

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
CURSO DE AGRONOMIA**

**FELIPE LUIZ CHIAMULERA DEIFELD**

**SELEÇÃO DE ISOLADOS DE *Pochonia chlamydosporia* PARA O  
CONTROLE DE *Meloidogyne javanica*.**

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**PATO BRANCO**

**2016**

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
CURSO DE AGRONOMIA**

**FELIPE LUIZ CHIAMULERA DEIFELD**

**SELEÇÃO DE ISOLADOS DE *Pochonia chlamydosporia* PARA O  
CONTROLE DE *Meloidogyne javanica*.**

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**PATO BRANCO**

**2016**

FELIPE LUIZ CHIAMULERA DEIFELD

**SELEÇÃO DE ISOLADOS DE *Pochonia chlamydosporia* PARA O  
CONTROLE DE *Meloidogyne javanica*.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Agronomia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Pato Branco, como requisito parcial à obtenção do título de Engenheiro Agrônomo.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosangela Dallemole Giaretta

Coorientador: M.Sc. Driéli Aparecida Reiner

PATO BRANCO

2016

**Deifeld, Felipe Luiz Chiamulera**

**Seleção de isolados de *Pochonia chlamydosporia* para o controle de *Meloidogyne javanica*. / Felipe Luiz Chiamulera Deifeld.**

**Pato Branco. UTFPR, 2016**

**49 f. : il. ; 30 cm**

**Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Rosangela Dallemole Giaretta**

**Coorientador: M.Sc. Driéli Aparecida Reiner**

**Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curso de Agronomia. Pato Branco, 2016.**

**Bibliografia: f.42 – 47**

**1. Agronomia. 2. Controle-Biológico. 3. Fungo Nematófago. 4. Nematóide das Galhas I. Dallemole-Giaretta, Rosangela, orient. II. Reiner, Driéli Aparecida, coorient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curso de Agronomia. IV. Título.**

**CDD: 630**



Ministério da Educação  
**Universidade Tecnológica Federal do Paraná**  
Câmpus Pato Branco  
Departamento Acadêmico de Ciências Agrárias  
**Curso de Agronomia**



**TERMO DE APROVAÇÃO**  
**Trabalho de Conclusão de Curso – TCC**

**SELEÇÃO DE ISOLADOS DE *Pochonia chlamydosporia* PARA O  
CONTROLE DE *Meloidogyne javanica*.**

por  
FELIPE LUIZ CHIAMULERA DEIFELD

Monografia apresentada às 15 horas 30 min. do dia 16 de novembro de 2016 como requisito parcial para obtenção do título de ENGENHEIRO AGRÔNOMO, Curso de Agronomia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Pato Branco. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo-assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho APROVADO.

Banca examinadora:

**Prof. Dr. IDALMIR DOS SANTOS**  
UTFPR  
Membro

**M. Sc. DRIÉLI APARECIDA REINER**  
UTFPR  
Co-orientadora

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. ROSANGELA DALLEMOLE GIARETTA**  
UTFPR  
Orientadora

A “Ata de Defesa” e o decorrente “Termo de Aprovação” encontram-se assinados e devidamente depositados na Coordenação do Curso de Agronomia da UTFPR Câmpus Pato Branco-PR, conforme Norma aprovada pelo Colegiado de Curso.

À minha família e aos meus amigos,

Dedico.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e força nos momentos de dificuldade.

Aos meus pais, Nilso e Solange, pela minha educação, pelo apoio nas minhas decisões, pela luta diária que permitiu e ainda permite realizar meus estudos, mas, principalmente por todo o amor dedicado a mim.

Aos meus avós, por serem exemplos de humildade, paciência e honestidade.

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná, pela oportunidade de realizar o curso de agronomia.

A todos os professores que contribuíram para minha formação acadêmica, em especial aos professores Idalmir e Rosangela, pelos ensinamentos, orientações, companheirismo e oportunidades.

A todos os servidores da Universidade, por proporcionarem um ambiente agradável além de estarem sempre dispostos a ajudar, em especial à tia Alana, tia Maria, Eloir, Polaco e Otávio.

A todos os colegas de laboratório, pelo apoio nos trabalhos, ensinamentos e os inúmeros momentos de descontração. Em especial à Driéli, Patrícia e Sandra, pelos nossos “lanchinhos” da noite ou mesmo os almoços no RU, sempre cheios de descontração e risadas. À Driéli ainda agradeço ter aceitado ser minha coorientadora, contribuindo com sugestões importantes para a construção deste trabalho.

Aos meus queridos Alana, Carolini, Jhennifer, Marco e Thais, pela amizade sincera, os conselhos, os (muitos) sorrisos e também pelo apoio nos

momentos difíceis ou de insegurança. Vocês foram (e sempre serão), sem dúvidas, a extensão de uma família. Por isso, os considero irmãos que a vida me presenteou.

A todos os amigos e pessoas que passaram pela minha vida e contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho e a conclusão da minha graduação.



## RESUMO

DEIFELD, Felipe L. C. Seleção de isolados de *Pochonia chlamydosporia* para o controle de *Meloidogyne javanica*. 49 f. TCC (Curso de Agronomia), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2016.

O objetivo deste trabalho foi isolar, caracterizar e selecionar isolados de *Pochonia chlamydosporia*, visando o controle de *Meloidogyne javanica*. Para obter os isolados, amostras de solos naturalmente infestados com *Meloidogyne* spp. e da rizosfera de plantas de tomate foram plaqueadas em meio de cultura semi-seletivo, conforme a técnica de diluições seriadas. As placas foram armazenadas a 24 °C, por 21 dias, no escuro. Após, as colônias fúngicas foram repicadas para placas de Petri contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) e incubadas a 24 °C, por 15 dias, no escuro. Foram obtidos 12 isolados, identificados como *P. chlamydosporia*. Estes foram armazenados em sílica-gel para estudos posteriores. A variedade dos isolados foi determinada através da visualização do arranjo das estruturas reprodutivas do fungo e, para determinar a coloração e diâmetro de colônia, os isolados foram repicados para meio de cultura BDA. Todos os isolados pertenciam à variedade *chlamydosporia*, com diâmetros de colônia variando entre 6,97 e 7,78 cm e coloração amarela ou bege. Para quantificar a produção de clamidósporos dos isolados obtidos, 3 discos de micélio fúngico de 8 mm de diâmetro foram depositados em sacos plásticos contendo 150 g de arroz e 70 mL de água, previamente autoclavados por 30 minutos a 120 °C e 1 atm. Os sacos foram fechados e armazenados a 24 °C, por 21 dias, no escuro. Os isolados que produziram maior número de clamidósporos foram PC-8 e PC-2. Outro experimento foi montado para avaliar a eficiência dos isolados no controle de *Meloidogyne javanica*, em casa de vegetação. Para isso, uma mistura de solo:areia, na proporção de 2:1 (v:v), foi esterilizada em autoclave por 1 hora a 120 °C e 1 atm. Este substrato foi acondicionado em sacos plásticos escuros e infestado com 8.000 ovos de *M. javanica* Kg<sup>-1</sup> de solo. Grãos de arroz colonizados pelos isolados de *P. chlamydosporia* foram adicionados separadamente nos sacos contendo o substrato, o que constituiu os tratamentos. O tratamento testemunha consistiu apenas de substrato infestado com nematoide. A umidade dos tratamentos foi ajustada até a capacidade de campo, e os substratos foram homogeneizados e armazenados em câmara de crescimento a 24 °C, no escuro, por 15 dias. Após, o substrato foi novamente homogeneizado e depositado em vasos de 700 mL de capacidade, sendo distribuídos 500 g em cada vaso. Uma muda de tomate de 21 dias de idade foi transplantada em cada vaso. Após 45 dias procederam-se as avaliações quanto à massa de raízes frescas, massa e altura de parte aérea fresca, número de galhas e ovos sistema radicular<sup>-1</sup>. Os isolados PC-2, PC-4, PC-5, PC-6 e PC-13 reduziram o número de galhas em 65%, 61%, 57%, 64% e 48%, em relação ao tratamento testemunha. Já, os isolados PC-2, PC-4 e PC-5 reduziram o número de ovos em 77%, 75% e 80%, em relação a testemunha. Todos os isolados foram capazes de se estabelecer no solo. Conclui-se que PC-2 tem potencial para ser estudado em um programa de controle biológico, pois possui boas características para a produção massal e controle do nematoide.

**Palavras-chave:** Controle biológico. Fungo nematófago. Nematoide das galhas.

## ABSTRACT

DEIFELD, Felipe L. C. Selection of isolates of *Pochonia chlamydosporia* to control of *Meloidogyne javanica*. 49 f. TCC (Course of Agronomy) - Federal University of Technology - Paraná. Pato Branco, 2016.

The aim of this paper was to isolate, characterize and select isolates of *Pochonia chlamydosporia*, aiming the control of *Meloidogyne javanica*. In order to obtain isolates, soil samples, naturally infested by *Meloidogyne* spp. were plated in a semi-selective culture medium, according to the serial dilutions technique. The plates were incubated at 24 °C, for 21 days in darkness. Then, the fungal colonies were repicated to Petri dishes containing culture medium potato-dextrose-agar (PDA) and incubated at 24 °C, for 15 days, in darkness. As a result, were obtained 12 isolates, identified as *P. chlamydosporia*. They were stored in sílica-gel for later studies. The species of isolates were determined through visualization of the reproductive structures of the fungus and the isolates were repicated to PDA medium for the determination of their color and diameter. All the isolates were specie *chlamydosporia*, with colony diameter ranging between 6.97 e 7.78 cm and yellow coloration or beige. To quantify the chlamydo spores production, 3 fungal mycelium discs of 8 mm diameter were deposited in plastic bag, which contained 150 g of rice and 70 mL of water, previously autoclaved for 30 minutes at 120 °C and 1 atm. The plastic bags were sealed and incubated at 24 °C, for 21 days in darkness. The isolates that produced the higher amount of chlamydo spores were PC-8 e PC-2. Another experiment was done under greenhouse conditions, to evaluate the efficiency of the isolates in controlling of *Meloidogyne javanica*. For this, a mixture of soil:sand, in the ratio 2:1 (v:v), was sterilized in autoclave for 1 hour at 120 °C and 1 atm. That substrate was transferred to plastic bags and infested with 8,000 eggs of *M. javanica* Kg<sup>-1</sup> of soil. Rice grains colonized by *P. chlamydosporia* isolates, were separately added in to bags containing the substrate, which were the treatments. The control treatment was just the substrate infested with nematodes. The humidity of the treatementes was adjusted by the field capacity, and the substrates were homogenized and incubated in growing chambers at 24 °C for 15 days in darkness. Then, the substrate was homogenized one more time and 500 g of it was deposited in vases, which capacity was 700 mL. A tomato seedling, at age of 21 days, was transplanted in each vase. After 41 days, the evaluation of fresh root mass, height and mass of fresh aerial part, number of galls and eggs in the root system was done. The isolates PC-2, PC-4, PC-5, PC-6 and PC-13 reduced the number of galls in 65%, 61%, 57%, 64% e 48%, when compared to the control treatment. Already the isolates PC-2, PC-4 e PC-5 reduced the number of eggs in 77%, 75% e 80%, in relation to control. All isolates multiplied in the soil. As conclusion, PC-2 has potential to be studied in a biological control program, once it has good characteristics for mass production and nematode control.

