

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA-“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**CONTROLE BIOLÓGICO DE NEMATÓIDES DE GALHA DO
CAFEEIRO COM FUNGOS NEMATÓFAGOS**

Aláide Aparecida Krzyzanowski

Engenheira Agrônoma

JABOTICABAL - SÃO PAULO - BRASIL

Junho de 2006

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**CONTROLE BIOLÓGICO DE NEMATÓIDES DE GALHA DO
CAFEIRO COM FUNGOS NEMATÓFAGOS**

**Aláide Aparecida Krzyzanowski
Orientador: Prof. Dr. Jaime Maia dos Santos
Co-Orientador: Prof. Dra. Rita de Cássia Panizzi**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Agronomia (Produção Vegetal).

Jaboticabal – SÃO PAULO - BRASIL
Junho de 2006

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

ALAIDE APARECIDA KRZYZANOWSKI - nascida em Itararé, SP. Engenheira Agrônoma, formada em 1981 pela Fundação Faculdade de Agronomia “Luiz Meneghel”, em Bandeirantes, PR. Em março de 1986 ingressou por concurso público no Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR), Londrina – PR, atuando como Pesquisadora na área de Proteção de Plantas (APP) – Nematologia, onde desenvolveu atividades com várias culturas, tais como feijão, seringueira, *Leucaena* spp., bracatinga, erva-mate, uva, caqui, acerola, pupunha e, com maior ênfase, em cafeicultura, atuando na pesquisa e ministrando palestras e cursos sobre os problemas causados por nematóides na cultura do cafeeiro, bem como em trabalhos de extensão junto a EMATER-PR. Em 1995 concluiu seu curso de mestrado na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, da Universidade de São Paulo, USP, onde desenvolveu o trabalho “Efeitos do tipo e nível de inóculo de *Meloidogyne incognita* e *M. javanica* (Nemata: Heteroderidae) sobre o crescimento de diferentes plantas cultivadas”. Participou dos Congressos Brasileiros de Nematologia desde 1988 a 2004, com vários trabalhos apresentados nesses eventos, como autora ou co-autora e publicados na Revista Brasileira de Nematologia. Em agosto de 2002 ingressou no curso de doutorado em Agronomia (Produção Vegetal) na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP/ Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV, Câmpus de Jaboticabal.

À minha filha Danyele, com amor

DEDICO

“Avança para as águas mais profundas e
lançai vossas redes para a pesca”

Lucas 5, 1-11

AGRADECIMENTOS

A DEUS, pela sua graça, dando-me entusiasmo e coragem para superar as dificuldades.

Ao Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR), pela confiança e oportunidade oferecida.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Câmpus de Jaboticabal, pela acolhida para a realização do curso de Pós-Graduação em nível de doutorado.

Ao professor Dr. Jaime Maia dos Santos, em apreço á sua orientação, amizade, incentivo constante e grande contribuição na execução deste trabalho.

A professora Dra. Rita de Cássia Panizzi, do Departamento de Fitossanidade da FCAV, pela sua valiosa co-orientação e, sobretudo, dedicação e amizade.

Ao Pesquisador Dr. Wallace Gonçalves , da Seção Genética do Instituto Agronômico de Campinas, pelo suporte na indicação da área para realização do estudo.

Ao Engenheiro Agrônomo da Consultoria de Assistência Técnica Integral – CATI, Sr. José Achicar, por ter permitido utilizar, sem restrições a sua Área Cafeeira, localizada na Fazenda Delícia no município de Cássia dos Coqueiros – SP.

A professora Dra. Durvalina Maria Mathias dos Santos do Departamento de Biologia Aplicada á Agropecuária, pelo apoio e solicitude.

Ao professor Dr. David Arioaldo Banzatto, do Departamento de Ciências Exatas da UNESP/FCAV, pela colaboração nas análises estatísticas dos dados.

Aos Professores do Curso de Produção Vegetal, pelos ensinamentos transmitidos durante o curso.

Aos meus colegas do curso, pela agradável convivência.

Aos Engs. Agrs: Meg-Magê, Ivo A. Marchiorato, Renato Z. Corbani, Vilmar Gonzaga, Adriana Luiza, por estarem presentes em todos os momentos de minha vida, pelo incentivo, companheirismo, otimismo e confiança depositada.

Aos funcionários do Laboratório de Nematologia, a secretária Aracyara Maria, André Maurício, Valmir, Sandra, pela amizade e ajuda nesses anos de convivência.

Aos funcionários do Laboratório de Fitopatologia, Rosângela, Lucia Rita, Luiz Carlos, Wanderlei, pela colaboração nos trabalhos desenvolvidos neste Departamento.

A todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho,

AGRADEÇO.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS	xi
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xv
I. INTRODUÇÃO	1
II. REVISÃO DE LITERATURA	3
III. MATERIAL E MÉTODOS	9
3.1. Locais de Realização dos Experimentos	9
3.2. Multiplicação e preparo da suspensão do nematóide de vida livre <i>Panagrellus sp.</i> para ser utilizado como “Isca” no isolamento dos fungos	9
3.3. Detecção e isolamento dos fungos predadores de nematóides	10
3.4. Identificação dos fungos isolados	10
3.5. Preservação e manutenção dos fungos.....	11
3.6. Crescimento e esporulação dos fungos nematófagos em diferentes meios de cultura	11
3.7. Obtenção de ovos e juvenis de segundo estágio de <i>Meloidogyne</i> <i>paranaensis</i>	14
3.8. Teste de patogenicidade dos fungos nematófagos para <i>Meloidogyne paranaensis</i>	14
3.9. Microscopia eletrônica de varredura dos fungos selecionados	15
3.10. Produção dos inóculos dos fungos nematófagos	16

3.11. Avaliação da eficácia da mistura de fungos nematófagos no manejo de <i>Meloidogyne exigua</i> e <i>M. paranaensis</i> em cafeeiro no campo	17
3.12. Avaliação da eficácia da mistura de fungos nematófagos na redução da população de <i>Meloidogyne exigua</i> e <i>M. paranaensis</i> em cafeeiros cultivados em vasos em casa de vegetação.....	21
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
4.1. Fungos nematófagos empregados no estudo da eficácia do controle biológico de nematóides em cafeeiro	23
4.2. Crescimento e esporulação dos fungos nematófagos em diferentes meios de cultura	23
4.3. Teste de patogenicidade dos fungos nematófagos para <i>Meloidogyne paranaensis</i>	29
4.4. Microscopia eletrônica de varredura de alguns dos fungos nematófagos incluídos no estudo	34
4.5. Produção do inóculo dos fungos nematófagos incluídos no estudo.	40
4.6. Avaliação da eficácia da mistura de fungos nematófagos no manejo de <i>Meloidogyne exigua</i> e <i>M. paranaensis</i> em cafeeiro no campo	42
4.7. Avaliação da eficácia da mistura de fungos nematófagos na redução da população de <i>Meloidogyne exigua</i> e <i>M. paranaensis</i> em cafeeiros cultivados em vasos em casa de vegetação.....	47
V. CONCLUSÕES	51
VI. REFERÊNCIAS.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Análise granulométrica (a) e química (b) do solo da área experimental na Fazenda Delícia, no Município de Cássia dos Coqueiros-SP.....	18
Tabela 2. Análise de variância do desdobramento da interação meios x fungos no estudo do crescimento micelial de isolados de fungos nematófagos em três meios, avaliado pelo diâmetro de colônias (mm)	25
Tabela 3. Análise de variância desdobramento da interação meios x fungos no estudo da esporulação de fungos nematófagos em três meios de cultura.....	25
Tabela 4. Diâmetro de colônias (mm) de seis isolados de fungos nematófagos cultivados em três meios de cultura	26
Tabela 5. Estimativa dos números de conídios produzidos por seis isolados de fungos nematófagos cultivados em três meios de cultura	28
Tabela 6. Análises de variância relativas à percentagem de predação de juvenis de segundo estágio de <i>Meloidogyne paranaensis</i> pelos isolados AO1 e AO2 do fungo <i>Arthrobotrys oligospora</i> e por um isolado de cada um dos fungos <i>Arthrobotrys</i> sp., <i>A. musiformis</i> e <i>Monacrosporium robustum</i>	29
Tabela 7. Análises de variância relativas à percentagem de predação de juvenis de segundo estágio de <i>Meloidogyne paranaensis</i> pelos isolados AO1 e AO2 do fungo <i>Arthrobotrys oligospora</i> e por um isolado de cada um dos fungos <i>Arthrobotrys</i> sp., <i>A. musiformis</i> e <i>Monacrosporium robustum</i> dentro dos períodos de tempo considerados	30
Tabela 8. Comparação entre as médias da percentagem de juvenis de segundo estágio de <i>Meloidogyne paranaensis</i> predados pelos fungos nematófagos em estudo, dentro dos períodos considerados	31

