psidium guajava* L.) plants. **Nematology**. 13(6):721-728.
- CARVALHO, R. O.; ARAÚJO, J. V.; BRAGA, F. R.; ARAÚJO, J. M. & ALVES, C. D. F. 2010. Ovicidal activity of *Pochonia chlamydosporia* and *Paecilomyces lilacinus* on *Toxocara canis* eggs. **Veterinary Parasitology**. 169:123–127.
- CHEN, S. Y. & CHEN, F. J. 2003. Fungal Parasitism of *Heterodera glycines* Eggs as Influenced by Egg Age and Pre-colonization of Cysts by Other Fungi. **Journal of Nematology**. 35(3):271–277.
- CHEN, S. Y.; DICKSON, D. W. & MITCHELL D. J. 1996. Pathogenicity of Fungi to Eggs of *Heterodera glycines*. **Journal of Nematology**. 28(2):148-158.
- CUADRA, R.; PEREZ, J. A.; MACHADO, J.; VAZQUEZ, J. 1999. Effect of nemacur, terracur and furadan on root-knot nematodes in coffee plantations. **Revista de Proteccion Vegetal**. 14:111-115.
- DALLEMOLE-GIARETTA, R.; FREITAS, L. G.; CAIXETA, L. B.; XAVIER, D. M.; FERRAZ, S. & FABRY, C. F. S. 2011. Produção de clamidósporos de *Pochonia chlamydosporia* em diferentes substratos. **Ciênc. agrotec. Lavras**. 35(2):314-321.
- DALLEMOLE-GIARETTA, R.; FREITAS, L. G.; LOPES, E. A.; PEREIRA, O. L.; ZOOCA, R. J. F.; FERRAZ, S. 2012. Screening of *Pochonia chlamydosporia* Brazilian isolates as biocontrol agents of *Meloidogyne javanica*. **Crop Protection**. 42:102-107.
- DIAS, A. S.; ARAÚJO, J. V.; BRAGA, F. R.; ARAÚJO, J. M.; PUPPIN, A. C.; FERNANDES, F. M.; RAMOS, R. F.; BERTONCELI, R. M.; SILVA, R. G. & PERBONI, W. R. 2012. Biological control of *Fasciola hepatica* eggs with the *Pochonia chlamydosporia* fungus after passing through the cattle gastrointestinal tract. **Parasitol Res**. 110:663–667.
- DIAS, A. S.; ARAÚJO, J. V.; BRAGA, F. R.; PUPPIN, A. C. & PERBONI, W. R. 2013. *Pochonia chlamydosporia* in the biological control of *Fasciola hepatica* in cattle in Southeastern Brazil. **Parasitol Res**. 112:2131–2136.
- DONG, L. Q. & ZHANG, K. Q. 2006. Microbial control of plant-parasitic nematodes: a five-party interaction. **Plant Soil**. 288:31–45.

- EAPEN, S. J.; BEENA, B. & RAMANA, K.V. 2005. Tropical soil microflora of spice-based cropping systems as potential antagonists of root-knot nematodes. **Journal of Invertebrate Pathology**. 88:218-225.
- ESTEVEES, I.; PETEIRA, B.; ATKINS, S. D.; MAGAN, N. & KERRY, B. 2009. Production of extracellular enzymes by different isolates of *Pochonia chlamydosporia*. **Mycological Research**. 30:1-10.
- FARIA, M. R. & WRIGHT, S. P., 2007. Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biol. Control*. 43, 237-256.
- FREIRE, F. C. O. & BRIDGE, J. 1985. Parasitism of eggs, females and juveniles of *Meloidogyne inognita* by *Paecilomyces lilacinus* and *Pochonia chlamydosporia*. **Fitopatol. Bras.** 10:577–596.
- HERNÁNDEZ, M. A. & HIDALGO-DÍAZ, L. 2008. KlamiC®: BIONEMATICIDA AGRÍCOLA PRODUCIDO A PARTIR DEL HONGO *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata*. **Rev. Protección Veg.** 23(2):131-134.
- HIDALGO, L.; SÁNCHEZ, L. & GÓMEZ, L. 1998. *Verticillium chlamydosporium* Goddard, parasito de huevos de *Meloidogyne incognita*. **Rev. Protección Veg.** 13(1):29-30.
- HIDALGO-DÍAZ, L. 2000. Potencialidades de cepas autóctonas de *Verticillium chlamydosporium* (Goddard) como agente de control biológico de *Meloidogyne* spp. **Tesis en opción al grado de Doctor en Ciencias Agrícolas**. UNAH-CENSA. 100p.
- HIDALGO-DÍAZ, L.; BOURNE, J. M.; KERRY, B. R. & RODRÍGUES, M.G. 2000. Nematophagous *Verticillium* spp. in soils infested with *Meloidogyne* spp. in Cuba: isolation and screening. **International Journal of Pest Management**. 46(4):277-284.
- HIDALGO-DÍAZ, L.; BOURNE, J. M.; KERRY, B. R. & RODRÍGUEZ, M. G. 2000. Nematophagous *Verticillium* spp. in soils infested with *Meloidogyne* spp. in Cuba: isolation and screening. **International Journal of Pest Management**. 46(4):277-284.
- HUANG, X.; ZHAO, N. & ZHANG, K. 2004. Extracellular enzymes serving as virulence factors in nematophagous fungi involved in infection of the host. **Res. Microbiol.** 155:811–816.
- JACOBS, H.; GREY, S. N. & CRUMP, D. H. 2003. Interactions between nematophagous fungi and consequences for their potential as biological agents for the control of potato cyst nematodes. **Mycol. Res.** 107(1):47–56.
- KERRY, B. & HIDALGO-DÍAZ, L. 2004. Application of *Pochonia chlamydosporia* in the integrated control of root-knot nematodes on

organically grown vegetable crops in Cuba. **Multitrophic Interactions in the Integrated Control**. 27:123-126.

KERRY, B. R. 2000. Rhizosphere interactions and the exploitation of microbial agents for the biological control of plant-parasitic nematodes. **Ann. Rev. Phytopathol.** 38:423–41.

KERRY, B.R. 1975. Fungi and the decrease of cereal cyst-nematode populations in cereal monoculture. **EPPO Bulletin**. 5:353–361.

KHAN, A.; WILLIAMS, K. L. & NEVALAINEM, H. K. M. 2006. Infection of plant-parasitic nematodes by *Paecilomyces lilacinus* and *Monacrosporium lysipagum*. **BioControl**. 51:659–678.

KUMAR, G. B.; KUMAR, P. R.; SINGH, R. K.; CHAITALI, B. & LOKENDRA, S. 2006. Integrated application of some compatible biocontrol agents along with mustard oil seed cake and furadan on *Meloidogyne incognita* infecting tomato plants. **J Zhejiang Univ SCIENCE B**. 7(11):873-875.

DE LEIJ, F. A. A. M., and KERRY, B. R. 1991. The nematophagous fungus, *Verticillium chlamydosporium*, as a biological control agent for *Meloidogyne arenaria*. **Révue de Nematologie**. 14:157-194.

LOPEZ-LLORCA, L. V.; OLIVARES-BERNABEU, C.; SALINAS, J.; JANSSON, H. & KOLATTUKUDY, P. 2002. Pre-penetration events in fungal parasitism of nematode eggs. **Mycol. Res.** 106(4):499-506.

MANKAU, R. 1980. Biological control of nematode pests by natural enemies. **Ann. Rev. Phytopathol.** 18:415-40

MENSIN, S.; SOYTONG, K.; McGOVERN, R. J. & TO-ANUN, C. 2012. Selection of efficient nematophagous fungi against root-knot nematodes in the highland cultivated area. **Journal of Agricultural Technology**. 8(7):2259-2272.

MICHEREFF FILHO, M., FARIA, M., WRAIGHT, S. P., & SILVA, K. F. A. S., 2009. Micoínseticidas e micoacaricidas no Brasil: como estamos após quatro décadas? **Arq. Instituto Bio**. 76:769-779.

MOOSAVI, M.; ZARE, R.; ZAMANIZADEH, H. & FATEMY, S. 2010. Pathogenicity of *Pochonia* species on eggs of *Meloidogyne javanica*. **Journal of Invertebrate Pathology**. 104:125–133.

NUNES, H. T.. 2008. Agentes microbianos no controle de nematóides e fungos fitopatogênicos de soja e sua compatibilidade com agroquímicos. Tese (doutorado) - Univ. Est. Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal.

PATRÍCIO, F.C.; RIGITANO, R.L.O.; GOUVÊA, A.V. & FRANCO, A.A. 2002. Toxicidade do inseticida-nematicida aldicarbe às espécies de peixes *Brachydanio rerio* (HAMILTON–BUCHANAN, 1822) e *Orthospinus*

franciscensis (EIGENMANN, 1929). **Ciênc.agrotec.**, Lavras. 26(2):385-391.

- PETEIRA, B.; PUERTAS, A.; HIDALGO-DÍAZ, L. HIRSCH, P.; KERRY, B. & ATKINS, S. 2005. Real-time PCR to monitor and assess the efficacy of two types of inoculum of the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* against root-knot nematode populations in the field. **Biotecnología Aplicada**. 22(4):261-266.
- PIRES, D.X.; CALDAS, E.D. & RECENA, M.C.P. 2005. Intoxicações provocadas por agrotóxicos de uso agrícola na microrregião de Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil, no período de 1992 a 2002. **Cad. Saúde Pública**. Rio de Janeiro. 21(3):804-814.
- PISKIEWICZ, A. M.; DUYTS, H.; BERG, M. P.; COSTA, S. R. & PUTTEN, W. H. 2007. Soil microorganisms control plant ectoparasitic nematodes in natural coastal foredunes. **Oecologia**. 152:505–514.
- RITZINGER, C. H. S. P. & FANCELLI, M. 2006. Manejo integrado de nematóides na cultura da bananeira. **Rev. Bras. Frutic.** 28(2):331-338.
- ROBERTS, P. A., 1993. The future of nematology: integration of new and improved management strategies. **J. Nematol.** 25:383–394.
- RUMBOS, C. I. & KIEWNICK, S. 2006. Effect of plant species on persistence of *Paecilomyces lilacinus* strain 251 in soil and on root colonization by the fungus. **Plant and Soil**. 283:25-31,
- SANTIAGO, D. C.; HOMECHIN, M.; SILVA, J. F. V.; RIBEIRO, E. R.; GOMES, B. C.; SANTORO, P. H.. 2006. Seleção de isolados de *Paecilomyces lilacinus* (Thom.) Samson para controle de *Meloidogyne paranaensis* em tomateiro. **Ciência Rural**. 36(4):1055-1064.
- SANTOS, M. C. V.; ESTEVES, I. & ABRANTES, I. 2012. *In vitro* water stress bioassays with the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia*: Effects on growth and parasitism. **Biological Control**. 63:310–319.
- SIDDIQUI, Z. A. & AKHTAR, M. S. 2009. Effects of antagonistic fungi and plant growth-promoting rhizobacteria on growth of tomato and reproduction of the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. **Australasian Plant Pathology**. 38:22–28.
- SIKORA, R. A. 1992. Management of the antagonistic potential in agricultural ecosystems for de biological control of plant parasitic nematodes. **Ann. Rev. Phytopathol.** 30:245-70
- SIKORA, R. A.; POCASANGRE, L.; FELDE, A.; NIERE, B.; VU, T. T. & DABABAT, A. A. 2008. Mutualistic endophytic fungi and in-planta suppressiveness to plant parasitic nematodes. **Biological Control**. 46:15–23.