**Keywords:** Biological control. Nematophagous fungi. Root-knot nematode.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – Culturas de *Pochonia chlamydosporia*, cultivadas em meio de cultura BDA durante 21 dias, a 24 °C, no escuro. A – Fundo da placa (Isolado 1); B – Fundo da placa (Isolado 4); C – Fundo da placa (Isolado 7); D – Fundo da placa (Isolado 13).....29
- Figura 2 – Fotomicrografias ópticas de isolados de *Pochonia chlamydosporia*. A – Conídios em cabeça (Isolado 1); B – Clamidósporos (Isolado 4).....29
- Figura 3 – Número de galhas em raízes de tomateiros após 45 dias do transplante de mudas em substrato infestado com 4.000 ovos de *M. javanica* e diferentes isolados de *P. chlamydosporia*. Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade de erro. Dados transformados em raiz de X.....33
- Figura 4 – Número de ovos de *M. javanica* em raízes de tomateiros após 45 dias do transplante de mudas em substrato infestado com 4.000 ovos de *M. javanica* e diferentes isolados de *P. chlamydosporia*. Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade de erro. Dados transformados em raiz de X.....34

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Origem das amostras de solo coletadas para isolamento de *Pochonia chlamydosporia*. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.....27
- Tabela 2 – Diâmetro de colônia e coloração de isolados de *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia*, obtidos de solos cultivados com olerícolas e naturalmente infestados com *Meloidogyne* spp., cultivados em meio de cultura BDA por 21 dias, a 24 °C, no escuro. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.....28
- Tabela 3 – Produção de clamidósporos de diferentes isolados de *Pochonia chlamydosporia* após 21 dias de cultivo em grãos de arroz a 24 °C e no escuro. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016. ....30
- Tabela 4 – Massa de raiz e parte aérea frescas e altura de parte aérea de plantas de tomate, cultivadas em substrato infestado com 4.000 ovos de *M. Javanica* e diferentes isolados de *P. chlamydosporia*. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.....36
- Tabela 5 – Unidades formadoras de colônia de *P. chlamydosporia* em substrato infestado com *M. javanica*, 45 dias após o transplântio de mudas de tomate, em casa de vegetação. Médias de 6 repetições. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.....38

## LISTA DE SIGLAS E ACRÔNIMOS

Embrapa PR	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Unidade da Federação – Paraná
---------------	--

## LISTA DE ABREVIATURAS

atm	Atmosfera
BDA	Batata-dextrose-ágar
C	Celsius
cm	Centímetro
g	Gramma
J <sub>1</sub>	Juvenil de primeiro estágio
J <sub>2</sub>	Juvenil de segundo estágio
J <sub>3</sub>	Juvenil de terceiro estágio
J <sub>4</sub>	Juvenil de quarto estágio
Kg	Quilograma
L	Litro
mL	Microlitro
mm	Milímetro
UFC	Unidade formadora de colônia
v:v	volume:volume

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\mu$   
°

Micro  
Graus

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>17</b>
2.1 GERAL.....	17
2.2 ESPECÍFICOS.....	17
<b>3 REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>18</b>
3.1 NEMATOIDES.....	18
3.2 CONTROLE DO NEMATOIDE.....	19
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>23</b>
4.1 COLETA DE SOLO E ISOLAMENTO DOS ISOLADOS FÚNGICOS.....	23
4.2 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS ISOLADOS FÚNGICOS.....	24
4.3 PRODUÇÃO DE CLAMIDÓSPOROS.....	24
4.4 AVALIAÇÃO DE <i>Pochonia chlamydosporia</i> NO CONTROLE DE <i>Meloidogyne javanica</i> , EM CASA DE VEGETAÇÃO.....	25
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>27</b>
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>40</b>
<b>7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>41</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>42</b>



## 1 INTRODUÇÃO

O nematoide das galhas, *Meloidogyne* spp. Goeldi (1887), é um fitoparasita comum em diversas culturas, que pode causar perdas na produtividade limitando o potencial de rendimento de inúmeras plantas cultivadas (MOURA, 1996).

As raízes quando infectadas por este fitoparasita engrossam no ponto de penetração, dando origem às galhas, que são mais grossas que as partes não infectadas da raiz. Nos tubérculos ou outros órgãos subterrâneos, o sintoma característico são protuberâncias na superfície (FREITAS; OLIVEIRA; FERRAZ, 2009).

O controle do nematoide das galhas é difícil, devido a sua polifagia e por possuírem ampla distribuição geográfica (FERRAZ; MONTEIRO, 2011). Porém, algumas medidas devem ser adotadas para minimizar as perdas causadas por este patógeno nas culturas (FERRAZ; MONTEIRO, 2011; FERRAZ et al., 2012)

Dentre as medidas de controle de nematoides, o controle biológico mostra-se uma alternativa atraente, visto que, pode reduzir a aplicação de agrotóxicos, contribuindo para uma produção mais sustentável de alimentos (MORANDI; BETIOL, 2009), além de ser uma alternativa viável ao manejo de fitonematoides (FERRAZ; SANTOS, 1995; FERRAZ et al., 2012; FERRAZ; BROWN, 2016).

Dentre os agentes de controle biológico de fitonematoides, as bactérias e os fungos são os mais estudados e com maior potencial de uso na agricultura (NAZARENO, 2009). Entre os fungos, *Pochonia chlamydosporia* Zare e Gams (sin. *Verticillium chlamydosporium* Goddard) tem se destacado devido ao seu grande potencial de controle de inúmeras espécies de *Meloidogyne*, além de produzir clamidósporos, que são estruturas de resistência (DE LEIJ; KERRY, 1991; KHAN; KHAN; MOHIDE, 2005; FERREIRA et al., 2008) e promover o crescimento de plantas de várias culturas (MONFORT et al., 2005; DALLEMOLE-GIARETTA, 2008; MARCIÁ-VICENTE et al., 2009; VIGGIANO; FREITAS; FERREIRA, 2012).

Devido a essas características positivas deste agente de controle biológico, vem se buscando selecionar isolados com potencial para serem utilizados em programas de controle biológico, a fim de se desenvolver produtos comerciais,

que venham a ser usados na agricultura como uma alternativa ao manejo de nematoides.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

Selecionar isolados de *Pochonia chlamydosporia* com potencial para o controle de *Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood.

### 2.2 ESPECÍFICOS

Isolar diferentes isolados de *P. chlamydosporia* de solos naturalmente infestados com *M. javanica*.

Identificar os isolados de *P. chlamydosporia*.

Caracterizar os isolados de *P. chlamydosporia* quanto a sua morfologia e crescimento micelial.

Avaliar a produção de clamidósporos dos isolados de *P. chlamydosporia*.

Selecionar isolados de *P. chlamydosporia* com maior potencial para o controle de *M. javanica*.

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 NEMATOIDES

Nematoides são seres vermiformes e alongados, sendo a maioria de vida livre, os quais alimentam-se de bactérias, fungos e protozoários. Os nematoides parasitas de plantas, ou fitonematoides, representam 15% das espécies dentro do filo nematoda (FERRAZ; BROWN, 2016), e atacam as mais variadas culturas de importância econômica para a agricultura (FERRAZ; MONTEIRO, 2011).

Os fitonematoides possuem corpo não segmentado, de tamanho microscópico, com comprimento variando na faixa de 0,3 a 3,0 mm e diâmetro de 15 a 50 micrômetros, e habitam os mais variados ambientes (FREITAS; OLIVEIRA; FERRAZ, 2009). Estes parasitas possuem um estilete bucal, com o qual retiram substâncias nutritivas das plantas, além de injetarem substâncias tóxicas nos tecidos vegetais (EMBRAPA, 2016).

O ciclo de vida desses fitoparasitas pode durar de 3 a 8 semanas, dependendo da espécie do nematoide e das condições ambientais, sendo composto por quatro estádios juvenis mais o adulto, dentre os quais ocorrem as ecdises (FERRAZ; MONTEIRO, 2011; FAVERY et al., 2015).

No gênero *Meloidogyne* Goeldi, o ciclo se inicia quando o J<sub>1</sub> sofre uma ecdise, ainda dentro do ovo, e torna-se J<sub>2</sub>. Após a eclosão, o J<sub>2</sub> busca uma raiz para penetrar e se alimentar. Este fitoparasita ao penetrar a raiz da planta torna-se endosedentário (FREITAS; OLIVEIRA; FERRAZ, 2009). Dentro da raiz, o nematoide sofre mais duas ecdises, até se tornar J<sub>4</sub>. Com a última ecdise, este parasita torna-se adulto, sendo que o macho abandona a raiz e não se alimenta mais, já a fêmea, continua a engrossar até formato quase esférico de cor esbranquiçada, culminando com a postura de ovos (FREITAS; OLIVEIRA; FERRAZ, 2009). Fêmeas do gênero *Meloidogyne*, ovopositam aproximadamente 500 ovos cada, sendo que estes ficam protegidos por uma massa gelatinosa e podem permanecer no solo para dar origem aos juvenis do nematoide (FERRAZ; MONTEIRO, 2011).

Plantas atacadas por nematoides em geral tendem a apresentar sintomas na parte aérea, como redução no desenvolvimento, clorose, murcha nas horas mais quentes do dia e até mesmo a morte da planta (FERRAZ et al., 2012). O gênero *Meloidogyne* apresenta a característica de engrossamento das raízes no ponto de penetração, formando as galhas, além de protuberâncias em órgãos subterrâneos quando atacados pelo fitoparasita (FREITAS; OLIVEIRA; FERRAZ, 2009). Além disso, esse gênero destaca-se ainda por apresentar ampla distribuição geográfica e possuir um alto grau de polifagismo (FERRAZ; MONTEIRO, 2011).