Tabela 9. Análise de variância e comparação entre as médias de percentagem, não transformadas, pelo teste de Tukey da colonização de ovos de <i>Meloidogyne paranaensis</i> <i>in vitro</i> por <i>Paecilomyces lilacinus</i>	33
Tabela 10. Análise de variância e comparação entre as médias da população de nematóides e de ovos, aos 60 dias após a aplicação dos fungos nematófagos, em duas doses, em cafezal infestado por <i>Meloidogyne exigua</i> e <i>M. paranaensis</i>	43
Tabela 11. Análises de variância e comparação entre as médias da população de nematóides e de ovos, aos 90 dias após a aplicação dos fungos nematófagos, em duas doses, em cafezal infestado por <i>Meloidogyne exigua</i> e <i>M. paranaensis</i>	45
Tabela 12. Análises de variância e comparação entre as médias da população de nematóides e de ovos, aos 120 dias após a aplicação dos fungos nematófagos, em duas doses, em cafezal infestado por <i>Meloidogyne exigua</i> e <i>M. paranaensis</i>	46
Tabela 13. Análises de variância para as variáveis da parte aérea de plantas de cafeeiro cv. Mundo Novo, cultivadas em vasos contendo solo naturalmente infestado por <i>Meloidogyne exigua</i> e <i>M. paranaensis</i> , em casa de vegetação	48
Tabela 14. Análises de variância e comparação entre médias de variáveis avaliadas em raízes de cafeeiros cv. Mundo Novo cultivados em vasos em solo naturalmente infestados por <i>Meloidogyne exigua</i> e <i>M. paranaensis</i> , em casa de vegetação	48

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Aspectos do experimento sobre o crescimento e a esporulação de fungos nematófagos em diferentes meios de cultura. A) Disposição das placas com as culturas dos fungos no delineamento inteiramente casualizado. B) Esquema adotado para medição perpendicular de diâmetros das colônias. C) Aspecto do crescimento de *Arthrobotrys oligospora* em meio de fubá-ágar. D) Aspecto da cultura de *Paecilomyces lilacinus* em meio de batata-dextrose-ágar. E) Aspecto da cultura de *Monacrosporium robustum* em meio de fubá-ágar 13
- Figura 2. Raízes de cafeeiros infectadas por nematóides de galha. A) Radicelas exibindo galhas arredondadas nas extremidades típicas da infecção por *Meloidogyne exigua*. B e C) Raízes lignificadas exibindo aspecto corticento resultante da infecção por *Meloidogyne paranaensis* 16
- Figura 3. Vista parcial do experimento no campo para estudo da eficácia de fungos nematófagos no manejo de *Meloidogyne exigua* e *M. paranaensis* em cafeeiro na Fazenda Delícia, Município de Cássia dos Coqueiros – SP. A) Vista parcial do experimento. B) Aplicação em sulcos laterais na base das plantas. C) Aplicação sob a projeção da saia dos cafeeiros 20
- Figura 4. Vista parcial do experimento em casa de vegetação para estudo da eficácia de fungos nematófagos no manejo de *Meloidogyne exigua* e *M. paranaensis* em cafeeiro 21
- Figura 5. Fotomicrografias de fungos nematófagos utilizados no estudo da eficácia do controle biológico de nematóides-de-galha do cafeeiro. A) *Paecilomyces lilacinus*, exibindo fiálide típica da espécie (seta). B) *Arthrobotrys* sp. C) *Arthrobotrys oligospora*, isolado AO1. D) *Arthrobotrys oligospora*, isolado AO2. E) *Arthrobotrys musiformis*. F) *Monacrosporium robustum* (barras das escalas para B - F = 10 µm) 24

- Figura 6. Fotomicrografias de ovos de *Meloidogyne paranaensis* colonizados por *Paecilomyces lilacinus*. A) Ovo colonizado em estágio inicial da embriogênese. B) Juvenil em estágio inicial de desenvolvimento parasitado pelo fungo dentro do ovo (barras das escalas = 10 µm) 34
- Figura 7. Eletromicrografias de varredura de *Arthrobotrys musiformis*. A e B) Conjunto de conídios e conídio individual, respectivamente, exibindo um septo (seta) e a forma característica da espécie. C e D) Estrutura de captura na forma de rede tridimensional em início de formação e exibindo duas alças já formadas. E e F) Juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne paranaensis* capturadas pelo fungo 36
- Figura 8. Eletromicrografias de varredura de *Arthrobotrys sp.* A) Estrutura de captura na forma de rede adesiva tridimensional. B) Região anterior de um juvenil de segundo estágio de *Meloidogyne paranaensis* capturado pelo fungo (seta) 37
- Figura 9. Eletromicrografias de varredura de *Arthrobotrys oligospora*. A) Conídios do fungo. B) Forma e septação (seta) característica do conídio. C) Nematóide capturado pelo fungo 38
- Figura 10. Eletromicrografias de varredura de *Monacrosporium robustum*. A) Conídio do fungo exibindo quatro septos (setas). B) Nematóide capturado pelo fungo e estrutura de captura na forma de ramos adesivos (setas) 39
- Figura 11. Eletromicrografia de varredura de cadeias basipetais de conídios unicelulares, ovóides a fusiformes de *Paecilomyces lilacinus* (barra da escala = 10 µm) 40
- Figura 12. Porções do substrato constituído por partes iguais de palha de café e farelo de arroz em sacos de polipropileno autoclaváveis colonizadas pelos diferentes fungos nematófagos incluídos no estudo. A) *Arthrobotrys oligospora* (isolado AO1). B) *A. oligospora* (isolado AO2). C) *Arthrobotrys sp.* D) *A. musiformis*. E) *Monacrosporium robustum*. F) *Paecilomyces lilacinus* 41

Figura 13. Fotomicrografias de caracteres morfológicos marcantes para identificação das espécies de *Meloidogyne* Goeldi envolvidas no estudo da eficácia do controle biológico de nematóides de galha do cafeeiro. A) Padrão perineal de *M. exigua*. B) Padrão perineal de *M. paranaensis*. C) Região anterior de macho de *M. exigua*. D) região anterior de macho de *M. paranaensis* (barras das escalas = 20 μm) 42

CONTROLE BIOLÓGICO DE NEMATÓIDES DE GALHA DO CAFEEIRO COM FUNGOS NEMATÓFAGOS

RESUMO - Os objetivos do trabalho foram isolar, identificar, comparar meios de cultura para crescimento, esporulação de fungos nematófagos e testá-los no controle de *Meloidogyne exigua* e *M. paranaensis* em laboratório, casa de vegetação e em cafezal infestado. Foram testados dois isolados de *Arthrobotrys oligospora* e um de *Arthrobotrys* sp., *A. musiformis*, *Monacrosporium robustum* e *Paecilomyces lilacinus*. Os dados obtidos revelaram que esses fungos ocorrem em diferentes agroecossistemas, têm exigências nutricionais especiais e apresentam diferentes níveis de predação para os nematóides estudados. Os meios, farelo de arroz, extrato de levedura e ágar, e o de fubá e ágar propiciaram crescimento e esporulação adequados para a maioria dos isolados estudados. A mistura de palha de café com farelo de arroz foi um substrato adequado para formulação desses fungos. Uma aplicação de 1 ou 2 L da mistura de partes iguais desse substrato colonizado pelos fungos, proporcionou a redução da população dos nematóides. No período estudado a cultura tratada não esboçou sinais de recuperação, indicando que cafezais depauperados, em solos degradados, não se recuperam com uma aplicação. Os dados também possibilitaram inferir que o controle biológico dos nematóides do cafeeiro será tanto mais efetivo quanto mais cedo forem iniciados os tratamentos, e a aplicação sistemática dos fungos, com isolados mais agressivos contra os nematóides presentes, deve ser efetuada.

Palavras-Chave: *Coffea arabica*, manejo ecológico, *Meloidogyne exigua*, *Meloidogyne paranaensis*,

BIOLOGICAL CONTROL OF ROOT-KNOT NEMATODES OF COFFEE WITH ANTAGONISTIC FUNGI.

ABSTRACT - The objective of the research was to isolate, identify and compare culture media for growth and sporulation of nematode antagonistic fungi, and to evaluate the efficiency of these agents for biological control of *Meloidogyne exigua* and *M. paranaensis* under laboratory, greenhouse and field environmental conditions. Two isolates of *Arthrobotrys oligospora*, one of *Arthrobotrys* sp. and one of each species of *A. musiformis*, *Monacrosporium robustum* and *Paecilomyces lilacinus*, were also evaluated. It was observed that those fungi were very common under distinct agroecosystems, having special nutrition requirements, and also different pathogenicity levels for the nematodes above related. The culture media prepared with rice meal, malt extract and agar as well as the corn meal agar favoured adequate growth and sporulation of most the isolates evaluated. The mixture of coffee straw with rice meal showed to be an adequate substrate for these fungi formulation under experimental trials. Just one application of one or two liters of a mixture of equal parts of the substrate colonized by the fungi, reduced the population of nematodes. However, the treated coffee trees did not show any sign of recovery during the period of study, indicating that weak coffee trees under poor soil conditions could not recover with just one treatment. The data also show that biological control of coffee nematodes can be more effective as early as the treatment with the fungi is applied, and, considering that it is a perennial crop, the fungi systematic application along with the selection of more aggressive isolates against the nematodes, must be done.