- SOARES, F. E. F.; BRAGA, F. R.; ARAÚJO, J. V.; LIMA, W. S.; MOZER, L. R. & QUEIRÓZ, J. H. 2012. In vitro activity of a serine protease from *Monacrosporium thaumasium* fungus against first-stage larvae of *Angiostrongylus vasorum*. **Parasitol Res.** 110:2423–2427.
- TOBIN, J. D.; HAYDOCK, P. P. J.; HARE, M. C.; WOODS, S. R. & CRUMP, D. H. 2008. Effect of the fungus *Pochonia chlamydosporia* and fosthiazate on the multiplication rate of potato cyst nematodes (*Globodera pallida* and *G. rostochiensis*) in potato crops grown under UK field conditions. *Biological Control* 46:194-201.
- VERDEJO-LUCAS, S.; SORRIBAS, F. J.; ORNAT, C. & GALEANO, M.. 2003. Evaluation *Pochonia chlamydosporia* in a double-cropping system of lettuce and tomato in plastic house infested with *Meloidogyne javanica*. **Plant Pathol.** 52:521–528.
- WANG, J.; WANG, J.; LIU, F. & PAN, C. 2010. Enhancing the virulence of *Paecilomyces lilacinus* against *Meloidogyne incognita* eggs by overexpression of a serine protease. **Biotechnol Lett.** 32:1159–1166

CAPÍTULO II

Avaliação de isolados de *Pochonia chlamydosporia* e *Purpureocillium lilacinum* selecionados *in vitro* para o controle de *Meloidogyne enterolobii* em cultivos de ciclo curto e longo.

1 INTRODUÇÃO

As estratégias de manejo de fitonematoides prioritárias são aquelas que diminuem custos, aumentam a produção e não agridem o ambiente. O uso de variedades resistentes e outros manejos culturais, como cultivos intercalares e a cobertura do solo, vem sendo muito utilizados por reduzir a população dos nematoides (Ritzinger & Fancelli, 2006). O uso de nematicidas químicos ainda é o método mais utilizado para o controle de fitonematoides e uso indiscriminado, além de onerar a produção, coloca em risco a saúde dos aplicadores, consumidores e pode exercer forte pressão de seleção sobre os organismos presentes no solo, induzindo à resistência a agrotóxicos (Huang et al., 2004).

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) é uma cultura anual e está entre as mais cultivadas dentre as hortaliças. O Brasil ocupa o oitavo lugar no ranking da produção mundial desta hortaliça (DIEESE, 2010), com uma produção estimada de, aproximadamente, quatro milhões de toneladas distribuídas em 59 mil hectares (IBGE, 2013). Na produção de frutas, a bananeira (*Musa* spp.) é uma das principais culturas perenes em exploração no Brasil, corresponde a 16,5% do volume de produção nacional (IBGE, 2010). No mercado mundial, com uma produção superior a 130 milhões de toneladas (2011), o Brasil ficou em quinto lugar alcançando, aproximadamente, 7,3 milhões de toneladas (FAO, 2013). Ambas as culturas apresentam grande importância econômica nacional e mundial. Porém, sofrem com a ação de fitonematoides, reduzindo a produção e causando prejuízo para os produtores.

O tomateiro tem os fitonematoides como um de seus principais patógenos do sistema radicular, sendo o gênero *Meloidogyne* o mais importante (Taylor & Sasser, 1983; Eisenback & Triantaphyllou, 1991;

Cofcewicz et al., 2004; Westerich et al., 2012). Em cultivos de bananeira os danos causados por esse fitonematoide são diretamente proporcionais ao aumento de suas populações, causando redução do tamanho e do peso de frutos, atraso na maturação dos cachos, pouco perfilhamento e morte das plantas (Claudio & Davide, 1967; Davide & Marasigan, 1992; Patel et al., 1996; Costa et al., 1997; 1998). No Brasil, a resistência genética tem sido considerada a medida de controle mais econômica e viável (Costa et al., 1998; Boas et al., 2002). Porém, embora haja citações de cultivares de banana com tolerância ou resistência a *M. incognita* e/ou *M. javanica*, nem sempre são opções bem recebidas pelo produtor (Costa et al., 1998; Boas et al., 2002; Pinto et al., 2005). Devido ao grande número de cultivares de *Musa*, há ainda carência de informação sobre reação de diversas cultivares com resistência genética a esses nematoides (Jesus & Wikcken, 2009). Com isso, o controle químico ainda continua sendo o método mais utilizado para o controle de fitonematoides nessa cultura (Bridge, 2000).

Nessa busca pela redução de populações de fitonematoides, o controle biológico vem ganhando espaço (Lehr, 2010; Glare et al., 2012). Dentre os agentes de biocontrole, destacam-se os fungos parasitas de ovos e fêmeas de fitonematoides formadores de galhas e cistos (Lopes-Llorca et al., 2002). As espécies mais estudadas de fungos são *Pochonia chlamydosporia* [= *Verticillium chlamydosporium*] (Goddard) Zare & Gams e *Purpureocillium lilacinum* [= *Paecilomyces lilacinus*] (Thom) Samson, principalmente para uso no manejo desses nematoides em cultivos diversos (Kerry, 1975; Freire & Bridge, 1985; Hidalgo-Díaz et al., 1998; Hidalgo-Díaz, 2000; Atkins et al., 2003a; Atkins et al., 2003b; Jacobs et al., 2003; Kumar et al., 2006; Santiago et al., 2006; Anastasiades et al., 2008; Tobin et al., 2008; Siddiqui & Akhtar, 2009; Carneiro et al., 2011). A facilidade de produção massal *in vitro* (Kerry & Hidalgo-Díaz, 2004; Dallemore-Giaretta et al., 2011) e a capacidade de colonizar a rizosfera (De Leij & Kerry, 1991; Peteira et al., 2005; Rumbos & Kiewnick, 2006; Arévalo et al., 2012a) tornam essas espécies agentes microbianos com potencial para utilização no controle dos fitonematoides.

Informações básicas são essenciais para o desenvolvimento de estratégias e seleção de agentes para o biocontrole. Para a obtenção de linhagens que apresentem um bom controle de fitonematoides, diversos estudos vêm sendo conduzidos em casa de vegetação (Cabanillas & Barker, 1989; Sikora, 1992; Kerry, 2000; Verdejo-Lucas et al., 2003; Peteira et al., 2005; Santiago et al., 2006; Puertas & Hidalgo-Díaz, 2007; Silva & Krasuski, 2012; Sabet et al., 2013), etapa preliminar no desenvolvimento de bionematicidas. Estudos dessa natureza apresentam resultados relativamente rápidos e próximos da realidade em campo. Entre eles incluem a colonização da rizosfera pelo fungo (Peteira et al., 2005; Arévalo et al., 2012b), ação direta de parasitismo de ovos, massas de ovos e/ou fêmeas pelo agente de controle (Freire & Bridge, 1985; Lopes-Llorca et al., 2002; Arévalo et al., 2012a; Dallemole-Giaretta et al., 2012; Sabet et al., 2013) e ação endofítica (Maciá-Vicente et al., 2009b; Arévalo et al., 2012a).

Estudos feitos com *P. chlamydosporia* e *P. lilacinum* vem apresentando reduções significativas nas populações de fitonematoides em culturas anuais (Walters & Barker, 1994; Siddiqui & Futai, 2009; Arévalo et al., 2012b; Dallemole-Giaretta et al., 2012). No entanto, não são suficientes para reduzir o índice de galhas após gerações consecutivas (Carneiro et al., 2011). Por isso, é imprescindível a determinação da eficácia de agentes de controle biológico depois de mais de uma geração do nematoide (De Leij et al., 1993; Bourne et al., 1994; Bourne & Kerry, 1999), especialmente em culturas perenes.

O presente estudo tem como objetivo avaliar a ação de linhagens de *Pochonia chlamydosporia* e *Purpureocillium lilacinum* selecionadas *in vitro* (Capítulo I) para o controle de *Meloidogyne enterolobii* em cultivo de ciclo curto (tomate) e longo (banana) em casa de vegetação, mediante aplicação desses microrganismos na redução do número de ovos de *M. enterolobii*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Análise do solo

Para os experimentos em casa de vegetação, foi utilizada uma mistura de latossolo e areia lavada estéreis e composto orgânico na proporção de 1:1:2, respectivamente. Foi realizada a análise microbiológica, prévia e ao final de cada experimento, do substrato por meio da coleta de oito subamostras de 1 g para análise da composição microbiana. Cada amostra foi suspensa em 9 mL de água destilada estéril com espalhante adesivo (Tween 80 - 0,05%) e levadas ao vortex (1 min), ultrassom (2 min) e vortex (1 min) para homogeneização. Para avaliação da presença de *Pochonia chlamydosporia* e *Purpureocillium lilacinum* no substrato, a suspensão original foi diluída, aplicada em meio semi-seletivo (Chase et al., 1986; De Leij & Kerry, 1991) e estimado o número de unidades formadoras de colônia (UFC) conforme metodologia descrita por Kerry & Bourne (2002). Também se utilizou meio BDA, para contagem de bactérias e fungos totais. Para essa contagem, foram inoculados 10 µL das diluições 10^{-3} e 10^{-4} para contagem de fungos, e 10 µL das diluições 10^{-5} e 10^{-6} para a contagem de bactérias. Após plaqueamento as placas foram levadas a BOD ($25\pm 1^\circ\text{C}$ e 12 horas de fotofase). A contagem de microrganismos totais (bactérias e fungos) foi realizada quatro dias após inoculação (DAI) e, para a observação da presença de *Pochonia* spp. e *Purpureocillium* sp., a leitura foi feita ao décimo DAI.