### 3.2 CONTROLE DO NEMATOIDE

O manejo de nematoides é difícil de ser executado e sua erradicação é praticamente impossível. Uma vez presente na área, restam apenas medidas que reduzem a população para tornar viável o cultivo de culturas suscetíveis ao nematoide (FERRAZ et al., 2012).

Deste modo, a prevenção, evitando a disseminação, ainda é o princípio mais importante e a melhor tática de controle a ser seguida (FERRAZ et al., 2012). Para isto, deve-se evitar o trânsito de máquinas e pessoas em áreas infestadas e, posteriormente, em áreas isentas; máquinas e implementos devem ser lavados, assim como calçados após transitar em áreas infestadas; deve-se utilizar sementes livres de partículas de solo ou restos vegetais quando se faz o plantio em áreas isentas (FREITAS; OLIVEIRA; FERRAZ, 2009). Além disso, o uso de mudas e sementes certificadas podem auxiliar na prevenção.

O manejo do nematoide baseia-se principalmente na aplicação de produtos químicos, rotação de culturas e, mais recentemente, o emprego de cultivares resistentes tem despertado grande interesse (BARKER; KOENNING, 1998; WILCKEN; GARCIA; SILVA, 2005). Porém, estes métodos apresentam limitações (FERRAZ et al., 2012).

O controle químico, por exemplo, além de oneroso, geralmente tem eficiência apenas temporária, somam-se a isso, a alta persistência no solo,

contaminação de lençóis freáticos e efeitos prejudiciais aos seres humanos e a fauna (FERRAZ et al., 2012).

A rotação de culturas é difícil de ser praticada em virtude de alguns gêneros do nematoide possuírem ampla gama de hospedeiro, como é o caso do gênero *Meloidogyne* spp. (FERRAZ et al., 2012). A disponibilidade de plantas e cultivares resistentes a nematoides para adoção na rotação de culturas ainda é relativamente baixa para a grande maioria das culturas, e o desenvolvimento de novas fontes de resistência necessitam de muita pesquisa e demoram tempo (FERRAZ et al., 2012), além do que, a expressão gênica possui certa sensibilidade a altas temperaturas, que são condições que favorecem o patógeno (SILVA, 2001).

Uma alternativa que vem despertando grande interesse no manejo de nematoides é o controle biológico, que pode ser definido como a redução da densidade de inóculo ou das atividades da doença, por um ou mais microrganismos (MICHEREFF, 2001).

O controle biológico possui algumas vantagens em relação ao químico, dentre as principais destacam-se: a não contaminação do meio ambiente, que por sua vez evita o desequilíbrio ecológico; além de ser um método de fácil aplicação (SOARES, 2006).

Na natureza, o controle biológico de nematoides é feito pela microbiota presente no solo, através dos mecanismos de competição, predação, parasitismo e/ou produção de compostos tóxicos (FERRAZ et al., 2012). Para potencializar esse controle, o ambiente pode ser manipulado e outros antagonistas podem ser introduzidos, tanto no solo quanto nos órgãos de propagação das plantas cultivadas (BETTIOL; GHINI, 1995).

Vários microrganismos são considerados inimigos naturais dos nematoide e podem exercer controle sobre estes. *Pasteuria penetrans* (Thorne) Sayre & Starr é um representante promissor desta classe de agentes de biocontrole, porém seu cultivo *in vitro* é extremamente complexo (CAMPOS; SOUZA; SOUZA, 1998), o que inviabiliza sua produção massal.

Os fungos nematófagos também são agentes de biocontrole muito estudados (CHEN; DICKSON, 2004), atacam o nematoide em vários estádios de

desenvolvimento e estão divididos em vários grupos: endoparasitas; predadores e parasitas de ovos e fêmeas (FREITAS; OLIVEIRA; FERRAZ, 2009).

Um fungo muito promissor no controle biológico de nematoides é o agente de controle biológico *Pochonia chlamydosporia* Zare e Gams (sin. *Verticillium chlamydosporium* Goddard), pertencente ao grupo de fungos parasitas de ovos e fêmeas de nematoides (FERRAZ et al., 2012). Sua eficiência sobre algumas espécies de nematoides vem sendo comprovada em vários estudos (DE LEIJ; KERRY, 1991; KHAN; KHAN; MOHIDE, 2005; LOPES et al., 2007; FERREIRA et al., 2008).

Lopes et al. (2007) ao estudarem a eficiência de controle de *P. chlamydosporia* sobre *M. javanica* em casa de vegetação, observaram que o fungo reduziu em até 85% o número de ovos de *M. javanica* em plantas de tomateiro, quando o antagonista permaneceu em contato com o nematoide por 7 dias antes do transplântio das mudas. Dias-Arieira et al. (2011) ao aplicarem grãos de arroz colonizados por *P. chlamydosporia* em áreas comerciais de alface, naturalmente infestadas por *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood, observaram reduções de até 80% na população do nematoide no solo, além de reduzir o número de ovos sistema radicular<sup>1</sup>.

Viggiano, Freitas e Lopes (2014) também ao estudarem a eficiência de *P. chlamydosporia* no controle de *M. javanica* na cultura do pepineiro, verificaram que a aplicação do fungo na dose de 18 g L<sup>-1</sup> de água em mudas de pepineiro, antes do transplântio para solo infestado com *M. javanica*, controlou em mais de 40% este fitoparasita.

Devido a grande eficiência deste agente de controle biológico, no ano de 2016 foi registrado no Brasil o bionemático Rizotec<sup>®</sup>, produzido à base do isolado de *P. chlamydosporia* Pc-10 (GOTTEMS, 2016), visando o controle de *M. javanica*, em todas as culturas comerciais (AGROFIT, 2016).

Os clamidósporos são o principal meio de aplicação do fungo no solo, os quais podem ser produzidos em vários tipos de substratos (KERRY; BOURNE, 2002). Porém, a produção de clamidósporos, bem como a efetividade de controle deste agente de controle biológico, pode variar entre diferentes isolados de *P. chlamydosporia* (KERRY; BOURNE, 2002; DALLEMOLE-GIARETTA et al., 2012).

Devido a isto, estudos devem ser conduzidos para avaliar e selecionar isolados promissores dentro de um programa de controle biológico (MICHEREFF, 2001).



## 4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no laboratório de Microbiologia e Fitopatologia e na casa de vegetação da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – *Câmpus* Pato Branco.

### 4.1 COLETA DE SOLO E ISOLAMENTO DOS ISOLADOS FÚNGICOS

Para isolamento do fungo *P. chlamydosporia* primeiramente foram coletadas amostras de solo cultivado com beterraba, na cidade de Pato Branco-PR, e infestado naturalmente com o nematoide *Meloidogyne* spp. Após a coleta, as amostras de solo foram acondicionadas em sacos plásticos, etiquetadas e armazenadas em geladeira, a 4 °C, até a utilização. Além disso, foi utilizado solo rizosférico de uma planta de tomate infectada com o nematoide das galhas, trazida para o laboratório de Fitopatologia para diagnose, de local não identificado.

Para o isolamento do fungo, 1 g de solo de cada amostra de solo coletada foi colocado separadamente em frascos erlenmeyer de 200 mL de capacidade, contendo 9 mL de água esterilizada, agitado por 1 minuto e realizadas diluições em série até  $10^{-3}$ . Em seguida, uma alíquota de 0,5 mL da diluição  $10^{-3}$  de cada amostra de solo foi colocada separadamente em placas de Petri contendo meio semi-seletivo (GASPARD; JAFFEE; FERRIS, 1990) e espalhada com alça de Drigalsky. Após, as placas foram armazenadas em sala de crescimento à 24 °C, no escuro, até o surgimento das primeiras colônias fúngicas (21 dias).

Após este período, as colônias fúngicas foram repicadas separadamente para placas de Petri contendo meio de cultivo batata-dextrose-ágar (BDA) e incubadas a 24 °C, no escuro. Após 15 dias as colônias foram identificadas, armazenadas em sílica-gel (GONÇALVES; ALFENAS; MAFIA, 2007) e mantidas em geladeira para estudos posteriores.

## 4.2 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS ISOLADOS FÚNGICOS

Para a montagem deste experimento, primeiramente foram repicados os isolados de *P. chlamydosporia*, para placas de Petri contendo meio de cultura BDA e armazenados em câmara de crescimento a 24 °C, no escuro. Após 9 dias, discos de micélio de 8 mm de diâmetro dos respectivos isolados fúngicos foram retirados das bordas das colônias, transferidos para placas de Petri contendo meio de cultivo BDA e armazenados em câmara de crescimento a 24 °C, no escuro. Decorridos 21 dias foram avaliadas a coloração das colônias dos respectivos isolados do fungo (no reverso da placa) e também o diâmetro das colônias (duas medidas diametralmente opostas). O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, sendo 5 repetições por tratamento.

Para determinar a variedade dos isolados foi utilizada a técnica de microcultura. Para isso, placas de Petri, contendo dois papéis-filtro, uma lâmina, uma lamínula e dois palitos de madeira, foram autoclavadas a 120° C e 1 atm por 20 minutos. Posteriormente, o papel-filtro foi umedecido com água esterilizada e os palitos foram arranjados em forma de “V”, para servir de suporte para a lâmina, sobre a qual foi depositado um pedaço de meio de cultura (BDA) de 1 cm<sup>2</sup>, parcialmente colonizado com *P. chlamydosporia*, o qual foi coberto com a lamínula. As placas foram seladas com papel filme e armazenadas no escuro a 25° C, durante 21 dias. Após, a lamínula foi retirada e depositada sobre uma lâmina contendo uma gota de lactofenol, para observação de conídios e clamidósporos, em microscópio.

## 4.3 PRODUÇÃO DE CLAMIDÓSPOROS

Para a montagem deste experimento, 150 g de arroz parbolizado e 70 mL de água destilada foram colocados em sacos plásticos autoclaváveis (30 x 17 cm) fechados com um elástico e autoclavados por 30 minutos a 120 °C e 1 atm. Após, em câmara de fluxo laminar, foram colocados separadamente 3 discos de micélio (de 8 mm de diâmetro) dos isolados fúngicos de *P. chlamydosporia* previamente crescidos em meio BDA, a 24 °C, no escuro, por 9 dias. Após, os sacos foram fechados com um elástico e armazenados em sala de crescimento a 24 °C, no

escuro, por 21 dias. Após este período, os sacos contendo o substrato grãos de arroz colonizado pelo fungo foram armazenados em geladeira, até finalizar a quantificação de clamidósporos. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado com 5 repetições por isolado.