Keywords: *Coffea arabica*, ecological management, *Meloidogyne exigua*, *Meloidogyne paranaensis*.

I. INTRODUÇÃO

Os nematóides de galha (*Meloidogyne* spp.) estão entre os patógenos de maior importância econômica tanto no Brasil como em todo o mundo (SASSER, 1989). Podem, inclusive, inviabilizar o cultivo de certas culturas tanto em propriedades como em uma inteira região. Com efeito, atribui-se aos nematóides-de-galha, a substituição da cafeicultura pela cana-de-açúcar no Rio de Janeiro, em fins do século XIX e início do século seguinte (GOELDI, 1892). No Estado de São Paulo, esta mesma opção foi adotada em várias regiões, notadamente na Alta Mogiana. No Norte do Estado, os citros, pelo fato de não serem suscetíveis aos nematóides-de-galha que ocorrem no Brasil, foram as opções encontradas para substituição da cafeicultura praticamente dizimada pelos nematóides.

O manejo dos nematóides-de-galha em cafeeiro, notadamente nos últimos anos, tem sido praticado, principalmente, com nematicidas químicos. Entretanto, considerando a necessidade de preservação do meio ambiente, além do fato de que a relação custo/benefício dessa prática nem sempre é satisfatória, novas alternativas devem ser desenvolvidas para o manejo dessas pragas.

Com a finalidade de diminuir as perdas, o impacto econômico e ecológico, nos últimos anos, a utilização do controle integrado dos fitonematóides, explorando a combinação de várias medidas de controle, vem experimentando notável interesse no Brasil e no mundo. O sucesso econômico e ecológico do manejo dos fitonematóides requer a adoção de medidas de manejo combinadas, tais como medidas de exclusão, rotação de culturas, utilização de plantas antagonistas, controle químico, variedades resistentes, controle biológico e outras. Dessas, em nosso País, o controle biológico é a alternativa menos estudada, visto que poucos profissionais têm se dedicado a esse campo. As pesquisas nessa área, em sua maior parte, têm focado, apenas, a detecção de agentes potenciais do controle biológico, em que pesem as evidências favoráveis ao sucesso da utilização dessa alternativa. Contudo, alguns estudos já demonstraram o potencial do controle biológico de nematóides-de-galha do cafeeiro. Campos e Campos (1997) confirmaram que alguns fungos nematófagos reduziram

significativamente o número de juvenis de segundo estágio, o número de ovos e a população total de *Meloidogyne exigua* Goeldi, em experimento com cafeeiros cultivados em vasos, quando comparados à testemunha inoculada apenas com o nematóide. As culturas propagadas por mudas potencializam a utilização do controle biológico de nematóides, visto que os agentes do biocontrole podem ser acrescentados aos substratos, colocando-os diretamente na rizosfera das mudas.

Projetos recentes desenvolvidos na Unesp/FCAV (MAIA, 2000; MAIA et al., 2001; BERNARDO, 2002; CORBANI, 2002), alguns com suporte da Fapesp, evidenciaram a possibilidade de se passar à prática, inclusive com o lançamento de formulações comerciais de fungos nematófagos, em pouco tempo (FAPESP, 2002).

Os objetivos deste trabalho foram: 1) obter isolados de fungos nematófagos patogênicos para os nematóides-de-galha do cafeeiro; 2) estudar o modo de ação e documentar as estruturas de captura e reprodutivas dos fungos nematófagos ao microscópio eletrônico de varredura; 3) avaliar, comparativamente, meios de cultura para crescimento e esporulação de fungos nematófagos; 4) comparar a produção de inóculo de fungos nematófagos em diferentes substratos; 5) avaliar a eficácia do controle biológico dos nematóides-de-galha do cafeeiro em casa de vegetação; 6) avaliar a eficácia do controle biológico dos nematóides-de-galha do cafeeiro, no campo, em cultivo naturalmente infestado.

II. REVISÃO DE LITERATURA

O conhecimento da existência de fungos nematófagos é muito antigo. As primeiras pesquisas foram conduzidas por Lodhe, em 1874, com o fungo endoparasito *Harposporium anguillulae* (NOVARETTI, 1986). Contudo, foi a partir da comprovação de que populações de *Heterodera avenae* Wollenweber e de nematóides-de-galha (*Meloidogyne* spp.) vinham sendo controlados, naturalmente, por fungos endoparasitos, na Inglaterra, que o interesse pelo uso do controle biológico de nematóides experimentou notável aumento em todo o mundo (JATALA et al., 1981; KERRY et al., 1982).

Entre os agentes do controle biológico de nematóides, os fungos têm se destacado como os mais promissores, despertando o interesse na comunidade científica em vários países. Dentre os fungos nematófagos, em geral, os que produzem armadilhas que capturam os nematóides (fungos predadores) são apontados como os mais promissores, entre os quais figuram espécies de *Arthrobotrys* Corda, *Dactylaria* Saccardo, *Dactylella* Grove e *Monacrosporium* Oudemans (MANKAU, 1980). Vários pesquisadores têm constatado a ocorrência desses fungos predadores em diferentes agroecossistemas no Brasil (NAVES e CAMPOS, 1991; DALLA PRIA et al., 1991; LIMA 1996; CAMPOS e CAMPOS, 1997; RIBEIRO et al., 1999, COIMBRA et al., 1999; SANTOS e FERRAZ, 2000).

Resultados de estudos que demonstram o potencial desses fungos têm sido publicados por diferentes pesquisadores (DAVIDE, 1988; KHAN e HUSAIN, 1988; KO et al., 1995). No Brasil, vários pesquisadores têm conseguido excelentes resultados com isolados de *Paecilomyces lilacinus* (Thom.) Samson, principalmente no controle de *M. javanica* (Treb) Chitwood (CAMPOS, 1992; CARNEIRO e GOMES, 1993; RIBEIRO e CAMPOS, 1993; D'ANGIERI FILHO e CAMPOS, 1997). Alguns autores relataram que *Meloidogyne* spp, em tomateiro, *Globodera rostochiensis* (Wollenweber) Behrens, em batata, *Radopholus similis* (Cobb) Thorne, em bananeira, *Tylenchulus semipenetrans* Cobb, em citros, *Rotylenchulus reniformis* Linford e Oliveira, em abacaxi, e *Pratylenchus* spp., em diferentes culturas, foram controlados com eficiência por uma formulação

comercial desse fungo, lançada no mercado filipino com o nome de Bioact (KERRY,1989). Um isolado patenteado de *P. lilacinus* tem sido usado pela firma Australian Technological Innovation Corporation Pty Ltda. como o princípio ativo do nematicida biológico Paecil. Esse produto tem sido testado em vários países e em diferentes culturas (FERRAZ et al., 2001). Nas Filipinas, na década de 1980, a maior parte dos estudos sobre o controle biológico de nematóides teve o enfoque no uso de *P. lilacinus*. O isolado desse fungo que apresentou maior eficácia na colonização de ovos de nematóides (Phil. Strain No. 1) passou a ser produzido em massa e comercializado com a marca BIOCON pela empresa Asiatic Technologies Inc. de Manila (DAVIDE et al., 1990). Segundo Jatala (1986), os resultados da aplicação de *P. lilacinus* no campo, em algumas Fazendas, no Peru, evidenciaram a eficácia desse fungo no controle de *M. incognita* em diferentes culturas e de *T. semipenetrans* em citros. Al-Hazmi et al. (1993) também avaliaram a eficiência de um produto à base de mistura de fungos predadores, produzido com a marca comercial Nemout, na formulação de pó molhável, produzido por uma indústria americana, e confirmaram que o produto reduziu o número de galhas e de ovos de *M. javanica*, na planta hospedeira, sob condições de casa de vegetação. No Brasil, vários pesquisadores também relataram o potencial desses fungos no biocontrole de *Meloidogyne* spp. em diferentes culturas (NAVES e CAMPOS, 1991; DALLA PRIA, 1992; CAMPOS, 1992; CARNEIRO e GOMES, 1993; RIBEIRO e CAMPOS, 1993; DIAS e FERRAZ, 1994).

Estudos concluídos recentemente no Departamento de Fitossanidade da Unesp/FCAV também confirmaram a potencialidade de alguns fungos nematófagos (MAIA, 2000; MAIA et al., 2001; BERNARDO, 2002; CORBANI, 2002). Com efeito, Maia et al., (2001) obtiveram um isolado de *Monacrosporium robustum* McCulloch cuja patogenicidade para juvenis de segundo estágio de *Heterodera glycines* Ichinohe foi de 100% até o terceiro dia após a adição dos juvenis à cultura do fungo. Para *M. javanica* e *M. incognita* esse fungo exibiu 100 % de predação dos juvenis, já no primeiro dia. Na mesma instituição, Bernardo (2002) também constatou que esse fungo predou 100% dos espécimes de *R. reniformis* no período de até três dias após a adição dos nematóides à cultura do fungo, e Corbani (2002) obteve o mesmo resultado para

juvenis e adultos do nematóide dos citros (*T. semipenetrans*), já no primeiro dia. Contudo, os testes no campo realizados por esses dois últimos pesquisadores não confirmaram a eficácia desses fungos no controle desses nematóides, mas fatores adversos, tais como um prolongado veranico que ocorreu no período, provavelmente limitaram a ação dos fungos. Testados em larga escala em cultura de crisântemo de corte em estufas infestadas por *M. javanica*, no município de Holambra - SP (cerca de 8 ha), esses fungos exibiram os melhores resultados no manejo desse nematóide, até o presente, à exceção da fumigação do solo com brometo de metila (FAPESP, 2002). Esse resultado vem confirmar o enorme potencial de mercado que formulações comerciais desses fungos podem ter, o que resultará em ganhos ecológicos e econômicos expressivos.