2.2 Produção de inóculo dos fungos *Pochonia chlamydosporia* e *Purpureocillium lilacinum* para bioensaios em casa de vegetação

A obtenção do inóculo dos fungos para aplicação no solo (vasos) foi feita a partir de um processo de fermentação bifásica. Na primeira fase (fermentação líquida), três discos com 3 mm de diâmetro cada foram retirados de culturas do fungo em meio BDA (batata + dextrose + ágar) com 12 dias de idade ($25\pm 1^\circ\text{C}$ e 12 horas de fotofase), colocados em Erlenmeyers contendo 200 mL de caldo de arroz (30 g de arroz/L de água, ferver por 10 min e autoclavar) e levados ao agitador orbital (150 rpm, $25\pm 1^\circ\text{C}$) por três dias. Com a primeira fase completa, foram inoculados 15 mL do caldo fermentado em

sacolas contendo 100 g de arroz pré-cozido autoclavado. Dando início à segunda fase (fermentação sólida), que teve duração de 10 e 21 dias para os isolados de *P. lilacinum* e *P. chlamydosporia*, respectivamente. Obtido o arroz colonizado, o material foi lavado em água destilada com espalhante adesivo (Tween 80 - 0,05%) e as concentrações das caldas de aplicação estimada em câmara de Neubauer para 50.000 propágulos viáveis/g de solo em 15 mL. No caso do produto biológico Rizotec[®] (*P. c. var. chlamydosporia* Pc-10 – Rizoflora Biotecnologia, Viçosa, MG, Brasil) (Bettioli et al., 2012), foi feita a diluição de 1 g do produto e contabilizado o número de unidades formadoras de colônia e a suspensão foi padronizada para a mesma concentração. A aplicação foi feita em covas no momento do transplante das mudas (itens 2.4 e 2.5).

2.3 Preparo da suspensão de ovos de *Meloidogyne enterolobii*

A suspensão de ovos de *M. enterolobii* foi preparada a partir de raízes de tomateiro infectadas. Após três meses em casa de vegetação, as raízes foram lavadas cuidadosamente, cortadas e trituradas em liquidificador com hipoclorito de sódio (NaOCl) 0,5% por 1 minuto a baixa rotação. Em seguida, o triturado foi passado em peneiras sobrepostas de 20, 100 e 500 mesh. Os resíduos da peneira de 500 mesh foram lavados com água corrente e coletados em um béquer. A suspensão de ovos obtida (sem lavagem posterior) foi quantificada e padronizada de acordo com a concentração desejada para utilização nos ensaios em casa de vegetação (Boneti & Ferraz, 1981).

2.4 Potencial de controle de *M. enterolobii* por linhagens pré-selecionadas de *P. chlamydosporia* e *Purpureocillium lilacinum* em cultivos de ciclo curto (tomateiro) e longo (bananeira)

Foram utilizados os isolados CG1006 (*P. c. var. catenulata*), CG1044 (*P. c. var. catenulata*, ingrediente ativo do produto Klamic[®] - Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), La Habana, Cuba, Hernández & Hidalgo-Díaz, 2008), CG179 (*P. lilacinum*) e o produto comercial Rizotec[®] a base de *P. c. var. chlamydosporia* desenvolvido na Universidade Federal de Viçosa (UFV) e em fase de registro.

2.4.1 Cultivo de ciclo curto - Tomate

Sementes do tomateiro (cv. 'Santa Clara') foram plantadas em bandejas de 128 células para a produção de mudas contendo substrato orgânico. Tendo alcançado um tamanho médio de 10 cm foi feita a inoculação do fungo na cova (50.000 propágulos/g de solo – item 2.2) e o transplante das mudas para os vasos (3 L), contendo o substrato composto descrito no item 2.1. Quinze dias após a inoculação do fungo foi feito o estaqueamento dos tomateiros e a inoculação da suspensão de ovos de *Meloidogyne* (item 2.3) na concentração de 10.000 ovos/planta. A suspensão de ovos foi aplicada ao redor de cada planta. O experimento foi realizado com 9 repetições em cada tratamento distribuídas aleatoriamente na casa de vegetação. As plantas foram irrigadas periodicamente e aplicações de adubo químico foram feitas quando necessário. Três meses após a inoculação do nematóide foi feita a coleta das raízes para avaliação da persistência dos fungos no solo, peso fresco da raiz (PF), índice de galhas (IG), índice de massas (IM) e fator de reprodução (FR).

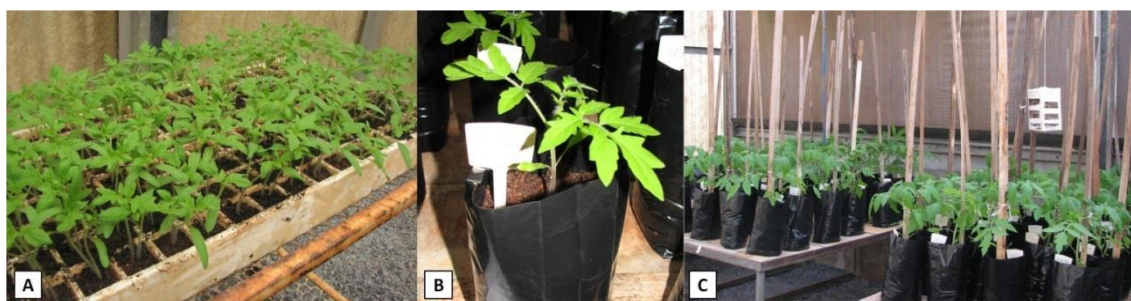


Figura 13. A) Mudanças de tomateiro; B) Vaso com a planta 10 dias após inoculação do fungo e transplante; C) Mesa com os tratamentos distribuídos aleatoriamente após inoculação dos ovos de *M. enterolobii* e estaqueamento.

2.4.2 Cultivo de ciclo longo - Bananeira

Mudas de bananeira (cv. 'Terra') produzidas na Embrapa Mandioca e Fruticultura (CNPMPF) com tamanho médio de 10 cm (Figura 14A) passaram

pelos mesmos procedimentos de transplante e inoculação de fungo e ovos de nematoide feitos para a cultura do tomate, alterando apenas o volume dos vasos (5 L). A proporção de propágulos dos fungos por grama de solo foi a mesma utilizada no experimento com tomate (item 2.4.1). O experimento foi realizado com 9 repetições de cada tratamento e as plantas distribuídas aleatoriamente na casa de vegetação. As plantas foram irrigadas diariamente e aplicações de adubo químico foram feitas conforme necessidade. Doze meses após a inoculação da suspensão de ovos foi feita a coleta das raízes. Nesse experimento foram feitas as análises de persistência dos fungos no solo, peso fresco de raízes (PF), número de ovos e fator de reprodução (FR). O índice de galhas (IG) e índice de massas de ovos (IM) não foi avaliado pelo fato das galhas e massas serem internas em raízes de bananeira.



Figura 14. A) Muda de bananeira ‘Terra’ (10 cm); B) Vaso com a muda após inoculação do fungo e transplante; C) Mesa com os tratamentos distribuídos randomicamente.

2.5 Efeito de linhagens de *P. chlamydosporia* e *P. lilacinum* sobre *M. enterolobii* em plantas submetidas à alta e baixa infestação do nematóide

Foram utilizados os isolados CG1006 (*P. c.* var. *catenulata*) e CG179 (*P. lilacinum*) para avaliação do controle do nematoide exercido pelos fungos em diferentes densidades populacionais. A metodologia utilizada foi a mesma descrita no item 2.3, alterando apenas as concentrações dos inóculos do

nematoide. Para cada um dos tratamentos, foram utilizadas as concentrações de 500 e 5.000 ovos/planta. O experimento foi realizado com 9 repetições em cada tratamento distribuídas aleatoriamente na casa de vegetação. As plantas foram irrigadas periodicamente e aplicações de adubo químico foram feitas quando necessário. Três meses após a inoculação do nematóide foi feita a coleta das raízes para avaliação da persistência dos fungos no solo, peso fresco da raiz (PF), índice de galhas (IG), índice de massas (IM) e fator de reprodução (FR).

2.6 Avaliação dos experimentos em casa de vegetação

As raízes foram coletadas e lavadas cuidadosamente (Figura 15) em água corrente para retirada dos restos de solo e processadas conforme descrito a seguir para avaliar atividade exercida pelos fungos sobre as massas de ovos e solo e o controle efetivo medido através da reprodução do nematoide.



Figura 15. Raízes de tomateiro (A) e bananeira (B) infectadas com *M. enterolobii* coletadas e lavadas para avaliação.

2.6.1 Presença dos fungos nas raízes e colonização de massas de ovos

Após lavagem das raízes foram coletados, aleatoriamente, 20 fragmentos de raiz com 2 cm de comprimento cada e 20 massas de ovos para avaliação da atividade endofítica e colonização das massas pelo fungo. Os

fragmentos de raiz foram limpos em hipoclorito (2%) por 30 seg. e em água estéril por 1 min para a eliminação de qualquer microrganismo presente na superfície externa e colocados em placas contendo ágar-água (1,5%). De forma semelhante, as massas foram colocadas em água estéril e posteriormente em placas de Petri contendo ágar-água. A confirmação da presença do fungo nas raízes e nas massas foi confirmada 10 dias após incubação das placas ($25\pm 1^\circ\text{C}$ e 12 horas de fotofase). Esse procedimento foi realizado apenas para os experimentos com tomateiro.

2.6.2 Persistência dos fungos no solo

Por ocasião da retirada das raízes, amostras de solo da rizosfera foram coletadas das diferentes repetições e levadas para análise individual da colonização do solo pelo fungo, conforme metodologia descrita no item 2.1.

2.6.3 Avaliação da população de nematoides

Os índices de galhas (IG) e massas de ovos (IM) foram analisados de acordo com a escala proposta por Taylor e Sasser (1978) (0 = 0; 1 = 1 a 2; 2 = 3 a 10; 3 = 11 a 30; 4 = 31 a 100; e 5 = mais de 100 galhas ou massas de ovos por planta). Em seguida, os sistemas radiculares foram triturados em liquidificador em solução de hipoclorito de sódio (NaOH) a 1,0% para extração dos ovos do nematoide (Boneti & Ferraz, 1981) que, posteriormente, foram quantificados em lâmina de Peters, sob microscópio ótico e determinados os fatores de reprodução ($FR = \text{população final/população inicial}$) do nematoide (Oostenbrink, 1966).