Para a avaliação do número de clamidósporos, três amostras de 1 g de arroz colonizado pelo fungo foram retiradas separadamente de cada saco, colocadas em Bécker de 100 mL de capacidade e adicionados 10 mL de água. Em seguida, cada amostra foi agitada em agitador magnético na velocidade 6, por três minutos. Após este período, com auxílio de uma micropipeta, foram retirados 40  $\mu$ L da suspensão e depositados em uma câmara de Neubauer, para realizar a contagem dos clamidósporos em microscópio óptico no aumento de 400x. Para cada amostra retirada dos sacos, foram realizadas 6 contagens na câmara de Neubauer.

#### 4.4 AVALIAÇÃO DE *Pochonia chlamydosporia* NO CONTROLE DE *Meloidogyne javanica*, EM CASA DE VEGETAÇÃO

Para avaliar a eficiência do controle de *P. chlamydosporia* sobre *M. javanica*, foi montado um experimento em casa de vegetação. Para isso, primeiramente foi repicado o fungo para a produção de clamidósporos conforme descrito no item 4.3.

Após, foi preparado o substrato utilizado no experimento de casa de vegetação, o qual foi constituído de uma mistura de solo e areia, na proporção de 2:1 (v:v), esterilizada em autoclave durante 1 hora a 120 °C e 1 atm. Posteriormente, 4 Kg do substrato foram acondicionados separadamente em um saco plástico escuro. O substrato foi infestado com 40 g de arroz colonizado por *P. chlamydosporia*, e uma suspensão de 8.000 ovos de *M. javanica* Kg<sup>-1</sup> de substrato. Os ovos do nematoide foram extraídos de raízes de tomateiro através da metodologia proposta por Hussey; Barker, modificada por Boneti; Ferraz (1981), previamente cultivados em casa de vegetação, em vasos plásticos com capacidade de 1 L, contendo uma mistura de solo e areia na proporção 2:1 v:v, infestado com *M. javanica*.

Cada isolado do fungo constituiu um tratamento, além do tratamento testemunha (apenas substrato e nematoide). O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, totalizando 13 tratamentos com 8 repetições cada. Todos os tratamentos foram homogeneizados e a umidade calibrada até a capacidade de campo. Os sacos permaneceram no escuro, a 25 °C.

Decorridos 15 dias, o substrato foi novamente homogeneizado e acondicionado em vasos de plástico de 700 mL de capacidade (500 g / vaso). Em seguida foi transplantada uma muda de tomateiro de 21 dias de idade / vaso, previamente cultivadas em bandejas contendo substrato comercial Tecnomax®.

Este experimento permaneceu em casa de vegetação por 45 dias, sendo regado diariamente, conforme a necessidade da cultura, quando então foram avaliados: altura de plantas, massa de parte aérea e de raízes frescas, número de galhas e de ovos por sistema radicular dos tomateiros.

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro, no programa estatístico ASSISTAT versão 7.7, 2014 (SILVA, 2014).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Foram obtidos 12 isolados, identificados como *P. chlamydosporia*, das amostras de solo coletadas na área cultivada com beterraba, na cidade de Pato Branco-PR, infestada com *Meloidogyne* spp. e da amostra de solo rizosférico de plantas de tomate com sintomas do nematoide das galhas (Tabela 1).

**Tabela 1** – Origem das amostras de solo coletadas para isolamento de *Pochonia chlamydosporia*. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.

Isolado	Origem
PC-1	Solo rizosférico de plantas de tomate
PC-2	Solo rizosférico de plantas de tomate
PC-3	Solo rizosférico de plantas de tomate
PC-4	Solo rizosférico de plantas de tomate
PC-5	Solo rizosférico de plantas de tomate
PC-6	Solo rizosférico de plantas de tomate
PC-7	Solo rizosférico de plantas de tomate
PC-8	Solo rizosférico de plantas de tomate
PC-9	Solo cultivado com beterraba
PC-10	Solo cultivado com beterraba
PC-12	Solo rizosférico de plantas de tomate
PC-13	Solo rizosférico de plantas de tomate

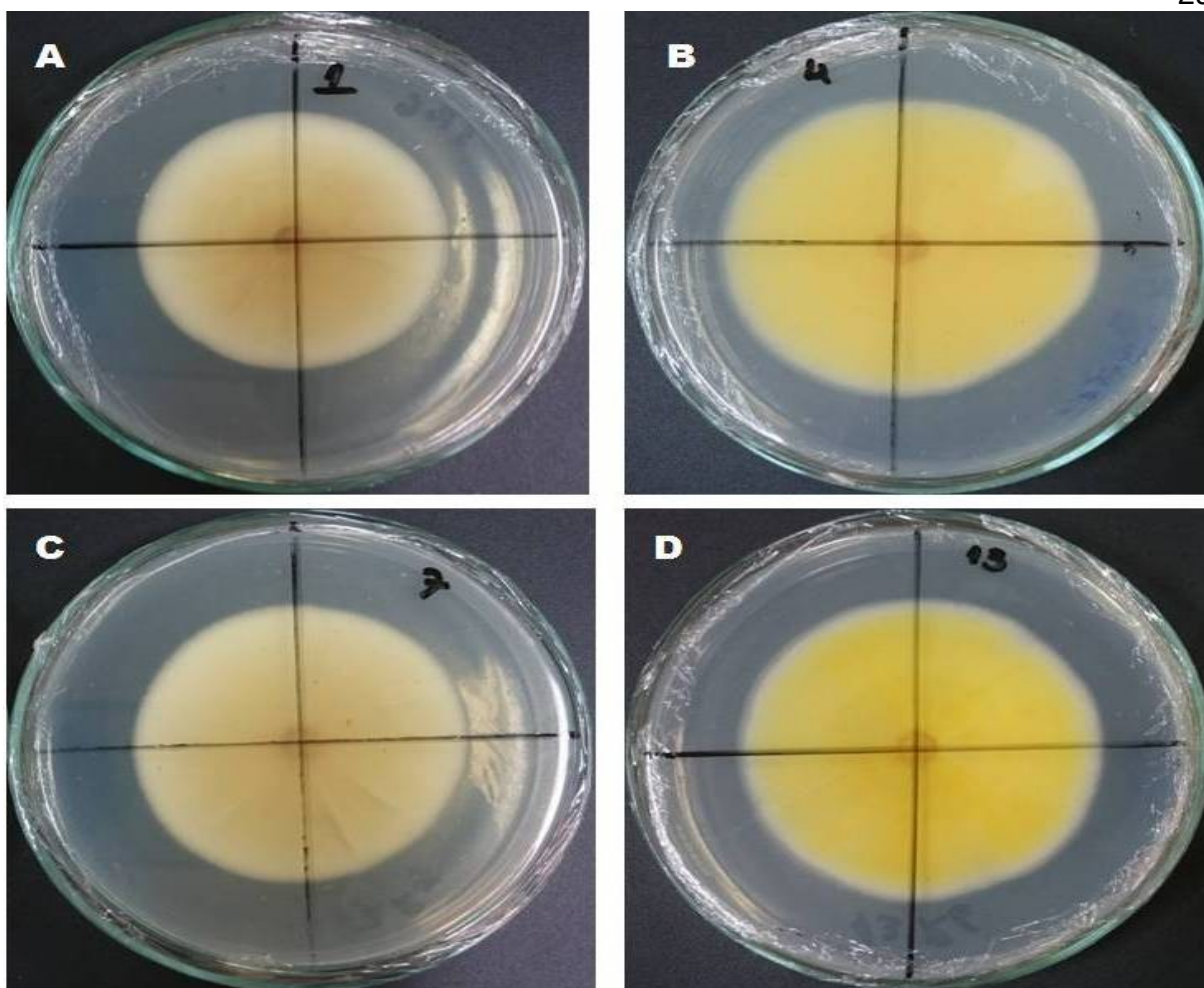
A coloração das colônias dos isolados de *P. chlamydosporia* no reverso da placa de Petri variou entre amarelo e bege, 21 dias após o cultivo em meio de cultura BDA (Tabela 2 e Figura 1). Os diâmetros das colônias dos respectivos isolados variaram entre 6,97 e 7,78 cm (Tabela 2). Estes resultados corroboram com os de Dallemole-Giaretta (2008), onde 29 isolados de *P. chlamydosporia* foram avaliados quanto às suas características morfológicas, como coloração e diâmetro de colônia, sendo constatadas diferenças nestas características entre os isolados fúngicos de mesma espécie.

Todos os isolados foram identificados como *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia*, devido a produção de clamidósporos e conídios arranjados em cabeça (Figura 2 e Tabela 1).

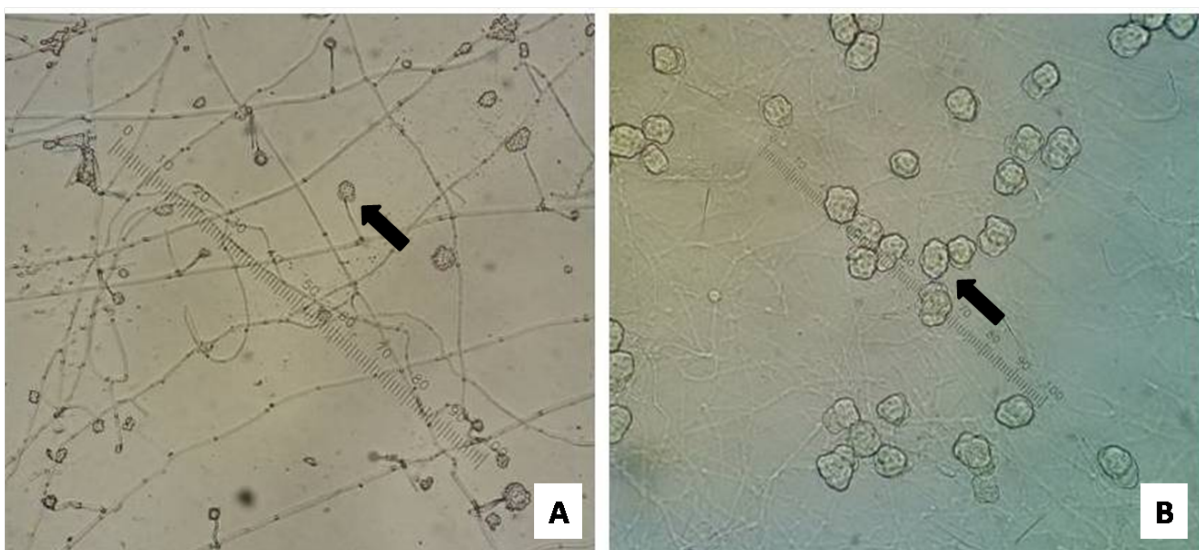
**Tabela 2** – Diâmetro de colônia e coloração de isolados de *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia*, obtidos de solos cultivados com olerícolas e naturalmente infestados com *Meloidogyne* spp., cultivados em meio de cultura BDA por 21 dias, a 24 °C, no escuro. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.