Em relação aos nematóides de galha do cafeeiro, Campos e Campos (1997) já confirmaram o potencial de alguns fungos nematófagos na redução da população de *Meloidogyne exigua*.

Lima (1996), citando Cooke (1963), agrupou os fungos predadores de acordo com a velocidade de crescimento micelial em três grupos: 1) aqueles que crescem mais rápido e formam redes; 2) os produtores de nódulos adesivos; 3) os de crescimento mais lento que produzem anéis constritores. Essas estruturas de captura são usadas na taxonomia desses fungos.

Os estudos sobre a nutrição dos fungos que capturam fitonematóides são raros na literatura. Para o crescimento de fungos predadores e meio de cultura quimicamente definido, Cascorelli e Pramer (1962), propuseram o meio constituído de glucose 30g; NaNO₃ 3,7g; KH₂PO₄ 3,4g; KCl 0,5g; MgSO₄ 0,5g; FeSO₄·7H₂O 10mg.; ZnO 0,5 mg; tiamina 0,1 mg; biotina 5 mg; e água 1 L. *Arthrobotrys oligospora*, espécie formadora de redes que tem uma alta habilidade saprofítica, foi capaz de utilizar todos os carboidratos testados e vários polissacarídeos, tais como celulose, amido e glicogênio.

Dias (1992) também estudou meios de cultura, substratos, temperatura e pH inicial em meio não tamponado sobre o crescimento e a esporulação de seis isolados de *Arthrobotrys* spp. empregados no controle de *M. incognita* Raça 3. Em milho triturado e quirera de arroz, houve rápida e intensa produção de micélio por todas as

espécies. Entretanto, a esporulação foi pequena ou não ocorreu, indicando que as exigências para a produção de conídios não são as mesmas que para o crescimento micelial.

Bernardo e Santos (2004) estudaram, *in vitro*, a capacidade predatória e de parasitismo de *M. robustum* ao nematóide *Rotylenchulus reniformes*, que é um importante patógeno de várias culturas como soja, algodão, caupi, maracujazeiro, mamoeiro, tomateiro e alface, entre outras. Em períodos de 24, 48 e 72 horas após a adição dos nematóides às culturas do fungo, constataram que a percentagem de predação do nematóide pelo fungo foi de, respectivamente, 81,3; 99,9 e 100% no final das avaliações.

Lilly e Barnett (1951) estudaram a velocidade de crescimento micelial, medindo o diâmetro da colônia em intervalos de 12 e 24 horas, com auxílio de uma régua milimetrada, tomando duas medições, em direções perpendiculares, em cada placa. A seguir, estimaram a média de crescimento micelial para cada isolado. As leituras foram iniciadas às 12 e 24 horas após a instalação do experimento, até a colonização de um dos isolados em toda superfície do meio de cultura.

Dias e Ferraz (1993), em laboratório, avaliaram o crescimento micelial e a esporulação de alguns fungos nematófagos do gênero *Arthrobotrys* em diferentes substratos, meios de cultura, pH e níveis de temperatura. As espécies fúngicas estudadas foram *A. musiformis* (isolado WP 040), *A. conoides* (WP 002 e WP 037), *A. robusta* (WP 052), *A. thaumasia* (WP 047) e *A. irregularis* (França), exceto no ensaio de efeito de temperatura, em que *A. thaumasia* não foi incluído. Testaram os seguintes substratos: milho triturado, quirera de arroz, bagaço de cana-de-açúcar picado e casca de café; os seguintes meios de cultura: BDA, BDA – peptona, CMA, fubá-ágar e YPSSA (extrato de levedura, 4g; K₂HPO₄ 1g; MgSO₄ 7H₂O, 0,5g.; amido solúvel, 20g; ágar, 20g.; água destilada 1 litro); os seguintes níveis de temperatura: 16, 20, 25, 28, 32 e 36^oC e pH: 4, 5, 6, 7, 8 e 9, em meio não tamponado. Em geral, o substrato milho triturado, o meio YPSSA e a temperatura de 25^oC proporcionaram maior crescimento e esporulação em relação aos demais, para todas as espécies. O pH não influenciou o

crescimento micelial da maioria das espécies, enquanto as maiores esporulações ocorreram em pH 4 e 6.

Oliveira et al. (2002) estudaram a caracterização morfológica e isoenzimática de 149 isolados de *Arthrobotrys* spp., obtidos pela técnica de espalhamento de solo tendo identificado as seguintes espécies: *A. musiformis* (a mais freqüente-36,7%), *A. oligospora var. oligospora*, *A. robusta*, *A. conoides* e *A. oviformis*, já detectadas nos solos brasileiros. Encontraram pela primeira vez a ocorrência de *A. superba*, *A. oligospora var. microspora* e *A. brochopaga*. Além dessas, foi detectada uma nova espécie, *Arthrobotrys*, porém não a descreveram. Nenhuma relação entre ocorrência, origem e distribuição das espécies foi observada. Na caracterização isoenzimática, 15 enzimas foram analisadas, e dez (EST, MDH, GOT, SOD, IDH, LAP, 6PGDH, PGI, PGM e HK) mostraram atividade e resolução satisfatórias. Foram identificados 52 fenótipos isoenzimáticos para os 29 isolados de *Arthrobotrys* estudados. Quatro espécies, *A. musiformis*, *A. conoides*, *A. brochopaga* e *Arthrobotrys* sp. n., foram separadas pela análise de agrupamento com base no índice de Jaccard. Os marcadores que mais contribuíram para essa separação foram MDH, GOT e SOD.

Gomes et al. (1997) avaliaram o preparo de uma formulação peletizada do fungo nematófago *P. lilacinus*, utilizando-se de uma mistura de alginato de sódio, argila e sulfato de estreptomicina. A mistura foi homogeneizada em liquidificador e infestada com uma suspensão de conídios do fungo cultivado sobre grãos de arroz. Para obtenção dos péletes, essa suspensão foi gotejada através de pipeta de Pasteur, em solução 0,25 M de CaCl_2 . A seguir os péletes foram secos, verificando-se que a concentração de conídios por grama de péletes foi da ordem de $0,5 \times 10^8$. Os péletes foram armazenados à temperatura ambiente (18-25°C) e a 7°C. A viabilidade do fungo encapsulado foi avaliada mensalmente, durante 12 meses, por meio de testes de germinação e plaqueamento em meio de batata-dextrose-ágar (BDA). A encapsulação em alginato de sódio manteve a viabilidade do fungo por um período de 12 meses à 7°C e 5 meses à temperatura ambiente. A temperatura de armazenamento influenciou na porcentagem de germinação e viabilidade do fungo. A viabilidade dos conídios

decreceu rapidamente no fungo veiculado em arroz, mesmo em condições frigorificadas.

Soares et al. (2005a) aplicaram a mesma mistura de fungos em uma produção comercial de alface (*Lactuca sativa L.*) americana, cv. Lucy Brown, infestada por *M. incognita* e *R. reniformis*, em doses de 4 e 8 L dessa mistura por parcela de 5 m de comprimento por 1 m de largura, com quatro repetições. Parcelas não tratadas foram deixadas como testemunhas. Aos 54 dias após o transplântio não houve diferenças entre a produtividade das parcelas tratadas entre as doses de 4 e 8 L de mistura. Entretanto, a média da massa fresca da parte aérea de 10 plantas colhidas ao acaso foi de 458 g. Nas parcelas não tratadas, usadas como testemunha, o valor dessa variável foi de 106 g.

Soares et al. (2005b) avaliaram a mistura de dois fungos nematófagos (*A. musiformis* e *A. oligospora*) produzidos em arroz e aplicada em cultivo comercial de pimentão (*Capsicum annuum L.*) cv. Elisa, em estufa infestada por *M. incognita*. Aplicaram 1 L/m² dessa mistura de fungos, antes do transplântio das mudas, em três parcelas, e outras duas parcelas foram deixadas como testemunha. Houve eficácia dos fungos no controle do nematóide, resultando em melhor desenvolvimento das plantas nas parcelas tratadas.

III. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Locais de realização dos experimentos

Os estudos em condições controladas foram conduzidos nos Laboratórios de Nematologia e Fitopatologia do Departamento de Fitossanidade da Unesp/FCAV, Câmpus de Jaboticabal, SP. Amostras de solo encaminhadas para análises no Laboratório de Nematologia, provenientes de várias regiões do País, foram utilizadas para detecção e isolamento de fungos nematófagos da microflora do solo e inclusão na micoteca dos fungos nematófagos, do Laboratório de Nematologia da Unesp/ FCAV. E Avaliação da Eficácia da Mistura de Fungos Nematófaos no Manejo de *Meloidogyne exigua* e *M. paranaensis* em Cafeeiro no Campo, bem como a Avaliação da Eficácia da Mistura de Fungos Nematófaos na Redução da População de *Meloidogyne exigua* e *M. paranaensis* em cafeeiros cultivados em vasos em casa de vegetação.