3 RESULTADOS

3.1 Colonização do solo e raízes de tomateiro e bananeira pelos fungos *P. chlamydosporia* e *P. lilacinum* em casa de vegetação

A produção média de propágulos dos isolados CG179 (*P. lilacinum* - conídios), CG1006 e CG1044 (*P. chlamydosporia* var. *catenulata* - conídios e clamidósporos) observada no sistema de fermentação bifásica, foi de $1,0 \times 10^9$, $2,0 \times 10^8$ e $1,5 \times 10^7$ propágulos por grama de substrato colonizado, respectivamente. No caso do produto Rizotec[®] (*P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* - conídios e clamidósporos), 1 g do formulado continha 3×10^7 propágulos. A proporção média de clamidósporos em relação ao total de propágulos para as linhagens de *P. chlamydosporia* foi de 0,01% (CG1006), 10,1% (CG1044) e 17% (Rizotec[®]).

Na análise inicial (antes do plantio) do substrato composto utilizado nos experimentos, a presença de fungos e bactérias totais foi de $3,1 \times 10^4$ e $8,3 \times 10^6$ UFC/g de solo, respectivamente. Não foi observada a presença de *P. chlamydosporia* ou *P. lilacinum* no substrato composto antes da aplicação e nos vasos dos tratamentos controle por ocasião da avaliação. A avaliação de colonização do solo pelo isolado de *P. lilacinum* não foi realizada, a presença de agentes contaminantes impediram a contagem de UFCs. Os vasos tratados com o produto Rizotec[®] apresentaram maior número de UFC/g de solo (Tabela 6), nos cultivos do tomateiro e bananeira. No experimento realizado em bananeira (item 2.4.2), o número de UFC foi em média próximo à metade quando comparado aos realizados em tomateiro para todos os tratamentos (item 2.4.1). Não foi observado ação endofítica nas raízes de tomateiro.

Tabela 6. Número de Unidades Formadoras de Colônia (UFC/g de solo) dos experimentos em cultura de ciclo curto (tomateiro) e longo (bananeira) e de tomateiro sob baixa e alta infestação de *M. enterolobii*.

Tratamento	UFC/g de solo			
	Exp.I	Exp.II	Exp.III	
	Cultivo ciclo curto (tomateiro)	Cultivo ciclo longo (bananeira)	Densidade de ovos (tomateiro)	
			500 ovos	5000 ovos
CG1006	2.802,2±433,2 Ab	1.602,2±214,3 Aa	3.056±455,1 b	3.112±469,4 b
CG1044	3.812,0±359,9 Ab	2.142,6±199,6 Aa	-	-
Rizotec®	12.162,5±2676,5 Bb	5.783,5±1087,4 Ba	-	-
CG179	- *	- *	- *	- *

Médias seguidas das mesmas letras (maiúsculas na coluna e minúsculas na linha) não apresentam diferenças estatísticas pelo Teste de Tukey (5%). *A colonização do solo pelo isolado não pode ser avaliada.

3.2 Potencial de controle de *M. enterolobii* por linhagens pré-selecionadas de *P. chlamydosporia* e *Purpureocillium lilacinum* em cultivos de ciclo curto (tomateiro) e longo (bananeira)

3.2.1 Cultivo de ciclo curto - tomateiro

Os tratamentos onde foram empregadas as linhagens de *P. chlamydosporia* e *P. lilacinum* não se diferenciaram do tratamento controle quanto a todos os parâmetros avaliados (Tabela 7 e Figura 5). O fator de reprodução (FR) de todos os tratamentos foi superior a 8. Nos dois experimentos realizados com tomateiro (Figura 16), foi observada colonização por *P. chlamydosporia* de 15, 20, 25,5 e 0% das massas de ovos para as linhagens CG1006, CG1044, Rizotec® e CG179, respectivamente.

Tabela 7. Efeito de *P. chlamydosporia* e *P. lilacinum* na reprodução de *M. enterolobii* em tomateiro após 3 meses. Inóculo inicial = 10.000 ovos.

Tratamento	Peso raiz (g)	IG	IM	FR
Testemunha	14,4 ^A	4,7 ^A	4,7 ^A	9,7 ^A
CG1006	17,7 ^A	5,0 ^A	4,7 ^A	8,7 ^A
CG1044	12,7 ^A	5,0 ^A	5,0 ^A	9,2 ^A
Rizotec®	12,8 ^A	4,8 ^A	4,6 ^A	9,1 ^A
CG179	14,0 ^A	5,0 ^A	5,0 ^A	11,0 ^A

Médias seguidas das mesmas letras na coluna não apresentam diferenças estatísticas pelo Teste de Tukey (5%). IG = índice de galhas; IM = índice de massas; FR = fator de reprodução.



Figura 16. Cadeia de conídios de *P. chlamydosporia* var. *catenulata* encontrada em massas de ovos de *M. enterolobii*.

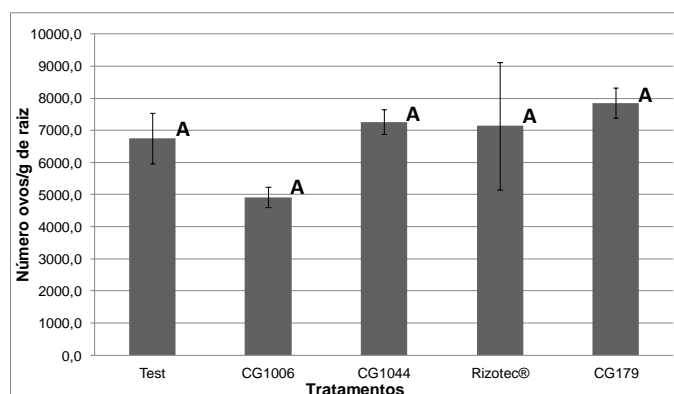


Figura 17. Efeito de *P. chlamydosporia* e *P. lilacinum* na produção de ovos de *M. enterolobii* em tomateiro após 3 meses.

3.2.2 Cultura de ciclo longo - banana

Foi observada uma alta suscetibilidade da bananeira ao nematoide. Todos os tratamentos apresentaram FR superior a 100 (Tabela 8). No entanto, as plantas tiveram um bom desenvolvimento (Figura 18), mostrando a tolerância dessa cultivar ao nematoide. Apenas a linhagem CG1006 se diferenciou da testemunha, apresentando FR de 135,2 (Tabela 3) e uma redução de 33,1% no número de ovos (Figura 19). Apesar de não diferirem da testemunha, os tratamentos CG1044, Rizotec[®] e CG179 apresentaram uma redução de 19,3%, 19% e 11,6% no número de ovos, respectivamente. Não houve diferença estatística entre o peso das raízes dos tratamentos.

Tabela 8. Efeito de *P. chlamydosporia* e *P. lilacinum* na produção de ovos de *M. enterolobii* em bananeira após 12 meses. Inóculo inicial = 10.000 ovos.

Tratamento	Peso raiz (g)	FR
Testemunha	471,1 ^A	201,9 ^A
CG1006	455,7 ^A	135,2 ^B
CG1044	456,7 ^A	163,0 ^{AB}
Rizotec [®]	472,7 ^A	163,6 ^{AB}
CG179	418,3 ^A	178,4 ^{AB}

Médias seguidas das mesmas letras na coluna não apresentam diferenças estatísticas pelo Teste de Tukey (5%).



Figura 18. Bananeiras inoculadas com *M. enterolobii* e tratadas com os fungos ao sexto mês após inoculação.

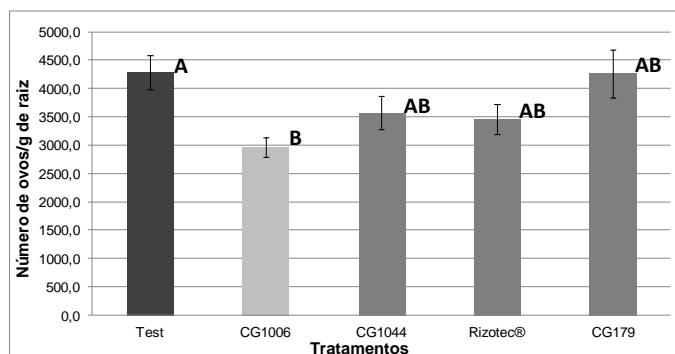


Figura 19. Efeito de *P. chlamydosporia* e *P. lilacinum* na produção de ovos de *M. enterolobii* em bananeira 12 meses após inoculação.

3.3 Potencial ovicida de isolados de *P. chlamydosporia* e *P. lilacinum* no controle de *M. enterolobii* em plantas submetidas à alta e baixa infestação

Os tratamentos não apresentaram diferença estatística nos IG e IM (Tabela 9). Os isolados CG1006 e CG179 causaram uma redução de 33,6% e 44,2% ovos nos tratamentos sob baixa infestação (Figura 20). Porém, apenas o CG179 apresentou diferença estatística em relação à testemunha sob mesma condição de inóculo. Sob alta infestação não houve redução no número de ovos. Embora os FRs dos tratamentos com inóculo 5000 tenham apresentado

valores mais baixos, o número de ovos produzidos por grama de raiz foi superior, o que demonstra maior nível de doença (Figura 8).

Tabela 9. Efeito dos isolados CG1006 (*P. chlamydosporia*) e CG179 (*P. lilacinum*) no biocontrole de *M. enterolobii* em tomateiro sob alta (5000 ovos) e baixa (500 ovos) infestação.

	Tratamento	Peso raiz (g)	IG	IM	FR
500 ovos	Testemunha	22,8 ^A	4,9 ^A	5,0 ^A	22,3 ^A
	CG1006	22,3 ^A	4,8 ^A	4,8 ^A	14,8 ^A
	CG179	24,4 ^{AB}	4,9 ^A	4,9 ^A	12,4 ^A
5000 ovos	Testemunha	36,6 ^B	5,0 ^A	5,0 ^A	5,3 ^B
	CG1006	30,3 ^{AB}	4,9 ^A	5,0 ^A	5,5 ^B
	CG179	29,9 ^{AB}	4,9 ^A	5,0 ^A	5,2 ^B

Médias seguidas das mesmas letras na coluna não apresentam diferenças estatísticas pelo Teste de Tukey (5%).