Isolado	Diâmetro de colônia (cm)	Coloração da colônia (reverso da placa)
PC-1	7,31	Bege
PC-2	7,44	Amarelo
PC-3	7,35	Amarelo
PC-4	7,63	Amarelo
PC-5	6,97	Amarelo
PC-6	7,78	Amarelo
PC-7	7,32	Bege
PC-8	7,58	Bege
PC-9	7,53	Bege
PC-10	7,27	Bege
PC-12	7,60	Amarelo
PC-13	7,76	Amarelo

As variedades de *P. chlamydosporia* mais frequentemente encontradas nos solos são *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* e *P. chlamydosporia* var. *catenulata* (KERRY, 2001; DALLEMOLE-GIARETTA, 2008; NAVARRO; MARTÍNEZ; DAMIÁN, 2009). Porém, no presente estudo, a baixa diversidade de variedades do fungo pode ser explicada devido a uma possível especificidade do fungo quanto ao gênero *Meloidogyne*, assim como relatado por Dallemole-Giaretta (2008) para as espécies de *Pochonia*. Ou ainda, isso pode estar associado ao clima, tipo de solo, presença de matéria orgânica no solo ou cultura instalada na região onde foram coletadas as amostras, propiciando um ambiente mais favorável ao desenvolvimento da variedade *chlamydosporia*. Porém, novos estudos devem ser realizados para confirmar tal hipótese.



**Figura 1** – Culturas de *Pochonia chlamydosporia*, cultivadas em meio de cultura BDA durante 21 dias, a 24 °C, no escuro. A – Fundo da placa (Isolado 1); B – Fundo da placa (Isolado 4); C – Fundo da placa (Isolado 7); D – Fundo da placa (Isolado 13).



**Figura 2** – Fotomicrografias ópticas de isolados de *Pochonia chlamydosporia*. A – Conídios em cabeça (Isolado 1); B – Clamidósporos (Isolado 4).

Em relação à produção massal de *P. chlamydosporia* em substrato de grãos de arroz, todos os isolados produziram clamidósporos (Tabela 3).

**Tabela 3** – Produção de clamidósporos de diferentes isolados de *Pochonia chlamydosporia* após 21 dias de cultivo em grãos de arroz a 24 °C e no escuro. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.

Isolado	Clamidósporos g <sup>-1</sup> de arroz
PC-1	2,0 x 10 <sup>4</sup> c
PC-2	3,0 x 10 <sup>6</sup> ab
PC-3	2,2 x 10 <sup>5</sup> c
PC-4	1,4 x 10 <sup>6</sup> bc
PC-5	3,1 x 10 <sup>5</sup> c
PC-6	4,6 x 10 <sup>5</sup> c
PC-7	5,0 x 10 <sup>4</sup> c
PC-8	4,9 x 10 <sup>6</sup> a
PC-9	5,0 x 10 <sup>4</sup> c
PC-10	1,3 x 10 <sup>6</sup> bc
PC-12	1,8 x 10 <sup>5</sup> c
PC-13	1,4 x 10 <sup>5</sup> c

\*Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade de erro.

Os isolados que produziram maior número de clamidósporos foram o PC-8 e PC-2. Por outro lado, PC-2 não diferiu estatisticamente de PC-4 e PC-10. Tais resultados comprovam a importância da seleção de um agente de controle biológico dentro de um programa de controle biológico, visto que, diferentes isolados de uma mesma espécie fúngica têm diferentes competências quanto a produção de clamidósporos (KERRY; BOURNE, 2002).

Variações na produção de estruturas propagativas entre diferentes isolados de uma mesma espécie fúngica tem sido observadas em diversos trabalhos (WANG; RIGGS; CRIPPEN, 2005; LOPES et al., 2007; BARCI et al., 2009; SILVA et al., 2012). Wang; Riggs; Crippen (2005) ao avaliarem a produção de clamidósporos de 12 isolados de *P. chlamydosporia*, cultivados em grãos de arroz, também observaram diferença na produção de clamidósporos entre os isolados de *P. chlamydosporia* testados. O isolado 26 produziu 5,84 log<sub>10</sub> clamidósporos g<sup>-1</sup> de arroz, enquanto que o isolado 34 produziu apenas 4,83 log<sub>10</sub> clamidósporos g<sup>-1</sup> de arroz.



No presente estudo, a maior produção de clamidósporos foi observada no isolado PC-8, com  $4,9 \times 10^6$  clamidósporos  $g^{-1}$  de arroz, enquanto que o isolado PC-1 mostrou-se menos eficiente na produção de clamidósporos, com apenas  $2,0 \times 10^4$  clamidósporos  $g^{-1}$  de arroz. Estas diferenças na produção de clamidósporos entre os isolados de *P. chlamydosporia*, evidenciam a importância da avaliação deste parâmetro para a seleção deste agente de controle biológico, visto que, o clamidósporo é a principal forma de aplicação do fungo ao solo, no controle de nematoides (KERRY; BOURNE, 2002), sendo que 5.000 clamidósporos  $g^{-1}$  de solo é a quantidade ideal para um controle satisfatório do patógeno (DALLEMOLE-GIARETTA, 2008).

No presente estudo não foi avaliado a velocidade de crescimento do micélio, apenas foi mensurado o diâmetro de colônia ao fim de 21 dias de cultivo do fungo em meio de cultura BDA. Porém, de acordo com os resultados obtidos, não se pode fazer uma relação diretamente proporcional entre o diâmetro das colônias e a produção de clamidósporos, pois, os isolados com maior diâmetro de colônia (PC-6 e PC-13), não apresentaram as maiores produções de clamidósporos.

Essas diferenças na produção de clamidósporos de diferentes isolados de *P. chlamydosporia* podem ser resultantes de diversos fatores. Mo; Xu; Zhang (2005) sugerem que a fonte de carbono presente no substrato é crucial para a produção de clamidósporos de isolados de *P. chlamydosporia*. Ao avaliarem diferentes substratos na produção de clamidósporos de *P. chlamydosporia*, Dallemole-Giaretta et al. (2011) constataram que grãos de arroz, independentemente da umidade e esterilização utilizada, foi o tratamento que propiciou a maior produção de clamidósporos em comparação a outros substratos testados. Porém, no presente estudo, alguns isolados apresentaram baixas produções de clamidósporos em grãos de arroz.

Medina-Canales et al. (2013) também constataram diferenças na produção de clamidósporos dos isolados de *P. chlamydosporia* Pcp2, Pc10, Pcp21 e Pcp31, quando cultivados em grãos de arroz. No entanto, os dois últimos não diferiram estatisticamente entre si. Porém, quando cultivados em substrato composto por uma mistura de milho e areia, Pcp2, Pcp21 e Pcp31 diferiram entre si quanto à produção de clamidósporos. Entretanto, neste substrato, Pc10 não apresentou

produção de clamidósporos. A produção de Pcp21 em grãos de arroz diferiu estatisticamente da produção em mistura de milho e areia. Tais resultados evidenciam a dependência da produção de clamidósporos de diferentes isolados de acordo com o substrato em que são cultivados

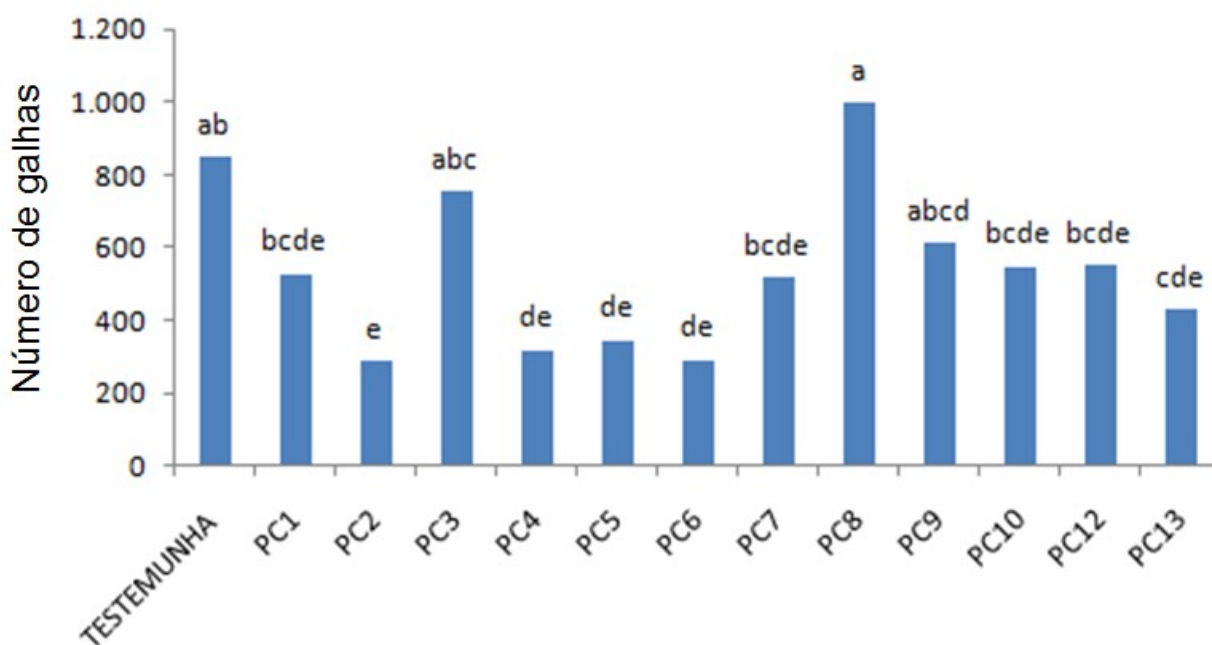
Outra variável que pode influenciar a produção de clamidósporos é a temperatura, onde a faixa térmica utilizada neste experimento pode ter beneficiado os isolados PC-2 e PC-8, garantindo maiores produções. Como exemplo, no estudo conduzido por Vivas; Vivas; Silveira (2015) constatou-se que o ponto ótimo de esporulação dos isolados de *Hansfordia pulvinata* H-608 e H-611 ocorre aos 19 °C; enquanto que para H-600, H-605, H-612 e H-613 a 20 °C; H-614 a 21 °C e para H-615 a 22 °C, indicando assim, que cada isolado responde de forma diferente às variações de temperatura.