3.2. Multiplicação e preparo da suspensão do nematóide de vida livre *Panagrellus sp.* para ser utilizado como “isca” no isolamento dos fungos

A população de *Panagrellus sp.* foi multiplicada em placas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo farinha de aveia umedecida e macerada. As placas permaneceram à temperatura ambiente até se obter um adequado incremento da população. Essa população vem sendo mantida no Laboratório por meio de repicagens sucessivas para novas placas contendo o mesmo substrato em períodos variáveis de 15 a 30 dias.

Para a obtenção da “isca”, os nematóides eram recolhidos da superfície do meio e das tampas das placas com água comum e transferidos para um béquer de 50 mL. Para clarificar a suspensão foi utilizado o funil de Baermann (BAERMANN, 1917) durante 8 a 12 horas.

3.3. Detecção e isolamento dos fungos predadores de nematóides

Seis amostras de solo de cafezais da região geoeconômica de Londrina-PR foram utilizadas para isolamento de fungos nematófagos. Outras duas amostras de solo da região de Viçosa-MG também foram incluídas no estudo, bem como isolados de alguns dos fungos nematófagos da coleção mantida no Laboratório de Nematologia da Unesp/FCAV.

A técnica utilizada para o isolamento dos fungos das amostras de solo foi a do método do espalhamento de solo (BARRON, 1977), modificada por SANTOS (1991). No centro de placas de Petri com ágar-água a 2% foram colocados 1 a 2 g da amostra de solo homogeneizada. Sobre essa alíquota de solo foi adicionado 1 mL da suspensão de *Panagrellus sp.* contendo, em média, 500 nematóides/mL, preparada conforme o item 3.2, para estimular o crescimento e a esporulação dos fungos. Essas placas foram mantidas a 22-25^oC, em escuro contínuo. A partir do quinto dia do preparo das placas, foram iniciadas as observações em estereoscópio. Na primeira semana, as avaliações eram diárias. Após esse período, passaram a semanais, sendo efetuadas durante três meses. Constatada a presença de nematóides predados, exibindo frutificações fúngicas, as placas foram levadas para a câmara asséptica, e, com auxílio de um estilete de ponta fina, flambado, transferiram-se conídios dessas frutificações para placas com BDA, as quais foram mantidas a 25^oC, em escuro contínuo.

Para confirmar a patogenicidade dos isolados, após sete dias, discos de micélio, com 6 mm de diâmetro, foram retirados das bordas das colônias e transferidos para o centro de placas de Petri com ágar-água 2%. A seguir, adicionou-se 1 mL da suspensão de *Panagrellus sp.*, obtida como descrito no item 3.2. Quando surgiam os nematóides predados, os fungos eram reisolados e comparados com a cultura original.

3.4. Identificação dos fungos isolados

Na identificação dos fungos foram elaboradas lâminas com o corante azul láctico. As variáveis relativas às estruturas e ao comportamento dos fungos, tais como forma,

dimensões e septação dos conídios, tipo de conidióforo, tipo de esterigma e órgãos de captura produzidos, foram utilizadas para identificação das espécies com base nas chaves para espécies segundo Haard (1968), Van Oorschot (1985), Jacobs (2002), Liu e Zhang (1994) e publicações das descrições originais de vários fungos (McCULLOCH, 1977; DRECHSLER, 1937; DRECHSLER, 1961).

3.5. Preservação e manutenção dos fungos

Os fungos foram cultivados em placas de Petri com BDA, mantidas a 25°C em escuro contínuo. Após sete a dez dias, dependendo do fungo, discos de 6 mm de diâmetro foram retirados das bordas das colônias e transferidos para tubos de ensaio com BDA. Foram deixados à temperatura ambiente por duas a três semanas, até que ocorresse a colonização, e a seguir recobertos com óleo mineral autoclavado e mantidos à temperatura ambiente.

3.6. Crescimento e esporulação dos fungos nematófagos em diferentes meios de cultura

Utilizaram-se em todos os testes culturas puras de seis isolados de cinco espécies de fungos nematófagos. Os isolados de *P. lilacinus*, *Arthrobotrys* sp. e o isolado AO1 de *A. oligospora* foram obtidos de amostras de solo da região de Londrina, PR, e o isolado AO2 de *A. oligospora* foi obtido de uma amostra de solo da região de Viçosa, MG. O isolado de *A. musiformis* e o de *M. robustum* foram obtidos da coleção de fungos nematófagos do Laboratório de Nematologia da Unesp/FCAV. Culturas puras desses isolados foram repicadas, em câmara asséptica, para placas de Petri de 90 mm de diâmetro contendo 20 mL dos meios de cultura. Um disco de 6 mm de diâmetro das bordas de colônias em crescimento de cada fungo foi colocado no centro de cada placa contendo os meios, e as culturas foram incubadas a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, com fotofase de 12 horas.

Esses tratamentos constituíram um fatorial de 3 x 6, sendo três meios de cultura e seis isolados dos fungos nematófagos. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com 10 repetições, sendo cada repetição constituída por uma placa de Petri. Os dados foram submetidos à análise de variância e, quando houve significância pelo teste F, procedeu-se à comparação entre as médias pelo teste de Tukey com 5% de probabilidade.

As leituras foram iniciadas 12 horas após a instalação do experimento. O crescimento micelial dos isolados foi determinado medindo-se o diâmetro das colônias em intervalos de 12 horas, com auxílio de uma régua milimetrada, realizando-se duas medições em direções perpendiculares em cada placa, conforme ilustrado nas Figuras 1 B - D. Às médias foram diminuídas 6 mm, correspondentes ao diâmetro do disco de cultura dos fungos inicialmente colocado em cada placa. A Figura 1 A ilustra como as placas foram dispostas sobre uma bancada durante a condução do experimento, tendo sido cobertas com plástico preto, para exclusão da luz. Durante seis dias foram efetuadas medidas do crescimento micelial dos fungos, até que o crescimento da colônia de um dos isolados ocupasse toda a superfície do meio (LILLY e BARNETT, 1951). Após as mensurações, as placas foram mantidas no escuro por 30 dias. Então, foi estimada a esporulação dos isolados nos diferentes meios. Para tanto, 10 mL de água destilada esterilizada foram adicionados a cada placa, friccionando-se levemente a superfície da cultura com um pincel. A seguir, a suspensão de conídios foi recolhida em um béquer de 50 mL, e a concentração desses conídios foi estimada com câmara de Neubauer.

Foram testados os seguintes meios de cultura: 1) decocto de farelo arroz, extrato de levedura e ágar (FEA); 2) batata-dextrose-ágar (BDA); 3) meio de fubá-ágar (MFA), preparados do seguinte modo: a) o meio FEA foi preparado pela decocção de 100 g de farelo de arroz em 600 mL de água destilada por 1 hora. O decocto foi passado por uma peneira de 60 mesh (abertura de 0,250 mm) e acrescido de 0,50 g de extrato de levedura uniformemente suspenso em 2 mL de água destilada, com auxílio de um agitador magnético. A seguir, foram adicionados 17 g de ágar, o volume foi completado para 1.000 mL com água destilada e autoclavado por 20 minutos a 120⁰C e 1 atm; b) o

meio BDA, batata-dextrose-ágar, foi preparado com 200 g de batata descascada, picada e cozida por 20 minutos. Ao decocto foram acrescentados 20 g de dextrose e 17g de ágar, sendo o volume completado com água destilada para 1.000 mL e autoclavado por 20 minutos, a 120^oC e 1 atm; c) o meio MFA foi preparado com 50g de fubá em 800 mL de água destilada, mantidos por 12 horas na geladeira, (aproximadamente 5^oC).