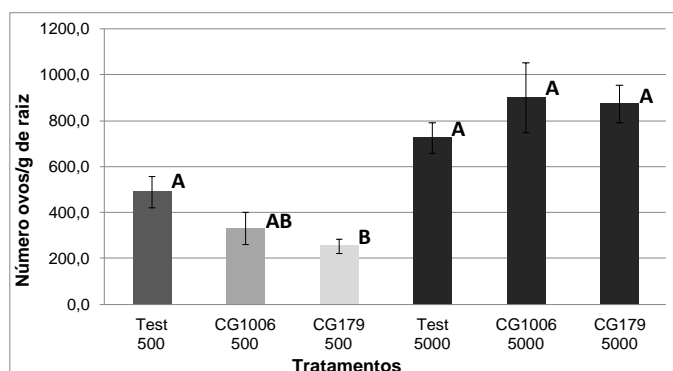


Figura 20. Efeito dos isolados CG1006 (*P. chlamydosporia*) e CG179 (*P. lilacinum*) na produção de ovos de *M. enterolobii* em tomateiro sob alta (5000 ovos) e baixa (500 ovos) infestação. Análise feita dentro do fator densidade de infestação.

4 DISCUSSÃO

O entendimento da interação planta-nematoide-fungo na rizosfera é determinante para o desenvolvimento de bioprodutos a base de fungos nematófagos como *P. chlamydosporia* e *P. lilacinum*. A importância dos fungos nematófagos já foi demonstrada em diversos estudos de controle de algumas espécies de nematoides (De Leij & Kerry, 1991; Peteira et al., 2005; Santiago et al., 2006; Puertas & Hidalgo-Díaz, 2007; Moosavi et al., 2010; Arévalo et al., 2012a; Arévalo et al. 2012b). O presente estudo reforça que apesar da necessidade de se realizar avaliações *in vitro* para obtenção de linhagens mais ativas, estudos em casa de vegetação são necessários para uma avaliação mais adequada da ação do bioagente sobre o alvo. Embora algumas linhagens de *P. chlamydosporia* e *P. lilacinum* tenham mostrado bom parasitismo de ovos nos testes *in vitro* (Capítulo 1), seu efeito na redução da população e reprodução do nematoide sob alta infestação das raízes foi em geral muito reduzido, considerando a quantidade de propágulos dos fungos aplicada nas plantas.

O parasitismo de ovos de nematoides por fungos vem sendo amplamente relatado nas últimas décadas (Chen et al., 1996; Chen & Chen, 2003; Araújo et al., 2009; Carvalho et al. 2010; Moosavi et al., 2010; Araújo et al., 2012). A redução no número de ovos produzidos pelas fêmeas em plantas tratadas com o fungo e a colonização do solo pelo microrganismo, parâmetros também utilizados nesse estudo, identificam o real potencial do agente de controle durante o ciclo da cultura. Esses parâmetros utilizam como referência o número de ovos aplicados no tratamento controle (sem aplicação do fungo), considerando como potencial máximo de produção de ovos nas condições do experimento, e o compara com os demais tratamentos. Ademais, a correlação entre a redução no fator de reprodução e a capacidade do fungo em colonizar o solo, representado pela densidade de UFC em um volume de solo durante o ciclo da cultura, indicam seu possível efeito a longo prazo. Apesar do uso de UFC como parâmetro de análise da persistência de fungos no solo ser amplamente empregado, nem sempre representa a população fúngica com precisão (Kowalchuk,1999). A alta quantidade de contaminantes do solo ao

final do ciclo das culturas realmente prejudicou a avaliação da colonização do solo por *P. lilacinum*, apesar de ser ter utilizado meio seletivo para avaliação. Contudo, pelo alto número de microrganismos presentes no solo, ainda não se encontrou uma metodologia mais eficaz para se determinar o potencial de colonização do solo por fungos que tem características saprofíticas. Apesar de *P. chlamydosporia* já ter sido relatada como endofítica (Bordallo et al., 2002, Llopes-Lorca et al., 2002; Arévalo et al., 2012a), essa característica não ficou evidente no presente estudo para ambas as culturas.

Os danos causados por *M. enterolobii*, espécie recentemente identificada no Brasil causando sérios prejuízos em diferentes regiões (Carneiro et al., 2001; Carneiro et al., 2006; Castro et al., 2010; Reis et al., 2011), vêm sendo avaliado para diversas espécies frutíferas (Almeida et al., 2011; Freitas, 2012; Silva & Krasuski, 2012). Os primeiros estudos de controle dessa espécie de nematoide com fungos foram realizados por Carneiro et al. (2011) na cultura da goiabeira. Os autores obtiveram um controle de *M. enterolobii* (redução de ovos) de cerca de 60 %, com a linhagem CG1003 de *P. chlamydosporia*, que foi originalmente isolada em ovos desse mesmo nematoide no Brasil (Arévalo et al., 2009). Foi observado também um controle de 40% com *P. lilacinum* (CG177 e CG1038) no mesmo ensaio. Embora tenha ocorrido significativa redução do número de ovos, não ocorreu redução no índice de galhas, possivelmente devido à presença de grande número de massas de ovos internas ao córtex da raiz, dificultando a colonização pelos agentes de controle biológico, segundo os autores. O presente estudo é o primeiro relato de avaliação da atividade de *P. chlamydosporia* e *P. lilacinum* sobre *M. enterolobii* na cultura da bananeira. De forma semelhante ao observado por Carneiro et al. (2011), o controle do nematoide foi parcial, cerca de 30% para a linhagem CG1006 após 12 meses da inoculação das plantas com o fungo e nematoide (ciclo longo). As massas de ovos, predominantemente internas nas raízes da bananeira, podem também ter sido uma das causas do reduzido parasitismo pelo fungo.

A infecção da bananeira cv. 'Terra' por *M. enterolobii*, previamente relatada por Freitas (2012), foi confirmada no presente estudo, que evidenciou

ainda um alto fator de reprodução (superior a 100) e suscetibilidade da cultivar ao ataque do nematoide. Apesar dessa alta suscetibilidade, as plantas apresentaram tolerância à espécie, não evidenciando danos aparentes na fase vegetativa e alcançando um bom desenvolvimento. Em casos como esse, em que a planta hospedeira não expressa sinais de debilitação e permite a boa reprodução do nematoide, a população da praga pode atingir níveis muito elevados, como observado nesse estudo onde o número de ovos produzidos no tratamento controle foi cerca de 2 milhões por planta. O uso do fungo para o controle do nematoide em cultivos de bananeira torna-se mais difícil nessas condições, já que a redução da população observada foi parcial.

As mesmas linhagens avaliadas para a cultura do tomateiro (ciclo curto) não proporcionaram redução da população da praga após 3 meses da inoculação das plantas. Esse resultado diverge de outros relatados na literatura para plantas de ciclo curto, em que houve controle significativo dos nematoides com *P. chalydosporia* (Kerry & Hidalgo-Díaz, 2004; Siddiqui & Akhtar, 2009; Arévalo et al., 2012a; Arévalo et al., 2012b). Uma das razões está diretamente ligada à concentração do inoculo do fungo utilizada no tratamento das plantas. A proporção de clamidósporos em relação ao total de propágulos produzidos para cada linhagem foi baixa, entre 0,01% e 17%. Muitos estudos de controle de nematoides de galhas com o fungo *P. chlamydosporia* utilizam o número de clamidósporos/g de solo para inoculação das plantas (Kerry & Bourne, 2002; Kerry & Hidalgo-Díaz, 2004; Puertas et al., 2006b; Puertas & Hidalgo-Díaz, 2007; Bailey et al., 2008; Dallemole-Giaretta et al., 2012; Mukhtar et al., 2013), diferentemente do utilizado no presente estudo onde foram considerados também os conídios como propágulos capazes de colonizar a rizosfera e infectar os ovos. O número de propágulos utilizados em estudos reportados anteriormente na literatura foi, possivelmente, bem maior em relação ao empregado aqui, considerando que a quantidade de conídios do fungo produzido em fermentação bifásica é significativamente alta. Desta forma, a suscetibilidade do tomateiro ao nematoide e a elevada capacidade de reprodução da praga nessa cultura, associado ao baixo inóculo usado no presente estudo podem explicar tais diferenças. No caso do CG1006, caso fosse levado em conta apenas os clamidósporos como inóculo, a linhagem

provavelmente seria desconsiderada como um potencial bioproduto por apresentar baixa produção dessa estrutura. Porém, o controle parcial do nematoide em bananeira (ciclo longo) ocorreu com essa linhagem, mesmo quando aplicado um inóculo contendo apenas 0,01% de clamidósporos na suspensão de inoculação. Provavelmente, o controle não ocorreu devido à ação dos clamidósporos, mas essencialmente da ação direta dos conídios e da capacidade de colonização da rizosfera pela linhagem. Níveis elevados de colonização das raízes pelo nematoide nos tomateiros ocasionaram galhas grandes com massas de ovos internas (Figura 15), também prejudicando a ação do fungo sobre os ovos.

A despeito da baixa ou ausência de eficácia das linhagens testadas na concentração de 50.000 propágulos/g de solo, os materiais apresentaram boa produção de propágulos na fermentação bifásica. No caso da linhagem CG1006, o número de propágulos foi quase cem vezes maior que o observado por Arévalo et al. (2009). Ajustes na metodologia de produção podem ter influenciado a quantidade final de propágulos. Linhagens de *P. chlamydosporia* são muito influenciadas por componentes do substrato e condições de cultivo (Sankaranaryanan et al., 2001) e diferenças de umidade no grão ou no ambiente podem ter sido fator para essa variação na produção. Por outro lado, apesar da boa produção de propágulos pela linhagem CG1006, a proporção de clamidósporos em relação ao total de células foi baixa, como anteriormente mencionado. Já a linhagem CG1044 produziu menor quantidade de propágulos/g de arroz, mas com uma maior proporção de clamidósporos (10,1%), alcançando um valor próximo ao observado por Dallemore-Giaretta et al. (2011) para outros isolados da mesma espécie. No caso do Rizotec[®] a quantidade de clamidósporos foi ainda maior, $5,1 \times 10^5$ clamidósporos/g do produto. A linhagem de *P. lilacinum* CG179 mostrou uma alta produção de conídios/g de arroz colonizado (10^9), mesmo valor observado por Carneiro & Kulczynski (1993) para a mesma linhagem.