Quando avaliou-se a eficiência desses isolados de *P. chlamydosporia* no controle do nematoide das galhas, verificaram-se que os isolados PC-2, PC-4, PC-5, PC-6 e PC-13 (Figura 3), reduziram 65%, 61%, 57%, 64% e 48% respectivamente, o número de galhas sistema radicular<sup>-1</sup> de tomateiro, em relação ao tratamento testemunha. Para o número de ovos, os isolados PC-2, PC-4 e PC-5 foram os mais eficientes, com reduções de 77%, 75% e 80% no número de ovos sistema radicular<sup>-1</sup>, em relação ao tratamento testemunha (Figura 4). Da mesma forma como observou-se neste trabalho, diversos autores também constataram diferentes desempenhos de isolados de *P. chlamydosporia* quanto à eficiência no controle de nematoides (DE LEIJ; KERRY, 1991; WANG; RIGGS; CRIPPEN, 2005; DALLEMOLE-GIARETTA, 2008).

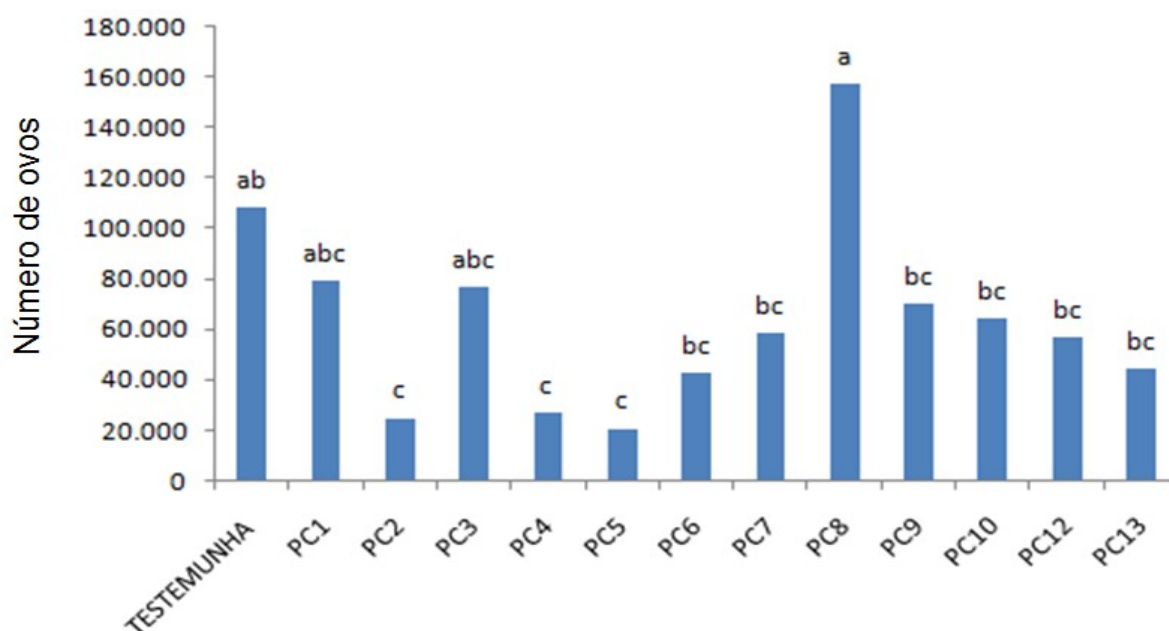
Wang; Riggs; Crippen (2005), ao testarem 12 isolados de *P. chlamydosporia* quanto a eficiência no controle de *Rotylenchulus reniformis* Linford & Oliveira (1940) em plantas de algodão (*Gossypium hirsutum* L.), observaram que, em um primeiro experimento, o isolado 26 foi o mais eficiente, reduzindo em até 77% o número de ovos do nematoide nas raízes das plantas, enquanto o isolado 37 reduziu em 64% o número de nematoides no solo comparado com o tratamento testemunha. Porém, em um segundo experimento, os mesmos isolados testados anteriormente, comportaram-se diferente, sendo que o isolado mais eficiente na redução do número de ovos do nematoide nas raízes foi o 37, com redução de 56%,

enquanto que para o número de nematoides no solo, o isolado 26 mostrou-se superior aos demais, com uma redução de 73%. Em um estudo conduzido por Dallemele-Giaretta (2008), foi observado que os isolados 2, 3 e 10 de *P. chlamydosporia* foram eficientes na redução do número de ovos de *M. Javanica* em plantas de tomateiro, em casa de vegetação, com reduções de 54 a 60%. O isolado 10 apresentou ainda a maior redução no número de galhas, com 21,3%.

Neste estudo verificou-se que a redução no número de ovos do nematoide seguiu a mesma tendência da redução do número de galhas para os diferentes isolados testados, possivelmente, devido a redução na população inicial do patógeno, quando o fungo ficou em contato com o nematoide durante 15 dias antes do transplante das mudas. Tais resultados estão de acordo com os obtidos por Coutinho (2008), cujo autor ressalta que, após a aplicação de *P. chlamydosporia* em solo infestado por nematoide, deve-se aguardar um período maior que uma semana antes do plantio, para que o fungo exerça um controle satisfatório do patógeno, o que também foi observado neste estudo.



**Figura 3** – Número de galhas em raízes de tomateiros após 45 dias do transplante de mudas em substrato infestado com 4.000 ovos de *M. javanica* e diferentes isolados de *P. chlamydosporia*. Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade de erro. Dados transformados em raiz de X.



**Figura 4** – Número de ovos de *M. javanica* em raízes de tomateiros após 45 dias do transplante de mudas em substrato infestado com 4.000 ovos de *M. javanica* e diferentes isolados de *P. chlamydosporia*. Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade de erro. Dados transformados em raiz de X.

Para colonizar ovos de nematoides parasitas de plantas, *P. chlamydosporia* utiliza alguns mecanismos, como apressório e enzimas extracelulares, principalmente proteases e quitinases, que auxiliam na degradação das camadas dos ovos (TIKHONOV et al., 2002; ESCUDERO et al., 2016). Neste estudo, alguns isolados apresentaram baixo controle do nematoide, quando comparados ao tratamento testemunha (Figuras 3 e 4). Essa baixa eficiência dos isolados, pode estar relacionada a reduzida produção de enzimas envolvidas no processo de parasitismo do fungo sobre o nematoide, o que dificulta a colonização dos ovos.

Dallemole-Giaretta (2008) também observou no seu estudo que alguns dos isolados de *P. chlamydosporia* testados não foram eficientes no controle do nematoide. Assim como, Pérez-Rodrigues et al. (2007) observaram que dos cinco isolados de *P. chlamydosporia* testados, apenas MPC3 controlou o parasitismo do nematoide *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935) nas raízes de tomateiros quando foram aplicados 15.000 clamidóporos g<sup>-1</sup> de solo, os demais isolados testados não diferiram do tratamento testemunha, sendo que o isolado MPC1 ainda aumentou o

número de juvenis de terceiro e quarto estágios nas raízes dos tomateiros, em relação ao tratamento testemunha.

Outros fatores também podem influenciar o desempenho de agentes biológicos no controle de nematoides, a exemplo da presença de altos teores de matéria orgânica, assim como a adição de materiais orgânicos no solo, podem favorecer o desenvolvimento e estabelecimento de antagonistas (MOGHADDAM; PANJEHKEH, 2016). Visto que, *P. chlamydosporia*, pode atuar como saprófita, utilizando-se da matéria orgânica para seu crescimento (KERRY, 2001). Os isolados que apresentaram baixa eficiência no controle do nematoide podem não ter se estabelecido de forma eficiente no substrato, uma vez que foi utilizado apenas uma mistura de solo e areia na montagem dos experimentos em casa de vegetação, sem adição de matéria orgânica. Além disso, estes isolados podem ser mais dependentes da presença de plantas infectadas com o nematoide para sua multiplicação no solo, visto que, a multiplicação de *P. chlamydosporia* no solo é mais abundante quando na presença de raízes infectadas por nematoides, geralmente na quinta semana de cultivo, quando as massas de ovos ficam expostas (BOURNE; KERRY; DE LEIJ, 1996).

Além disso, observou-se neste estudo que os isolados com melhores desempenhos no controle do nematoide, PC-2, PC-4 e PC-5 ainda promoveram incrementos de 49,1; 42,6 e 72,1%, respectivamente, na massa de raiz fresca dos tomateiros. Porém, para massa de parte aérea fresca, apenas PC-2 diferiu do tratamento testemunha, com um incremento de 38,4% (Tabela 4).

**Tabela 4** – Massa de raiz e parte aérea frescas e altura de parte aérea de plantas de tomate, cultivadas em substrato infestado com 4.000 ovos de *M. Javanica* e diferentes isolados de *P. chlamydosporia*. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.

Isolados	Massa de raiz (g)	Massa de parte aérea (g)	Altura da parte aérea (cm)
Testemunha (sem o fungo)	6,1 de	9,9 cd	49,6 <sup>ns</sup>
PC-1	6,7 cde	11,4 bcd	42,9
PC-2	9,1 ab	13,7 ab	52,8
PC-3	6,6 de	12,0 abcd	48,5
PC-4	8,7 abc	12,6 abc	54,4
PC-5	10,5 a	12,8 abc	48,8
PC-6	7,1 bcde	14,6 a	42,6
PC-7	7,3 bcd	13,1 ab	42,3
PC-8	7,6 bcd	11,1 bcd	49,2
PC-9	6,1 de	11,8 abcd	50,5
PC-10	5,2 e	9,5 d	39,5
PC-12	5,6 de	9,2 d	42,9
PC-13	8,8 ab	13,7 ab	45,1

Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. <sup>ns</sup> não significativo pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Esses incrementos na massa de parte aérea ou de raiz fresca podem ser explicados devido ao menor número de infecções pelo nematoide nas raízes da planta, que por consequência reduziu a retirada de fotoassimilados da mesma. Além disso, *P. chlamydosporia* possui a capacidade de se associar com raízes e promover o crescimento de plantas (MONFORT et al., 2005; WANG; RIGGS; CRIPPEN, 2005; DALLEMOLE-GIARETTA, 2008). Algumas enzimas liberadas pelo fungo podem degradar a matéria orgânica, disponibilizando nutrientes às plantas (FERRAZ et al., 2012). Dessa maneira, pode-se observar, que mesmo não sendo tão eficientes no controle do nematoide, os isolados PC-6, PC-7 e PC-13 contribuíram para o incremento de 47,5, 32,3 e 38,4%, respectivamente, da massa da parte aérea fresca dos tomateiros (Tabela 4). O isolado PC-13 ainda reduziu em 58% o número de ovos do nematoide e proporcionou aumento na massa das raízes frescas de tomateiro, provavelmente devido a menor retirada de fotoassimilados da planta pelos nematoides.