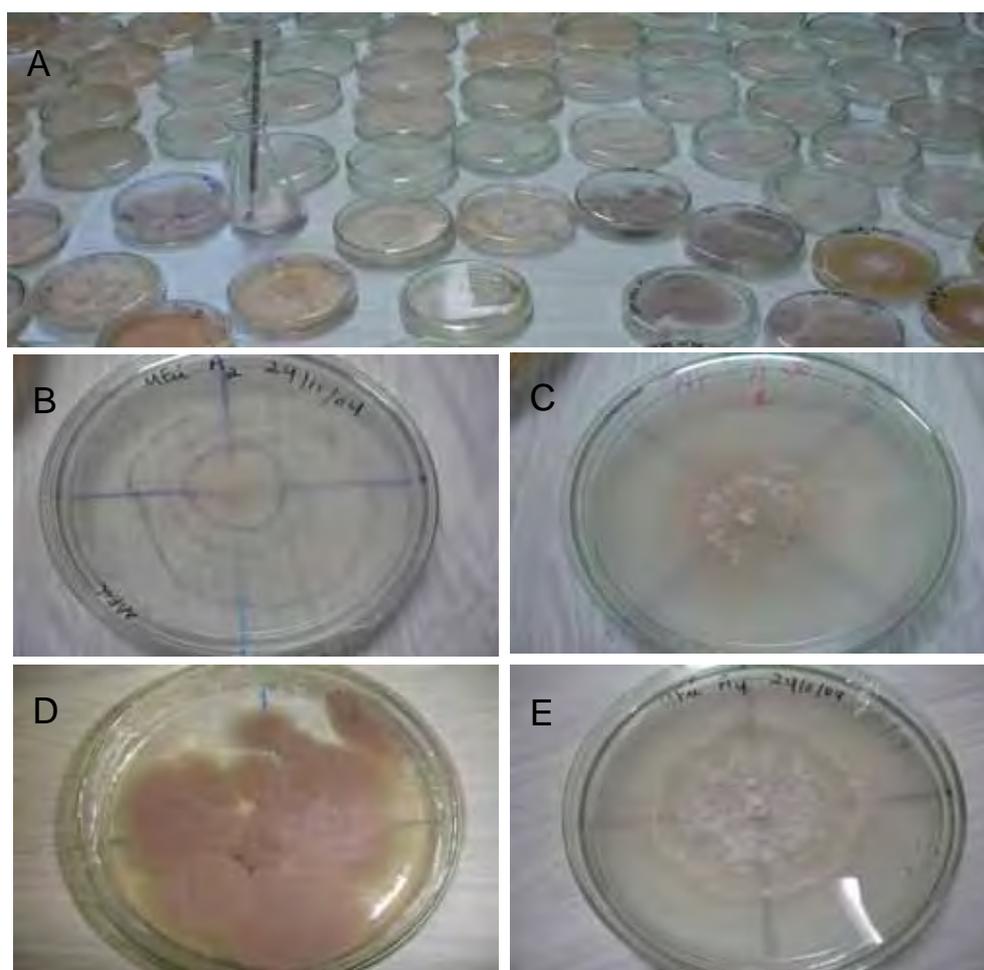


Figura 1. Aspectos do experimento sobre o crescimento e a esporulação de fungos nematófagos em diferentes meios de cultura. A) Disposição das placas com as culturas dos fungos no delineamento inteiramente casualizado. B) Esquema adotado para medição perpendicular de diâmetros das colônias. C) Aspecto do crescimento de *Arthrobotrys oligospora* em meio de fubá-ágar. D) Aspecto da cultura de *Paecilomyces lilacinus* em meio de batata-dextrose-ágar. E) Aspecto da cultura de *Monacrosporium robustum* em meio de fubá-ágar.

A seguir, foi aquecido a 60^oC por uma hora em banho-maria, peneirado em malha com abertura de 0,250 mm, adicionados 17 g de ágar, completado o volume para 1.000 mL com água destilada e autoclavado como anteriormente citado.

3.7. Obtenção de ovos e juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne paranaensis*

A partir de amostras de raízes de cafeeiro infectadas por *M. paranaensis*, coletadas na Fazenda Delícia, no Município de Cássia dos Coqueiros–SP, foi obtida uma suspensão aquosa de ovos e alguns juvenis de segundo estágio empregando-se o método de Hussey e Barker (1973). Suspensões concentradas de juvenis de segundo estágio foram obtidas pela técnica de Cliff e Hirschmann (1985). As suspensões de ovos foram utilizadas no teste de patogenicidade de *P. lilacinus* para ovos do nematóide e na obtenção de juvenis para o teste de patogenicidade dos demais fungos testados para juvenis do nematóide.

3.8. Teste de patogenicidade dos fungos nematófagos para *Meloidogyne paranaensis*

Embora tenham sido detectadas as espécies *M. exigua* e *M. paranaensis* no cafezal utilizado para o estudo, *M. paranaensis* prevalecia na área escolhida para o teste. Por conseguinte, essa espécie foi escolhida para o teste de patogenicidade. Raízes com galhas típicas às formadas por *M. exigua*, conforme ilustrado na Figura 2 A, foram retiradas das amostras coletadas no campo para o preparo das suspensões de ovos e de juvenis de segundo estágio, conforme descrito no item anterior. Assim, apenas raízes lignificadas, exibindo engrossamentos típicos aos causados por *M. paranaensis*, foram utilizadas (Figura 2 B e C).

Dois discos com 6 mm de diâmetro de culturas puras dos fungos *Arthrobotrys oligospora* (AO1), *Arthrobotrys oligospora* (AO2), *Arthrobotrys* sp., *Arthrobotrys musiformis*, *Monacrosporium robustum* e *Paecilomyces lilacinus* foram removidos das

bordas das colônias e transferidos para placas de Petri, tendo sido colocados eqüidistantes e entre as bordas das placas contendo ágar-água a 2%.

Essas subculturas foram incubadas por cinco dias, a $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ no escuro. Após esse período, foi adicionado 1 mL de suspensão de juvenis de segundo estágio de *M. paranaensis*, contendo, em média, 50 espécimes, ou 1 mL de suspensão de ovos do nematóide, na mesma concentração, no caso de *P. lilacinus*. As placas foram mantidas no escuro em incubadora tipo B.O.D. a $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Após 36 horas, diariamente, foram efetuadas as observações quanto à presença de ovos colonizados por *P. lilacinus* ou de juvenis capturados pelos demais fungos, por um período de cinco dias, avaliando-se delinearmente e número de repetições a percentagem de ovos infectados ou de nematóides predados.

Após a esporulação dos fungos, estes foram reisolados em cultura pura e na seqüência comparados com a cultura original. Para as análises estatísticas os dados foram transformados em $\text{arc sen } \sqrt{x\%}$.

3.9. Microscopia eletrônica de varredura dos fungos selecionados

Culturas puras dos fungos nematófagos foram repicadas para placa de Petri contendo o meio de ágar-água a 2% e incubadas no escuro como no caso anterior, por cinco dias. Em seguida, adicionou-se 1 mL de uma suspensão contendo 50 juvenis de segundo estágio de *M. paranaensis*.

Essas culturas foram incubadas no escuro a $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e examinadas diariamente. Quando foram observados espécimes capturados, efetuou-se a fixação. Foram aplicados 10 mL de glutaraldeído a 3%, em tampão de fosfato de potássio a 0,1 M e pH 7,4, sobre a superfície da cultura com os nematóides capturados, e as placas foram mantidas a 4°C por 72 horas.

A seguir, a preparação para a microscopia eletrônica de varredura foi concluída segundo a técnica descrita por Maia e Santos (1997). Nematóides capturados e estruturas dos fungos foram documentados em um microscópio eletrônico de Varredura JEOL JSM 5410, operado em 15 kV.

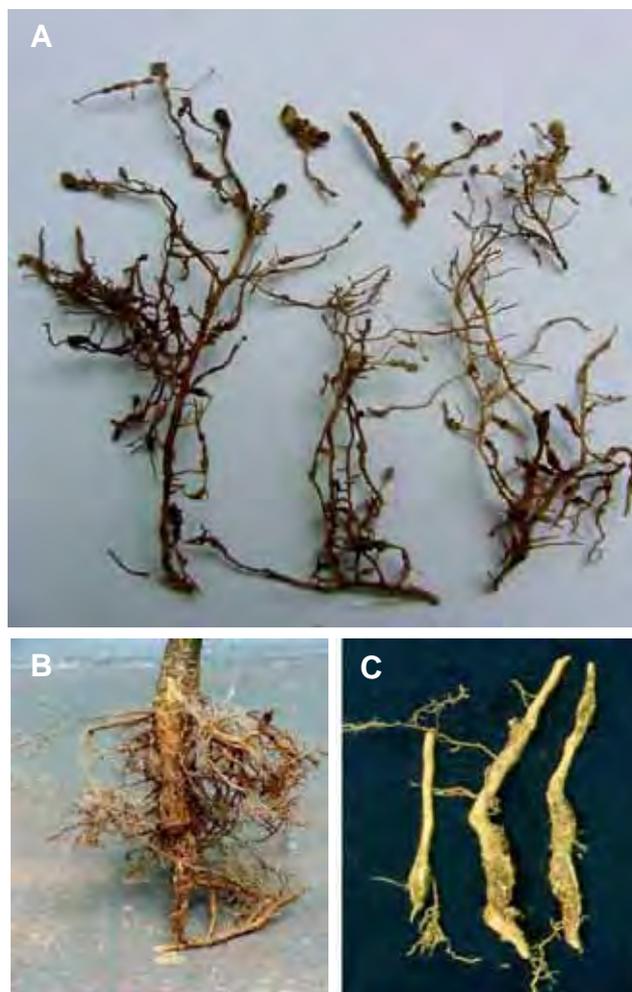


Figura 2. Raízes de cafeeiros infectadas por nematóides de galha. A) Radicelas exibindo galhas arredondadas nas extremidades típicas da infecção por *Meloidogyne exigua*. B e C) Raízes lignificadas exibindo aspecto corticento resultante da infecção por *Meloidogyne paranaensis*.