A alta produtividade de células pelo agente de controle em sistemas fermentativos pode ser considerada critério importante na seleção de linhagens, já que altas concentrações são necessárias para reduções

significativas na população da praga. Da mesma forma, a quantidade de cada tipo de propágulo (conídio ou clamidósporo) é outro parâmetro importante, levando em consideração que determinadas células podem permanecer viáveis e ativas mesmo em condições ambientais desfavoráveis no solo. Assim, duas estratégias de uso dos fungos nematicidas podem ser empregadas no controle de nematoides formadores de galhas. Na primeira, linhagens que produzem grande número de células resistentes às condições adversas do ambiente e com alto potencial de colonização da rizosfera, como *P. chlamydosporia*, podem ser usadas em liberações inoculativas. Mesmo em concentrações menores, a estabilidade do clamidósporo no solo (Bourne & Kerry, 1999) e a característica saprofítica da linhagem permitem a melhor colonização da rizosfera, especialmente em cultivos de ciclo longo. Fato que pôde ser observado para o produto Rizotec[®], que apresentou alta proporção de clamidósporos e melhor colonização do solo (UFC/g de solo). Cabe ressaltar, que no experimento realizado em bananeira (item 2.4.2), o número de UFC foi próximo da metade em relação aos realizados em tomate (item 2.4.1). Apesar do tempo de experimento ter sido quatro vezes maior, os tratamentos não apresentaram diminuição da colonização proporcional ao tempo experimental, confirmando a capacidade de persistência de *P. chlamydosporia* no solo. Mauchline et al. (2004) sugeriram que fungos mais dependentes da presença do nematoide para a sua alimentação podem ser melhores agentes de controle biológico. Assim, linhagens de *P. chlamydosporia* competentes na concorrência por nutrientes no solo são organismos saprófitas mais bem sucedidos, mas podem ser parasitas de nematoides menos eficientes. Por outro lado, Arévalo et al. (2012b) constataram que o isolado CG1006 não alterou sua capacidade infectiva sobre ovos na presença ou ausência de matéria orgânica no solo, apresentando 70% de ovos parasitados.

Na segunda estratégia, linhagens com alta produtividade de células e tempo reduzido de fermentação (baixo custo), como *P. lilacinum*, podem ser usadas em liberações inundativas nas mudas e no plantio, visando principalmente a infecção de massas e ovos do nematoide remanescentes da cultura anterior. Nesse caso, a alta concentração do inóculo aplicado é fator indispensável. Puertas et al. (2006a) avaliaram diferentes concentrações de

inóculo do isolado IMI SD 187 (=CG1044) no parasitismo de ovos de *M. incognita* em tomateiro e observaram que a concentração de 5.000 clamidósporos/g de solo foi efetiva. Siddiqui & Futai (2009) avaliaram a ação de *P. lilacinum* sobre *M. incognita* também em tomateiro. Aos noventa dias foi feita a avaliação e a linhagem testada apresentou redução de, aproximadamente, 60% no número de nematoides. Nesse caso, a produção do inóculo do fungo foi feita em fermentação líquida e a aplicação do micélio filtrado fresco feita em alta concentração pela estratégia de inundação. Independentemente da forma de produção, do tipo de propágulo e da capacidade de colonização do solo pelo fungo, aplicações utilizando altas concentrações de células podem ser repetidas a cada plantio, principalmente em cultivos de ciclo curto.

Fungos nematófagos, especialmente *Pochonia chlamydosporia*, colonizam a rizosfera de uma grande variedade de culturas, mas o controle da população de nematoides depende da efetividade na infecção das massas e ovos, o que pode variar com espécie de planta e a densidade de nematoides no solo (Bourne et al, 1994; Puertas & Hidalgo, 2007). Em geral, estudos de controle de nematoides de galhas em vasos utilizam 5.000 ovos por planta (Cabanillas & Barker, 1989; Santiago et al., 2006; Arévalo et al., 2012a; Machado et al., 2013). De fato, o efeito da menor densidade de nematoides no solo pôde ser constatado no tratamento com baixa infestação de ovos (500 ovos/planta) de *M. enterolobii* em tomateiro. Nesse caso, o efeito direto da linhagem CG179 de *P. lilacinum* sobre a população inicial de ovos foi constatado redução de 44,2% no número de ovos. O controle satisfatório de *M. incognita* em tomateiro também foi observado para quantidades menores de ovos (1.000 ovos/planta) (Puertas et al., 2006a; Dallemore-Giaretta et al. 2012), que foi de 5 a 10 vezes inferior às aplicadas na maioria dos tratamentos do presente estudo.

Os resultados aqui apresentados sugerem que, independentemente da espécie e estratégia de uso do agente de controle biológico, a liberação de altas concentrações de propágulos associado a solos com baixa infestação do nematoide são necessárias para um bom desempenho de um bioproduto. A seleção de linhagens, em laboratório e em casa de vegetação, que apresentam

alta atividade sobre ovos do nematoide e alta produtividade em sistemas fermentativos é passo inicial para avaliação desses materiais a campo. Adicionalmente, outros métodos de controle devem ser integrados ao manejo do nematoide, buscando o re-estabelecimento do equilíbrio biológico do solo (Hidalgo & Kerry, 2008; Carneiro et al., 2011) e, principalmente, a manutenção da população dessa praga em níveis reduzidos que permitam a ação efetiva dos fungos nematófagos.

5 CONCLUSÕES

- A contabilização de propágulos (conídios e/ou clamidósporos) e a padronização de inoculo é de grande importância na avaliação da eficácia de *Pochonia chlamydosporia* sobre nematoides formadores de galhas.
- A bananeira cv. 'Terra' é suscetível a *Meloidogyne enterolobii*.
- *Pochonia chlamydosporia* e *Purpureocillium lilacinum* são capazes de reduzir o número de ovos de *M. enterolobii* em plantas sob baixa infestação em cultivo de ciclo curto.
- *Pochonia chlamydosporia* é capaz de reduzir o número de ovos de nematoide em cultivo de ciclo longo.
- Linhagens pré-selecionadas de *Pochonia chlamydosporia* e *Purpureocillium lilacinum* oferecem uma boa opção como controle complementar de nematoides sedentários.

6 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ABD-ELGAWADI, M. M. M. & KABEIL, S. S. A. 2012. Biological control of *Meloidogyne incognita* by *Trichoderma harzianum* and *Serratia marcescens* and their related enzymatic changes in tomato roots. **African Journal of Biotechnology**. 11(96):16248-16252.
- ADIKO, A. 1984. Biological control of *Meloidogyne incognita* with *Paecilomyces lilacinus*. **M.S. thesis**. North Carolina State University, Raleigh.
- ALMEIDA, E. J. & SANTOS, J. M. 2011. Ocorrência de *Meloidogyne enterolobii*, no município de Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. **Biosci. J.** Uberlândia. 27(6):877-878.
- ARÉVALO, J.; HIDALGO-DÍAZ, L.; MARTINS, I.; SOUZA, J. F.; CASTRO, J. M. C.; CARNEIRO, M. D. G. & TIGANO, M. S. 2009. Cultural and morphological characterization of *Pochonia chlamydosporia* and *Lecanicillium psalliotae* isolated from *Meloidogyne mayaguensis* eggs in Brazil. **Tropical Plant Pathology**. 34(3):158-163.
- ARÉVALO, J., SILVA, S. D., CARNEIRO, M. D. G.; LOPES, R. B.; CARNEIRO R. M. D. G.; TIGANO, M. S. & HIDALGO-DÍAZ, L. 2012a. *Pochonia chlamydosporia* (Goddard) Zare y Gams como potencial agente de control biológico de *Meloidogyne enterolobii* (Yang y Eisenback) en cultivos hortícolas. **Rev. Protección Vegetal**. 27(2) 123-129.
- ARÉVALO, J., SILVA, S. D., CARNEIRO, M. D. G.; LOPES, R. B.; CARNEIRO R. M. D. G.; TIGANO, M. S. & HIDALGO-DÍAZ, L. 2012b. Efecto de la presencia de abono orgánico sobre la actividad de *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* (Kamyschko ex Barron y Onions) Zare y Gams frente a *Meloidogyne enterolobii* Yang y Eisenback. **Rev. Protección Vegetal**. 27(3):167-173.
- ATKINS, S. D.; HIDALGO-DÍAZ, L.; KALISZ, H.; MAUCLINE, T. H.; HIRSCH, P. R. Y & KERRY, B. R. 2002. Development of a new management strategy for the control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) in organic vegetable production. **Pest Management Science**. 59:183-189.
- BAILEY, D. J.; BIRAN, G. L.; KERRY, B. R. & GILLIGAN, C. A. 2008. Pathozone dynamics of *Meloidogyne incognita* in the rhizosphere of tomato plants in the presence and absence of the nematophagous fungus, *Pochonia chlamydosporia*. **Plant Pathology**. 57:354-362.
- BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B.; PINTO, Z. V.; JÚNIOR, T. J. P.; CORRÊA, E. B.; MOURA, A. B.; LUCON, C. M. M.; COSTA, J. C. B. & BEZERRA, J. L. 2012. Produtos comerciais à base de agentes de biocontrole de doenças de plantas. **Série Documentos**. Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP. 88:155 p.

- BOAS, L. C. V.; TENENTE, R. C. V.; GONZAGA, V. NETO, S. P. S. & ROCHA, H.S. 2002. Reação de clones de bananeira (*Musa* spp.) ao nematoide *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1949, raça 2. **Rev. Bras. Frutic.** 24(3):690-693.
- BONETI, J.I.S.; FERRAZ, S. Modificação do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de raízes de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira.** 1981, v. 6, p. 553.
- BORDALLO, J. J.; LLOPEZ-LORCA, L. V.; JANSSON, H. B.; SALINAS, J. & ASENSIO, L. 2002. Colonisation of plant roots by egg-parasitic and nematode-trapping fungi. **New Phytologist.** 154:491-499.
- BRIDGE, J. 1991. Worldwide distribution of the major nematode parasites of banana and plantains. Proceedings of a research coordination meeting on biological and integrated control of highland banana and plantain pests and diseases. **Cotonou, Benin**, 185-198.
- BRIDGE, J. 2000. Keynote: Nematodes of bananas and plantains in Africa: research trends and management strategies relating to the small scale farmer. **Acta Horticulturae.** 540:391-408
- BRIDGE, J.; R. FOGAIN ; P. SPEIJER. 1997. The root lesion nematodes of banana, *Pratylenchus coffeae* (Zimmermann, 1898) Fili. & Schu., 1941 and *Pratylenchus goodeyi* Sher & Allen, 1953. Montpellier, France: INIBAP. (INIBAP Musa Pest Fact Sheet, 2).
- BRITO, J.; POWERS, T.O.; MULLIN, P.G.; INSERRA, R.N. & DICKSON, D. W. 2004. Morphological and molecular characterization of *Meloidogyne mayaguensis* isolates from Florida. **Journal of Nematology.** 36:232-240.
- CABANILLAS, E. & BARKER, K. R. 1989. Impact of *Paecilomyces lilacinus* Inoculum Level and Application Time on Control of *Meloidogyne incognita* on Tomato. **Journal of Nematology.** 21(1):115-120.
- CAMPOS, A. S. 2002. Distribuição de *Tylenchulus semipenetrans* e *Pratylenchus jaehni* em citros, no Estado de São Paulo, e estudo morfométrico comparativo de populações anfimíticas de *Pratylenchus* spp. **Dissertação (Mestrado em Entomologia Agrícola).** Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. UNESP, Jaboticabal.
- CANTU, R. R.; WILCKEN, S. R. S.; ROSA, J. M. O.; GOTO, R. 2009. Reação de porta-enxertos de tomateiros a *Meloidogyne mayaguensis*. **Summa Phytopathologica.** Botucatu. 35:124-126.
- CARNEIRO, R. M. D. G. & ALMEIDA, M. R. A. 2001. Técnica de eletroforese usada no estudo de enzimas dos nematóides de galhas para identificação de espécie. **Nematologia Brasileira.** 25:35-44.