O isolado PC-2 apresentou alta produção de clamidósporos, e também altos índices de controle de nematoides em casa de vegetação, quando comparado aos demais isolados (Tabela 3, Figuras 3 e 4). Da mesma forma, Lopes et al. (2007) também constataram que os isolados de *P. chlamydosporia* mais eficientes na produção de clamidósporos foram os que geraram maior redução no número de ovos de *M. javanica* em tomateiros. Resultados semelhantes foram encontrados por Lohmann et al. (2007), observando que os isolados de *Trichoderma* spp. que proporcionaram maior controle de *Sclerotium rolfsii* Sacc. foram também os que produziram maior número de esporos em condições controladas.

Entretanto, o isolado PC-8 foi eficiente apenas na produção de clamidósporos *in vitro*, não sendo eficaz no controle do patógeno. Enquanto o isolado PC-5 apresentou baixa produção de clamidósporos, mas reduziu o número de galhas e de ovos do nematoide. O que pode ser explicado devido à capacidade de *P. chlamydosporia* em controlar nematoides, mesmo na ausência de clamidósporos (DALLEMOLE-GIARETTA et al., 2014).

Tais resultados comprovam que os testes realizados em laboratório auxiliam no conhecimento das características dos isolados, assim como seu potencial para produção massal, porém, este não deve ser o único parâmetro para definir quais isolados devem ser testados a campo, visto que, nem sempre os isolados que apresentam maior produção de clamidósporos *in vitro* são os que melhor controlam o patógeno em condições de campo e vice-versa (MICHEREFF, 2001; WANG; RIGGS; CRIPPEN, 2005).

Um bom agente de controle biológico deve possuir, entre outras características, a capacidade de sobreviver em condições ambientais adversas (MICHEREFF, 2001). Neste estudo, todos os isolados foram capazes de se estabelecer no substrato, nas condições experimentais em casa de vegetação (Tabela 5). Os isolados PC-2 e PC-8 foram os que apresentaram o maior número de unidades formadoras de colônia após a retirada do experimento em casa de vegetação. Estes dois isolados foram também os que produziram maior número de clamidósporos em grãos de arroz. Isso possivelmente ocorreu pois o fungo foi adicionado ao substrato em 10 g de arroz kg<sup>-1</sup> de substrato em todos os tratamentos, não levando em consideração o total de clamidósporos. Logo, o número de

clamidósporos adicionados ao substrato nos tratamentos PC-2 e PC-8 foi maior que nos outros tratamentos, possibilitando que estes isolados se estabelecessem de maneira mais eficiente no substrato em comparação aos demais.

**Tabela 5** – Unidades formadoras de colônia de *P. chlamydosporia* em substrato infestado com *M. javanica*, 45 dias após o transplante de mudas de tomate, em casa de vegetação. Médias de 6 repetições. UTFPR, Pato Branco - PR, 2016.

Tratamento	UFC g de substrato <sup>-1</sup>
Testemunha	-
PC-1	9,0 x 10 <sup>3</sup>
PC-2	6,6 x 10 <sup>4</sup>
PC-3	3,2 x 10 <sup>4</sup>
PC-4	1,8 x 10 <sup>4</sup>
PC-5	1,4 x 10 <sup>4</sup>
PC-6	1,7 x 10 <sup>4</sup>
PC-7	9,0 x 10 <sup>3</sup>
PC-8	7,5 x 10 <sup>4</sup>
PC-9	2,8 x 10 <sup>4</sup>
PC-10	1,5 x 10 <sup>4</sup>
PC-12	3,9 x 10 <sup>4</sup>
PC-13	7,0 x 10 <sup>3</sup>

A produção de clamidósporos é uma característica interessante deste fungo, pois permite que se estabeleça e sobreviva por longo período no solo, mesmo na ausência do nematoide hospedeiro (FERRAZ et al., 2012). Neste estudo, foi constatada a sobrevivência do fungo no substrato após a retirada do experimento, demonstrando mais uma característica positiva de *P. chlamydosporia* no controle de nematoides.

Entretanto, a seleção de isolados com potencial para serem avaliados em um programa de controle biológico, dentre os fatores analisados neste estudo, deve levar em consideração, principalmente, a eficiência no controle de nematoides. Este é o fator que vai determinar a eficácia de um produto comercial fabricado a partir da seleção de isolados. Porém, a viabilidade da fabricação de um produto comercial depende também da habilidade do isolado em ser produzido de forma massal. Portanto, devido aos fatores mencionados, e, buscando selecionar um



isolado com todas as características desejáveis, observa-se que o isolado PC-2 possui potencial para ser avaliado em um programa de controle biológico, visto que, controla tanto o número de galhas quanto o número de ovos do nematoide, promove o incremento na massa de raiz e parte aérea de tomateiros e possui boa produção de clamidósporos, sendo apto a produção massal.

Contudo, há necessidade de estudos futuros relacionados a eficiência de controle deste isolado em condições de campo e também no controle do nematoide em segundo ciclo de cultivo.

## 6 CONCLUSÕES

Os isolados mais eficientes na produção de clamidósporos foram PC-2 e PC-8.

Os isolados mais eficientes no controle do nematoide foram PC-2, PC-4 e PC-5.

O isolado PC-2 mostrou-se promissor para estudos em um programa de controle biológico por apresentar controle sobre o nematoide, facilidade em se reproduzir massalmente, além de favorecer o desenvolvimento de plantas de tomate.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A seleção de isolados de *P. chlamydosporia* é importante para a manutenção de recursos genéticos de microrganismos em programas de controle biológico e desenvolvimento de produtos mais eficientes no controle de nematoides, aumentando assim, as possibilidades dos agricultores no manejo deste patógeno. Deste modo, contribuindo para a redução no uso de nematicidas e preservação do meio ambiente e da água, garantindo uma produção de alimentos mais sustentável e consequentemente trazendo benefícios a sociedade, principalmente no que se refere à saúde.

O controle biológico de nematoides com *P. chlamydosporia* é uma alternativa interessante ao produtor, visto que, após a aplicação deste agente de biocontrole, o mesmo pode sobreviver no solo, possibilitando o controle do patógeno para os próximos cultivos.

Novos estudos devem ser realizados para confirmar a efetividade deste agente no controle de nematoides, em condições de campo, além de compará-lo com produtos comerciais de controle biológico de nematoides já existentes.

## REFERÊNCIAS

AGROFIT. Consulta de produtos formulados. Disponível em: <[http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)> Acesso em: 28 nov. 2016.

BARCI, L. A. G.; ALMEIDA, J. E. M.; NOGUEIRA, A. H. C.; ZAPPELINI, L. O.; PRADO, A. P. Seleção de isolados do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* (Ascomycetes: Clavicipitaceae) para o controle de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 1, p. 7-13, 2009.

BARKER, K. R.; KOENNING, S. R. Developing sustainable systems for nematode management. *Annual Review of Phytopathology*, v. 36, n. 165-205, 1998.

BETTIOL, W.; GHINI, R. Controle Biológico. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Eds.). **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. 3 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v. 1, p. 717-727, 1995.

BONETI, J. I. S.; FERRAZ, S. Modificação do método de Hussey e Barker para a extração de ovos de *Meloidogyne exigua*, em raízes de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 6, n. 3, p. 553, 1981.

BOURNE, J. M.; KERRY, B. R.; DE LEIJ, F. A. A. M. The importance of the host plant on the interaction between root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) and the nematophagous fungus, *Verticillium chlamydosporium* Goddard. **Biocontrol Science and Technology**, v. 6, p. 539-548, 1996.

CAMPOS, V. P.; SOUZA, J. T.; SOUZA, R. M. Controle de fitonematoides por meio de bactérias. In: LUZ, W. C. (Ed.). *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, v. 6, p. 285-327, 1998.

CHEN, S.; DICKSON, D. W. Biological control of nematodes by fungal antagonists. In: CHEN, Z.; CHEN, S.; DICKSON, D. W. (Eds.). *Nematology – Advances and perspectives*, v. 2: Nematode Management and Utilization. Tsinghua: University Press, CABI Publishing, p. 979-1039, 2004.

COUTINHO, M. M. **Utilização de *Pochonia chlamydosporia* e farinha de sementes de mamão (*Carica papaya* L.) para o controle de *Meloidogyne javanica***. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2008

DALLEMOLE-GIARETTA, R. **Isolamento, identificação e avaliação de *Pochonia chlamydosporia* no controle de *Meloidogyne javanica* e na promoção de**

**crescimento de tomateiro.** Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2008.

DALLEMOLE-GIARETTA, R.; FREITAS, L. G.; CAIXETA, L. B.; XAVIER, D. M.; FERRAZ, S.; FABRY, C. F. S. Produção de clamidósporos de *Pochonia chlamydosporia* em diferentes substratos. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 2, p. 314-321, 2011.

DALLEMOLE-GIARETTA, R.; FREITAS, L. G.; LOPES, E. A.; PEREIRA, O. L.; ZOOCA, R. J. F.; FERRAZ, S. Screening of *Pochonia chlamydosporia* Brazilian isolates biocontrol agents of *Meloidogyne javanica*. **Crop Protection**, v. 42, p. 102-107, 2012.

DALLEMOLE-GIARETTA, R.; FREITAS, L. G.; XAVIER, D. M.; ZOOCA, R. J. F.; FERRAZ, S.; LOPES, E. A. Incorporação ao solo de substrato contendo micélio e conídios de *Pochonia chlamydosporia* para o manejo de *Meloidogyne javanica*. **Ciência Rural**, v. 44, n. 4, p. 629-633, 2014.

DE LEIJ, F. A. A. M.; KERRY, B. R. The nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium* as a potential biological control agent for *Meloidogyne arenaria*. **Revue de Nématologie**, v. 14, n. 1, p. 157-164, 1991.

DIAS, W. P.; GARCIA, A.; SILVA, J. F. V.; CARNEIRO, G. E. S. Nematoides em Soja: Identificação e Controle. Londrina, PR: Embrapa Soja, 2010.