3.10. Produção dos inóculos dos fungos nematófagos

Para este estudo foram testados vários meios sólidos, a saber: bagaço de laranja, bagaço de cana, farelo de soja, farelo de arroz, palha de café e grãos de sorgo e de milho. Além desses, foi testada, também, a mistura de partes iguais de palha de café com farelo de arroz. Foram adicionados 250 mL dos substratos ou da mistura e

150 mL de água a sacos de polipropileno autoclaváveis de 1 L de capacidade. Em seguida, os sacos foram fechados com um fio de cobre e autoclavados a 121°C e 1 atm por 1 hora, em dois dias consecutivos. Após esse procedimento, 10 a 12 discos de 8 mm de diâmetro, retirados das bordas das colônias de culturas puras dos fungos, individualmente, foram adicionados a cada saco com os diferentes substratos, em câmara asséptica, e incubados no escuro a $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por cerca de 20 dias. Diariamente, esses sacos foram revolidos manualmente para promover a colonização uniforme da massa de substrato.

A comparação entre os substratos testados foi efetuada com base no aspecto visual da colonização dos diferentes materiais pelos fungos. O substrato no qual ocorreu a colonização mais intensa foi utilizado no preparo do inóculo nos testes em casa de vegetação e no campo.

3.11. Avaliação da eficácia da mistura de fungos nematófagos no manejo de *Meloidogyne exigua* e *M. paranaensis* em cafeeiro no campo

O experimento visando à avaliação da eficácia dos fungos no controle de *M. exigua* e *M. paranaensis* foi instalado no período de março a julho de 2005, em um cafezal com 5 anos de idade, variedade Mundo Novo, na Fazenda Delícia, no Município de Cássia dos Coqueiros –SP, cuja análises prévias de amostras de solo (JENKINS, 1964) e raízes (COOLEN e D'HERDE, 1972) revelaram uma população de 1.238 juvenis e machos de *M. exigua* e *M. paranaensis*/100 cm³ das amostras de solo. Nas raízes foram estimados 3.920 juvenis e adultos e 21.800 ovos por 10 g. Porções desse solo naturalmente infestado foram coletadas e utilizadas para condução do experimento em casa de vegetação. O solo do local tem a classe textural, arenosa, cujas análises granulométrica, de micromutrientes e química do solo, foram realizadas no Laboratório de Análise de Solo e Planta do Departamento de Solos e Adubos da Unesp/FCAV, Câmpus de Jaboticabal e estão apresentadas na Tabela 1.

O experimento foi conduzido no delineamento experimental de blocos casualizados em arranjo fatorial 2x2 com os fatores substratos e doses. Considerou-se

como fator substratos os seguintes tratamentos: Testemunha e Mistura, e como fator doses foram consideradas as seguintes quantidades de substrato colonizado por planta: dose 1: 1 litro por planta e dose 2: 2 litros por planta. Cada tratamento foi constituído por 5 plantas em linha, totalizando 20 plantas por bloco, sendo tomadas as três do centro como área útil de cada parcela para as avaliações.

Os seguintes tratamentos foram adotados no campo:

Fator Substratos

Substrato 1: Testemunha - substrato sem fungos (mistura em partes iguais de palha de café + farelo de arroz)

Tabela 1. Análise granulométrica (a) e química (b) do solo da área experimental na Fazenda Delícia, no Município de Cássia dos Coqueiros-SP.

(a) ANÁLISE GRANULOMÉTRICA DE SOLO.

Argila	Limo	Areia		Classe textural
		Fina	Grossa	
----- g kg ⁻¹ -----				
100	20	760	120	Arenosa

(b) ANÁLISE QUÍMICA DE SOLO.

pH	M.O.	P	K	Ca	Mg	H+Al	SB	T	V	B	Cu	Fe	Mn	Zn
(CaCl ₂)	g dm ⁻³	(resina) mg dm ⁻³	----- mmol _c dm ⁻³ -----				----- mg dm ⁻³ -----							
4,6	19	154	2,7	7	6	31	15,7	46,7	34	0,42	6,1	53,0	3,5	2,1

Substrato 2: mistura em partes iguais do substrato individualmente colonizado pelos fungos *Arthrobotrys oligospora* (AO1), *A. oligospora* (AO2), *Arthrobotrys sp.*, *A. musiformis*, *Monacrosporium robustum* e *Paecilomyces lilacinus*.

Fator Doses

Dose 1: 1 litro de substrato colonizado por planta.

Dose 2: 2 litros de substrato colonizado por planta.

Antes da aplicação dos tratamentos, após a demarcação das parcelas (Figura 3 A), foi coletada uma amostra composta de solo e raízes das cinco plantas de cada

parcela, tendo em vista a determinação da população inicial dos fitonematóides em 100 cm³ das amostras de solo e em 10 g de raízes. Os tratamentos foram aplicados distribuindo-se, manualmente, a quantidade da mistura em partes iguais do substrato colonizado, individualmente, pelos cinco fungos, correspondentes às doses mencionadas, em dois sulcos laterais de cerca de 10 cm de profundidade e 30 cm de comprimento (Figura 3 B), sob a projeção da copa das plantas, recobrando em seguida com o solo (Figura 3 C).

As avaliações foram efetuadas aos 60, 90 e 120 dias após a aplicação dos tratamentos, tendo sido coletada uma amostra composta de seis amostras simples de solo e raízes, na projeção da copa de ambos os lados das três plantas centrais de cada parcela. Essas amostras foram acondicionadas em sacos plásticos, etiquetadas e transportadas para o Laboratório de Nematologia do Departamento de Fitossanidade da FCAV, onde foram processadas.

Os fitonematóides foram extraídos das amostras de solo pelo método da flotação centrífuga em solução de sacarose (JENKINS, 1964), e os das raízes, pelo método de Coolen e D'Herde (1972). A seguir, a população de fitonematóides nas amostras foi estimada ao estereoscópio com auxílio da câmara de contagem de Peters (GOODEY, 1963). Para as análises estatísticas os dados foram transformados em $\sqrt{(x+1)}$ ou $\log(x+1)$, conforme a variável, e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey com 5% de probabilidade.



Figura 3. Vista parcial do experimento no campo para estudo da eficácia de fungos nematófagos no manejo de *Meloidogyne exigua* e *M. paranaensis* em cafeeiro na Fazenda Delícia, Município de Cássia dos Coqueiros – SP. A) Vista parcial do experimento. B) Aplicação em sulcos laterais na base das plantas. C) Aplicação sob a projeção da saia dos cafeeiros.

3.12. Avaliação da eficácia da mistura de fungos nematófagos na redução da população de *Meloidogyne exigua* e *M. paranaensis* em cafeeiros cultivados em vasos em casa de vegetação

Este estudo foi conduzido em vasos de 5 L de capacidade contendo material de solo naturalmente infestado, coletado na Fazenda Delícia, Município de Cássia dos Coqueiros-SP. A análise de uma amostra homogeneizada desse solo, pela técnica de Jenkins (1964), revelou a presença de 1.238 juvenis e machos de *M. exigua* e *M. paranaensis*/100cm³ da amostra. Cinquenta vasos foram preenchidos com o material do solo da propriedade, e uma muda de cafeeiro *Coffea arabica* L cv. Mundo Novo com oito pares de folhas verdadeiras foi transplantada em cada um deles (Figura 4).



Figura 4. Vista parcial do experimento em casa de vegetação para estudo da eficácia de fungos nematófagos no manejo de *Meloidogyne exigua* e *M. paranaensis* em cafeeiro.

Após 10 dias do transplante, a altura e o diâmetro do caule, na base de cada muda, foram medidos. Dez desses vasos foram mantidos como controle, e em outros 10 foram aplicados 100 g da mistura em partes iguais do substrato colonizado pelos fungos mencionados no item 3.11, individualmente, e 50 g foram aplicados em um sulco em meia lua de cada lado da muda e recobertos com o próprio material do solo. Em outros 10 vasos foram aplicados 200 g, em duas porções de 100 g, como no caso anterior. Em outros 10 vasos foram aplicados, como descrito, 100 g do substrato não colonizado pelos fungos, e em outros 10 foram aplicados 200 g desse material. O delineamento foi o inteiramente casualizado com 10 repetições, sendo cada repetição constituída por um vaso.

Aos 120 dias após a aplicação dos tratamentos mencionados, foram feitas as avaliações. O diâmetro do caule na base das plantas e a altura das plantas foram novamente avaliados. A parte aérea das plantas foi cortada no nível do solo e as raízes foram coletadas e lavadas. Então, foram avaliadas as massas da matéria fresca da parte aérea e das raízes, assim como o número de galhas, de ovos e juvenis por sistema radicular pela técnica de Coolen e D'Herde (1972), e número de juvenis de segundo estágio por 100 cm³ do material do solo pela técnica de Jenkins (1964).