- CARNEIRO, R. M. D. G. & KULCZYNSKI, S. M. 1993. Methodology for production of spores os *Paecilomyces* spp. isolates on rice. **Nematol. Brasileira**. 17(1):98-101.
- CARNEIRO, R. M. D. G.; HIDALGO-DÍAZ, L.; MARTINS, I.; SILVA, K. F. A. S.; SOUZA, M. G. & TIGANO, M. S. 2011. Effect of nematophagous fungi on reproduction of *Meloidogyne enterolobii* on guava (*Psidium guajava* L.) plants. **Nematology**. 13(6):721-728.
- CARNEIRO, R. M. D. G., MOREIRA, W. A.; ALMEIDA, M. R. A. & GOMES, A. C. M. M. 2001. Primeiro registro de *Meloidogyne mayaguensis* em goiabeira no Brasil. **Nematologia Brasileira**. 25(2):223-228.
- CARNEIRO, R. M. D. G.; NEVES, D. I.; FALCÃO, R.; PAES, N.S.; CIA, E.; GROSSI-DE-SÁ, M.F. 2005. Resistência de genótipos de algodoeiro a *Meloidogyne incognita* raça 3: reprodução e histopatologia. **Nematologia Brasileira**. Brasília. 29(1):1-10.
- CARNEIRO, R. M. D. G.; TIGANO, M.S.; RANDIG, O.;ALMEIDA, M.R.A. & SARAH, J. L. 2004. Identification and genetic diversity of *Meloidogyne* spp. (Tylenchida: Meloidogynidae) on coffee from Brazil, Central America and Hawaii. **Nematology**. 6:287-298.
- CARNEIRO, R.M.D.G. 1986. Etude des Possibilities D'utilisation du Champignon Nematophage *Paecilomyces lilacinus* (Thom.) Samson, 1974, Comme Agent de Lutte Biologique contre *Meloidogyne arenaria* (Neal, 1889), Chitwood, 1949. Tese (Doutorado) - **Cours do Pos Graduation in Parasitologie, Academie de Montpellier**. Universite des Sciences et Techniques du Languedoc, France.
- CARNEIRO, R.M.D.G. 1992. Princípios e tendências do controle biológico de nematóides com fungos nematófagos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília. 27:113-121.
- CARNEIRO, R.M.D.G. 2003. Uma visão mundial sobre a ocorrência e patogenicidade de *Meloidogyne mayaguensis* em goiabeira e outras culturas. In: **XXIV Congresso Brasileiro de Nematologia**. p. 22 (resumos).
- CARNEIRO, R.M.D.G.; ALMEIDA, M.R.A.; BRAGA, R.S.; ALMEIDA, C.A. & GIORIA, R. 2006. Primeiro registro de *Meloidogyne mayaguensis* parasitando plantas de pimentão e tomate resistentes à meloidoginose no Estado de São Paulo. **Nematologia Brasileira**. 30(1):81-86.
- CASTRO, J. M. C. & SANTANA, T. A. S. 2010. Primeiro registro de *Meloidogyne enterobii* em goiabeira no estado de Alagoas. **Nematologia Brasileira**. Piracicaba, São Paulo. 34(3):169-171.

- CHASE, A. R., OSBONE, L. S. & FERGUSON, V. M. (1986). Selective isolation of entopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* from an artificial potting medium. **Florida Entomology**. 69:285-292.
- COFCEWICZ, E. R.; CARNEIRO, R. M. D. G.; CORDEIRO, C. M. T.; QUÉNÉHERVÉ, P. & FARIA, J. L. 2004. Reação de cultivares de bananeira (*Musa* spp.) a diferentes espécies de nematoides das galhas. **Nematologia Brasileira**. 28(1):11-22.
- COLLINGBORN, F. M. B.; GOWEN, R. 1997. Screening of banana cultivars for resistance to *Radopholus similis* and *Pratylenchus coffeae*. **Infomusa**. Montpellier, France. 6(2):3 1997.
- COSTA, D. C. 2000. Nematoses em banana e abacaxi no Brasil: danos e manejo. In: **XXII CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA**. Uberlândia. **Anais** 50-58p.
- COSTA, D. C.; SILVA, S. O. & ALVES, F. R. 1998. Reação de genótipos de bananeira (*Musa* spp.) a *Radopholus similis* e *Meloidogyne incognita*. **Nemat. Bras.** 22(2):49-57.
- COSTA, D. C.; SILVA, S. O. & ALVES, F. R. 1998. Reação de genótipos de bananeira (*Musa* spp.) a *Radopholus similis* e *Meloidogyne incognita*. **Nematologia Brasileira**. 22(2):49-57.
- CUADRA, R.; PEREZ, J. A.; MACHADO, J.; VAZQUEZ, J. 1999. Effect of nemacur, terracur and furadan on root-knot nematodes in coffee plantations. **Revista de Proteccion Vegetal**. 14:111-115.
- DALLEMOLE-GIARETTA, R.; FREITAS, L. G.; CAIXETA, L. B.; XAVIER, D. M.; FERRAZ, S. & FABRY, C. F. S. 2011. Produção de clamidósporos de *Pochonia chlamydosporia* em diferentes substratos. **Ciênc. agrotec.** Lavras. 35(2):314-321.
- DALLEMOLE-GIARETTA, R.; FREITAS, L. G.; LOPES, E. A.; PEREIRA, O. L.; ZOOCA, R. J. F.; FERRAZ, S. 2012. Screening of *Pochonia chlamydosporia* Brazilian isolates as biocontrol agents of *Meloidogyne javanica*. **Crop Protection**. 42:102-107.
- DE LEIJ, F. A. A. M., and KERRY, B. R. 1991. The nematophagous fungus, *Verticillium chlamydosporium* Goddard, as a biological control agent for *Meloidogyne arenaria* (Neal) Chitwood. **Révue de Nematologie**. 14:157-164.
- DROPKIN, V.H. 1969. The necrotic reaction of tomatoes and other hosts resistant to *Meloidogyne*: reversal by temperature. **Phytopathology**, Palo Alto. 59(11):1632-1637.

- EAPEN, S. J.; BEENA, B. & RAMANA, K. V. 2005. Tropical soil microflora of spice-based cropping systems as potential antagonists of root-knot nematodes. **Journal of Invertebrate Pathology**. 88:218-225.
- EISENBACK, J. D. & TRIANTAPHYLLOU, H. H. 1991. Root-knot nematode: *Meloidogyne* sp. and races. In: **Nickle, W. R.(ed). Manual of agricultural Nematology**. New York, 191-274.
- EL-MOOR, R. D.; PEIXOTO, J. R.; RAMOS, M. L. G. & MATTOS, J. K. A. 2009. Reação de genótipos de maracujazeiro-azedo aos nematóides de galhas (*Meloidogyne incognita* e *Meloidogyne javanica*). **Biosci. J.** Uberlândia. 25(1):53-59.
- FERRAZ, S. & M. A. SANTOS. 1995. Controle Biológico de Fitonematóides pelo uso de fungos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. Passo Fundo, RS, 3:283-314.
- FREIRE, F. C. O. & BRIDGE, J. 1985. Parasitism of eggs, females and juveniles of *Meloidogyne incognita* by *Paecilomyces lilacinus* and *Pochonia chlamydosporia*. **Fitopatol. Bras.** 10:577–596.
- FREITAS, V. M. 2012. Resistência genética de goiabeira e reação de espécies frutíferas visando o manejo de *Meloidogyne enterolobii*. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília. 92 p. Tese de Doutorado.
- GLARE, T.; CARADUS, J.; GELERNTER, W.; JACKSON, T.; KEYHANI, N.; KHOL, J.; MARRONE, P. & STEWART, A. 2012. Have biopesticides come of age? **Trends Biotechnol.** 30:250–258.
- GONÇALVES, Z. S.; AMORIM, T. B.; XAVIER, C. S.; AMORIM, E. P.; LESSA, L. S.; LEDO, C. A. S.; ROQUE, R. L. 2012. Comportamento agrônomico de cultivares de banana em função de diferentes lâminas de irrigação. Embrapa Mandioca e Fruticultura.
- HERNÁNDEZ, M. A. & HIDALGO-DÍAZ, L. 2008. KlamiC[®]: bionematicida agrícola producido a partir del hongo *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata*. **Rev. Protección Veg.** 23(2):131-134.
- HIDALGO-DÍAZ, L. & KERRY, B. R. (2008). Integration of biological control with other methods of nematode management. In: Ciancio, A. & Mukerji, K.G. (Eds). **Integrated management and biocontrol of vegetable and grain crops nematodes**. Dordrecht, The Netherlands, Springer. 29-49.
- HUANG, X.; ZHAO, N. & ZHANG, K. 2004. Extracellular enzymes serving as virulence factors in nematophagous fungi involved in infection of the host. **Res. Microbiol.** 155:811–816.