DIAS-ARIEIRA, C. R.; SANTANA, S. M.; FREITAS, L. G. de; CUNHA, T. P. L.; BIELA, F.; PUERARI, H. H.; CHIAMOLERA, F. M. Efficiency of *Pochonia chlamydosporia* in *Meloidogyne incognita* control in lettuce crop (*Lactuca sativa* L.). **Journal of Food, Agriculture and Environment**. v. 9, p. 561-563, 2011.

EMBRAPA. **Cana de Açúcar: Nematoides.** Disponível em: <[http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01\\_54\\_711200516718.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_54_711200516718.html)> Acesso em: 10 mar. 2016.

ESCUADERO, N.; FERREIRA, S. R.; LOPEZ-MOYA, F.; NARANJO-ORTIZ, M. A.; MARIN-ORTIZ, A. I.; THORTON, C. R.; LOPEZ-LLORCA, L. V. Chitosan enhances parasitism of *Meloidogyne javanica* eggs by the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia*. **Fungal Biology**, p. 572-585, 2016.

FAVERY, B.; QUENTIN, M.; JAUBERT-POSSAMAI, S.; ABAD, P. Gall-forming root-knot nematodes hijack key plant cellular functions to induce multinucleate and hypertrophied feeding cells. **Journal of Insect Physiology**, v. 84, p. 60-69, 2015.

FERRAZ, L. C. C. B.; BROWN, D. J. F. Nematologia de plantas: fundamentos e importância. Manaus: NORMA EDITORA, 2016.

FERRAZ, L. C. C.; MONTEIRO, A. R. Nematoides. In: AMORIN, L.; REZENDE, J. A. M.; FILHO, A. B. (Eds) Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos. São Paulo-SP: Agronomica Ceres, p. 277-305, 2011.

FERRAZ, S.; SANTOS, M. A. Controle Biológico de Fitonematoides pelo uso de fungos. In: LUZ, W. C. (Ed.). Revisão Anual de Patologia de Plantas, v. 3, p. 283-304, 1995.

FERRAZ, S.; FREITAS, L. G.; LOPES, E. A.; DIAS-ARIEIRA, C. R. Manejo Sustentável de Fitonematoides. Viçosa-MG: Editora UFV, 2012.

FERREIRA, P. A.; FERRAZ, S.; LOPES, E. A.; FREITAS, L. G. Parasitismo de ovos de *Meloidogyne exigua* por fungos nematófagos e estudo da compatibilidade entre os isolados fúngicos. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 2, n. 3, p. 15-21, 2008.

FREITAS, L. G.; OLIVEIRA, R. D'A. L.; FERRAZ, S. Introdução à Nematologia. Viçosa, MG: UFV, 2009.

GASPARD, J. T.; JAFFEE, B. A.; FERRIS, H. Association of *Verticillium chlamydosporium* and *Paecilomyces lilacinus* with root-knot nematode infested soil. **Journal of Nematology**, v. 22, n. 2, p. 207-213, 1990.

GONÇALVES, R. C.; ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. Armazenamento de microrganismos em cultura com ênfase em fungos fitopatogênicos. In: ALFENAS, A.C. & R.G. MAFIA. (eds.). **Métodos em fitopatologia**, p. 91-102, 2007.

GOTTEMS, L. Liberado defensivo biológico Rizotec para controle de nematoides. Disponível em: <[http://www.agrolink.com.br/culturas/soja/noticia/liberado-defensivo-biologico-rizotec-para-controle-de-nematoides\\_351192.html](http://www.agrolink.com.br/culturas/soja/noticia/liberado-defensivo-biologico-rizotec-para-controle-de-nematoides_351192.html)> Acesso em: 28 nov. 2016.

KERRY, B. R. Exploitation of the nematophagous fungal *Verticillium chlamydosporium* Goddard for the biological control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). In: BUTT, T. M.; JACKSON, C.; MAGAN, N. (eds). Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential. CAB International, Wallingford, p. 155-167, 2001.

KERRY, B. R.; BOURNE, J. M. A manual for research on *Verticillium chlamydosporium*, a potential biological control agent for root-knot nematodes. IOBC, OILB, WPRS/SROP, 84 p. 2002.

KHAN, M. R.; KHAN, S. M.; MOHIDE, F. Root knot nematode problem of some winter ornamental plants and its biomanagement. **Journal of Nematology**, v. 37, n. 2, p. 198-206, 2005.

LOHMANN, T. R.; PAZUCH, D.; STANGARLIN, J. R.; SELZLEIN, C.; NACKE, H. Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. para o controle de *Sclerotium rolfsii* em soja. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 2, n. 2, p. 1665-1668, 2007.

LOPES, E. A.; FERRAZ, S.; FERREIRA, P. A.; FREITAS, L. G.; DHINGRA, O. D.; GARDIANO, C. G.; CARVALHO, S. L. Potencial de isolados de fungos nematófagos no controle de *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, v. 31, n. 2, p.78-84, 2007.

MARCIÁ-VICENTE, J. G.; ROSSO, L. C.; CIANCIO, A.; JANSSON, H. B.; LOPEZ-LLORCA, L. V. Colonization of barley roots by endophytic *Fusarium equiseti* and *Pochonia chlamydosporia*: Effects on plant growth and disease. **Annals of Applied Biology**, v. 155, p. 391-401, 2009.

MEDINA-CANALES, M. G.; RODRÍGUEZ-TOVAR, A. V.; MANZANILLA-LÓPEZ, R. H.; ZÚÑIGA, G.; TOVAR-SOTO, A. Identification and molecular characterisation of new Mexican isolates of *Pochonia chlamydosporia* for the management of *Meloidogyne* spp. **Biocontrol Science and Technology**, v. 24, n. 1, p. 1-21, 2013.

MICHEREFF, S. J. Controle Biológico de Doenças de Plantas. In: MICHEREFF, Sami J. Fundamentos de Fitopatologia. Recife-PE: Laboratório de Epidemiologia de Doenças de Plantas, p. 123-128, 2001.

MO, M. H.; XU, C. K.; ZHANG, K. Q. Effects of carbon and nitrogen sources, carbon-to-nitrogen ratio, and initial pH on the growth of nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* in liquid culture. **Mycopathologia**, v. 159, p. 381-387, 2005.

MOGHADDAM, H. A.; PANJEHKEH, N. Relation soil amendments and microbial antagonists for biological control of nematodes. **Applied Science Reports**, v. 15, n. 3, p. 111-116, 2016.

MONFORT, E.; LOPEZ-LLORCA, L. V.; JANSSON, H-B.; SALINAS, J.; PARK, J. O.; SIVASITHAPARAM, K. Colonisation of seminal roots of wheat and barley by egg-parasitic nematophagous fungi and their effects on *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* and development of root-rot. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 37, p. 1229-1235, 2005.

MORANDI, M. A. B.; BETTIOL, V.. Controle Biológico de Doenças de Plantas no Brasil. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. (Eds) Biocontrole de Doenças de Plantas: Uso e Perspectivas. Jaguariúna-SP: Embrapa Meio Ambiente, p. 153-172, 2009.

MOURA, R. M. Gênero *Meloidogyne* e a meloidoginose. Parte I. Revisão Anual de Patologia de Plantas, v. 4, p. 209-244, 1996.

NAVARRO, F. F.; MARTÍNEZ, K. V.; DAMIÁN, J. M. New records of *Pochonia chlamydosporia* from Mexico: isolation, root colonization and parasitism of *Nacobbus aberrans* eggs. **Nematropica**, v.39, n. 1, p. 133-142, 2009.

NAZARENO, G. G. **Utilização de matéria orgânica no controle de nematoide das galhas em alface sob cultivo protegido**. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, Brasília, 2009.

PÉREZ-RODRÍGUEZ, I.; DOROTEO-MENDONZA, A.; FRANCO-NAVARO, F.; SANTIAGO-SANTIAGO, V.; MONTERO-PINEDA, A. Isolates of *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* from Mexico as potential biological control agents of *Nacobbus aberrans*. **Nematropica**, v.37, n. 1, p. 127-134, 2007.

SILVA, E. A. R.; BATISTA FILHO, A.; WENZEL, I. M.; FURTADO, E. L.; ALMEIDA, J. E. M. Seleção de isolados de fungos entomopatogênicos para o controle de *Leptopharsa heveae* (hemiptera: heteroptera, tingidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 79, n. 4, 2012.

SILVA, F.A.S. ASSISTAT: Versão 7.7 beta. DEAG-CTRN-UFCG – Atualizado em 01 de abril de 2014. Disponível em . Acessado em: 20 de maio de 2014.

SILVA, J. F. V. Resistência Genética de soja a nematóides do Gênero *Meloidogyne*. In: SILVA, J. F. V. (Org.). Relações parasito-hospedeiro nas meloidoginoses da soja. Londrina: Embrapa Soja/Sociedade Brasileira de Nematologia, p. 95-127, 2001.

SOARES, P. L. M. **Estudo do controle biológico de fitonematoides com fungos nematófagos**. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2006.

TIKHONOV, V. E.; LOPEZ-LORCA, L. V.; SALINAS, J.; JANSSON, H. B. Purification and characterization of chitinases from the nematophagous fungi *Verticillium chlamydosporium* and *V. suchlasporium*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 35, p. 67-78, 2002.

VIGGIANO, J. R.; FREITAS, L. G.; FERREIRA, P. A. Resíduo da produção de *Pochonia chlamydosporia* no desenvolvimento de mudas e plantas de alface. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, n. 7, p. 983-990, 2012.

VIGGIANO, J. R.; FREITAS, L. G.; LOPES, E. A. Use of *Pochonia chlamydosporia* to control *Meloidogyne javanica* in cucumber. **Biological Control**, v. 69, p. 72–77, 2014.



VIVAS, J. M. S.; VIVAS, M.; SILVEIRA, S. F. Efeito da temperatura sobre o crescimento e esporulação *in vitro* de fungos hiperparasitas de *Asperisporium caricae*. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 45, n. 1, p. 73-81, 2015.

WANG, K. RIGGS, R. D.; CRIPPEN, D. Isolation, Selection and Efficacy of *Pochonia chlamydosporia* for control of *Rotylenchulus reniformis* on Cotton. **Phytopathology**, v. 95, n. 8, p. 890-893, 2005.

WILCKEN, S. R. S.; GARCIA, M. J. de; SILVA, N. da. Resistência de alface do tipo americano à *Meloidogyne incognita* Raça 2. **Nematologia Brasileira**, v. 29, n. 2, p. 267-271, 2005.