- JESUS, A. M. & WILCKEN, S. R. S. 2010. Reprodução de *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* e *Pratylenchus coffeae* em diferentes cultivares de bananeira. **Nematologia Brasileira**. 34(1):3-9.
- KERRY, B. & HIDALGO-DÍAZ, L. 2004. Application of *Pochonia chlamydosporia* in the integrated control of root-knot nematodes on organically grown vegetables crops in Cuba. **Multitrophic Interactions in the Integrated Control**. 27(1):123-126.
- KERRY, B. R. & BOURNE, J. M. 2002. A manual for Research on *Verticillium chlamydosporium*, as Potential Biological Control Agent for Root-Knot Nematodes. **Ed. WPRS/SROP**.
- KERRY, B. R. 1975. Fungi and the decrease of cereal cyst-nematode populations in cereal monoculture. **EPPO Bulletin**. 5:353–361.
- KERRY, B. R. 2000. Rhizosphere interactions and the exploitation of microbial agents for the biological control of plant-parasitic nematodes. **Annual Review of Phytopathology**. Palo Alto. 38:423-441.
- KOWALCHUK, G. A. 1999. New perspectives towards analyzing fungal communities in terrestrial environments. **Current Opinions in Biotechnology**. 10:247-251.
- LEHR, P. 2010. Biopesticides: the global market. Report code CHM029B. **BCC research**.
- LIU, Y.-J.; ZHAI, C.-Y.; LIU, Y. & ZHANG, K.-Q. 2009. Nematicidal activity of *Paecilomyces* spp. and isolations of novel active compound. **The Journal of Microbiology**. 43(3):248-252.
- LLOPEZ-LLORCA, L. V.; BORDALLO, J. J.; SALINAS, J.; MONFORT, E. & LÓPEZ-SERNA, M. L. 2002. Use of light and scanning electron microscopy to examine colonisation of barley rhizosphere by nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium*. **Micron**. 33(1):61-67.
- MACHADO, J. C.; VIEIRA, B. S.; LOPES, E. A. & CANEDO, E. J. 2013. Controle de *M. javanica* com *P. chlamydosporia* e esterco bovino. **Biosci. J. Uberlândia**. 29(3):590-596.
- MACÍÁ-VICENTE, J. G.; JANSSON, H. B.; MENDGEN, K. & LOPEZ-LLORCA, L. V. 2008. Colonization of barley roots by endophytic fungi and their reduction of take-all caused by *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. **Can J. of Microbiol**. 54:6000-6009.
- MACÍÁ-VICENTE, J. G.; JANSSON, H. B.; TALBOT, N. J. & LÓPEZ-LLORCA, L. V. 2009a. Real-time PCR quantification and live-cell imaging of endophytic colonization of barley (*Hordeum vulgare*).roots by *Fusarium*

equiseti and *Pochonia chlamydosporia*. **New Phytologist**. 182(1):213-228.

MACIÁ-VICENTE, J. G.; ROSSO, L. C.; CIANCIO, A.; JANSSON, H. B. & LÓPEZ-LLORCA, L. V. 2009b. Colonization of barley roots by endophytic *Fusarium equiseti* and *Pochonia chlamydosporia*: Effects on plant growth and disease. **Ann. Appl. Biol.** 155(3):391-401.

MAUCHILINE, T. H., KERRY, B. R. & HIRSCH, P. R. 2004. The biocontrol fungus *Pochonia chlamydosporia* shows nematode host preference at the infraspecific level. **Mycology Research**. 108:161-169.

MONTES DE OCA, N.; ARÉVALO, J.; ACOSTA, N.; HIDALGO-DÍAZ, L. 2005. Herramientas para el control de la calidad de la cepa IMI SD 187 de *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* (Kamyscho ex Barron y Onions) Zare y W. Gams. **Revista de Protección Vegetal**. 20:86-92.

MOOSAVI, M. R.; ZARE, R.; ZAMANIZADEH, H. R.; FATEMY, S. 2010. Pathogenicity of *Pochonia* species on eggs of *Meloidogyne javanica*. **Journal of Invertebrate Pathology**. 104(2):125-133.

MUKHTAR, T.; HUSSAIN, M. A. & KAYANI, M. Z.. 2013. Biocontrol potential of *Pasteuria penetrans*, *Pochonia chlamydosporia*, *Paecilomyces lilacinus* and *Trichoderma harzianum* against *Meloidogyne incognita* in okra. **Phytopathologia Mediterranea**. 52(1):66-76

OOSTENBRINK, M. Major characteristics of the relation between nematodes and plants. **Mededelingen Van De Landbouwhogeschool**. 1966, v. 66, p.3-46.

PETEIRA, B.; PUERTAS, A.; HIDALGO-DÍAZ, L. HIRSCH, P.; KERRY, B. & ATKINS, S. 2005. Real-time PCR to monitor and assess the efficacy of two types of inoculum of the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* against root-knot nematode populations in the field. **Biotecnología Aplicada**. 22(4):261-266.

PUERTAS, A. & HIDALGO-DÍAZ, L. 2007. INFLUENCIA DE LA PLANTA HOSPEDANTE Y SU INTERACCIÓN COM *Meloidogyne incognita* SOBRE LA EFECTIVIDAD DE *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata*. **Rev. Protección Veg.** 22 (2):104-109.

PUERTAS, A.; ARÉVALO, J.; MONTES DE OCA, N.; MIRANDA, I. & HIDALGO-DÍAZ, L. 2006a. Efecto de diferentes concentraciones de inóculo de la cepa IMI SD 187 de *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* em el controle de *Meloidogyne incognita*. **Rev. Protección Veg.** 21(2):74-79.

PUERTAS, A.; DE LA NOVAL, B. M.; MARTÍNEZ, B.; MIRANDA, I.; FERNÁNDEZ, F. & HIDALGO-DÍAZ, L. 2006b. Interacción de *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* com *Rhizobium* sp., *Trichoderma*

harzianum y *Glomus clarum* em el control de *Meloidogyne incognita*. **Ver. Pretección Veg.** 21(2):80-89.

- REIS, H. F.; BACCHI, L. M. A.; VIEIRA, C. R. Y. I. & SILVA, V. S. 2011. Ocorrência de *Meloidogyne enterolobii* (sin. *M. mayaguensis*) em pomares de goiabeira no município de Ivinhema, Estado de Mato Grosso do Sul. **Rev. Bras. Frutic.** 33(2):676-679.
- RITZINGER, C. H. S. P. & FANCELLI, M. 2006. Manejo integrado de nematóides na cultura da bananeira. **Revista Brasileira de Fruticultura.** 28(2):331-338.
- ROBL, D.; SUNG, L. B.; NOVAKOVICH, J. H.; MARANGONI, P. R. D.; ZAWADNEAK, M. A. C.; DALZOTO, P. R.; GABARDO, J. & PIMENTEL, I. C. 2009. Spore production in *Paecilomyces lilacinus* (Thom.) samson strains on agro-industrial residues. **Braz. J. Microbiol.** [online]. 40(2):296-300.
- ROCHA, L. S.; RIBEIRO, R. C. F.; XAVIER, A. A.; SILVA, F. J. & BRUCKNER, C. H. 2013. Reação de genótipos de maracujazeiro a *Meloidogyne incognita* raça 3 e *Meloidogyne javanica*. **Rev. Bras. Frutic.** Jaboticabal, São Paulo. 35(4):1017-1024.
- SABET, F.; OLIA, M.; SHARIFNABI, B. & FADAEI-TEHRANI, A. A. 2013. Biological control of the root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* by four isolates of *Paecilomyces lilacinus* and an isolate of *Isaria farinosa* on tomato plants. **Iran. J. Plant Path.** 49(2):65-67.
- SANKARANARAYANAN, C.; HUSSAINI, S. S. & KUMAR, P. S. 2000. Biological control of *Meloidogyne incognita* (Kofoid and White 1919) Chitwood 1949 on tomato by *Verticillium chlamydosporium* Goddard cultured on different substrates. **Journal of Biological Control.** 14:39–43.
- SANTIAGO, D. C.; HOMECHIN, M.; SILVA, J. F. V.; RIBEIRO, E. R.; GOMES, B. C.; SANTORO, P. H.. 2006. Seleção de isolados de *Paecilomyces lilacinus* (Thom.) Samson para controle de *Meloidogyne paranaensis* em tomateiro. **Ciência Rural.** 36(4):1055-1064.
- SANTOS B. H. C.; RIBEIRO, R. C. F.; XAVIER, A. A.; NETO, J. A. S. & MOTA, V. J. G. 2013. Controle de *Meloidogyne javanica* em mudas de bananeira 'prata-anã' por compostos orgânicos. **Ver. Bras. Frutic.** 35(2):650-656.
- SIDDIQUI, Z. A. & AKHTAR, M. S. 2009. Effects of antagonistic fungi and plant growth-promoting rhizobacteria on growth of tomato and reproduction of the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. **Australasian Plant Pathology.** 38:22–28.
- SIDDIQUI, Z. A. & FUTAI, K. 2009. Biocontrol of *Meloidogyne incognita* on tomato using antagonistic fungi, plant-growth-promoting rhizobacteria and cattle manure. **Pest Manag Sci.** 65:943–948.

- SIKORA, R. A. 1992. Management of the antagonistic potential in agricultural ecosystems for de biological control of plant parasitic nematodes. **Ann. Rev. Phytopathol.** 30:245-70
- SILVA, G. S. S. & KRASUSKI, A. I. 2012. Reação de algumas frutíferas tropicais a *Meloidogyne enterolobii*. **Nematologia Brasileira.** 36(1-2):83-86.
- STOFFELEN, R.; VERLINDEN, R.; XUYEN, N. T.; SWENNEN, R. & DE WAELE, D. 2000. Host plant response of *Eumusa* and *Australiamusa* bananas (*Musa* spp) to migratory endoparasitic and root-knot nematodes. **Nematology.** 2(8):907-916.
- TAYLOR, D. T. & SASSER, J. N. (1978). Biology, identification and control of rootknot nematodes (*Meloidogyne* species). **A Coop. Publico of the Depart. PI Pathology.** North Carolina St. Univ. & U. S. A. I. D. 111p.
- VERDEJO-LUCAS, S.; SORRIBAS, F. J.; ORNAT, C. & GALEANO, M.. 2003. Evaluation *Pochonia chlamydosporia* in a double-cropping system of lettuce and tomato in plastic house infested with *Meloidogyne javanica*. **Plant Pathol.** 52:521–528.
- WALTERS, S. A. & BARKER, K. R. 1994. Efficacy of *Paecilomyces lilacinus* in suppressing *Rotylenchulus reniformis* os tomato. **Supplement to Journal of Nematology.** 26(4):600-605.
- WESTERICH, J. N.; RODELLA, R. A.; ROSA, J. M. O. & WILCKEN, S. R. S. 2012. Alterações anatômicas induzidas por *Meloidogyne enterolobii* (=M. mayaguensis) e *Meloidogyne javanica* em tomateiros resistentes a meloidoginose. **Summa Phytopathol.** Botucatu. 38(3):192-197.