Os dados foram submetidos aos procedimentos estatísticos, e os valores das variáveis altura das plantas, diâmetro do caule e massa de matéria fresca da parte aérea e das raízes não foram transformados. Os dados relativos ao número de galhas, número de juvenis e número de ovos por sistema radicular foram transformados em log (x+1) utilizando-se do software ESTAT (Sistema para Análises Estatísticas, Pólo Computacional, Departamento de Ciências Exatas, Unesp/FCAV, Câmpus de Jaboticabal – SP), e as médias dos números de fitonematóides, em 100 cm³ das amostras de solo e das raízes, foram comparadas pelo teste de Tukey, com 5% de probabilidade.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Fungos nematófagos empregados no estudo da eficácia do controle biológico de nematóides em cafeeiro

Em seis amostras de solo e raízes coletadas em cafezais da região geoeconômica de Londrina-PR foram detectados, isolados e identificados os fungos *Paecilomyces lilacinus*, *Arthrobotrys* sp. e o isolado AO1 de *A. oligospora* empregado neste estudo (Figura 5 A, B e C). Em duas amostras de solo coletadas na região geoeconômica de Viçosa – MG foi obtido o isolado AO2 de *A. oligospora* (Figura 5 D). Os isolados de *A. musiformis* (Figura 5 E) e o de *M. robustum* (Figura 5 F) foram obtidos da coleção de fungos nematófagos do Departamento de Fitossanidade da Unesp/FCAV. Entre esses, *A. musiformis* e *A. conoides* já haviam sido isolados de solos de cafezais no Sul de Minas Gerais (NAVES e CAMPOS, 1991). O isolado de *M. robustum* foi proveniente de um seringal infestado por *M. exigua* na região geoeconômica de Rondonópolis – MT, enquanto o isolado de *A. musiformis* foi obtido de uma amostra de solo coletada no Município de Ipameri - GO (MAIA, 2000). Esses fungos são comuns nos mais variados tipos de agroecossistemas, e Dalla Pria et al. (1991) confirmaram que eles ocorrem desde o Estado do Rio Grande do Sul ao do Ceará. De fato, já foram encontrados, também, em muitos outros países (KERRY, 1984).

4.2. Crescimento e esporulação dos fungos nematófagos em diferentes meios de cultura

A análise de variância indicou que houve interação significativa entre os meios de cultura e os diferentes isolados dos seis fungos nematófagos estudados, tendo sido desdobrada, tanto para o crescimento (Tabela 2) quanto para a esporulação (Tabela 3).

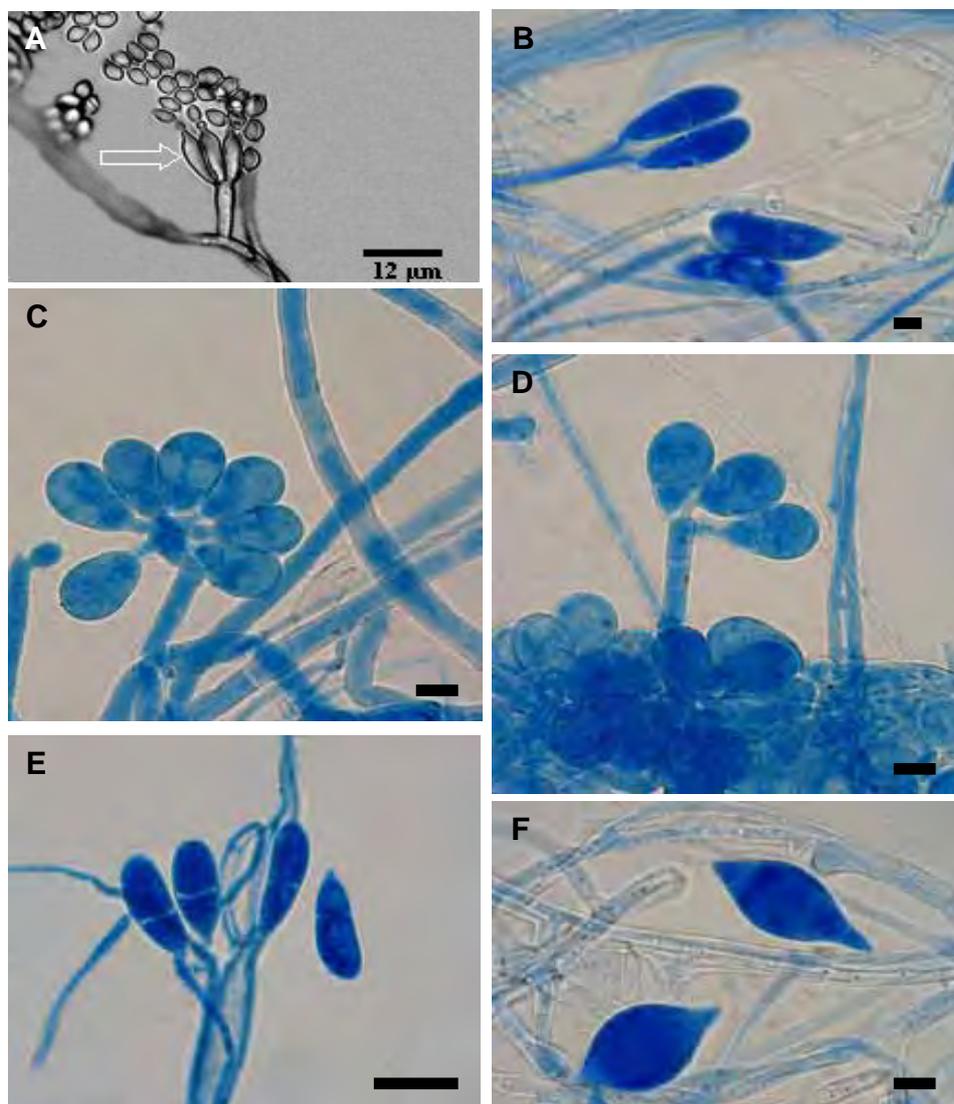


Figura 5. Fotomicrografias de fungos nematófagos utilizados no estudo da eficácia do controle biológico de nematóides de galha do cafeeiro. A) *Paecilomyces lilacinus*, exibindo fiálide típica da espécie (seta). B) *Arthrobotrys* sp. C) *Arthrobotrys oligospora*, isolado AO1. D) *Arthrobotrys oligospora*, isolado AO2. E) *Arthrobotrys musiformis*. F) *Monacrosporium robustum* (barras das escalas para B - F = 10 µm).

Tabela 2. Análise de variância do desdobramento da interação meios x fungos no estudo do crescimento micelial de isolados de fungos nematófagos em três meios, avaliado pelo diâmetro de colônias (mm).

Causas da Variação	G.L.	S.Q.	Q.M	F
Meios dentro de <i>Arthrobotrys oligospora</i> (AO1)	2	254,3972	172,1986	3,7028*
Meios dentro de <i>Arthrobotrys oligospora</i> (AO2)	2	4.756,6575	2.378,3288	69,3088**
Meios dentro de <i>Arthrobotrys</i> sp.	2	7.331,7717	3.665,8859	106,8305**
Meios dentro de <i>Arthrobotrys musiformis</i>	2	5.406,5769	2.703,2885	78,7786**
Meios dentro de <i>Monacrosporium robustum</i>	2	907,2727	453,6364	13,2198**
Meios dentro de <i>Paecilomyces lilacinus</i>	2	0,0000	0,0000	0,000 ^{ns}
Resíduo	141	4.838,4126	34,3150	-

^{ns} - teste não significativo com 5% de probabilidade. * - teste significativo com 5% de probabilidade. ** - teste significativo com 1% de probabilidade.

Tabela 3. Análise de variância do desdobramento da interação meios x fungos no estudo da esporulação de fungos nematófagos em três meios de cultura.

Causas da Variação	G.L.	S.Q.	Q.M	F ¹
Meios dentro de <i>Arthrobotrys oligospora</i> (AO1)	2	2,7506	1,3753	3,3390*
Meios dentro de <i>Arthrobotrys oligospora</i> (AO2)	2	37,0920	18,5460	45,0269**
Meios dentro de <i>Arthrobotrys</i> sp.	2	5,8750	2,9375	7,1318**
Meios dentro de <i>Arthrobotrys musiformis</i>	2	0,6125	0,3062	0,7435 ^{ns}
Meios dentro de <i>Monacrosporium robustum</i>	2	2,9112	1,4556	3,5340*
Meios dentro de <i>Paecilomyces lilacinus</i>	2	7,3337	3,6668	8,9025**
Resíduo	72	29,6558	0,4119	-

¹ Dados transformados em log (x+1), ^{ns} - teste não significativo com 5% de probabilidade. * - teste significativo com 5% de probabilidade. ** - teste significativo com 1% de probabilidade

A comparação entre as médias pelo teste de Tukey com 5% de probabilidade para o diâmetro de colônias evidenciou que somente o isolado de *Paecilomyces lilacinus* (Tabela 4) não demonstrou exigências especiais para crescimento. De fato,

não houve diferença significativa para essa variável nos três meios empregados no estudo. Essa baixa especificidade de substrato para crescimento de *P. lilacinus* já havia sido relatada por outros pesquisadores (D'ANGIERI FILHO e CAMPOS, 1997; FREITAS et al., 1999).

Tabela 4. Diâmetro de colônias (mm) de seis isolados de fungos nematófagos cultivados em três meios de cultura.

Fungos	Meios de Cultura		
	FEA	BDA	MFA
<i>Arthrobotrys oligospora</i> (AO1)	9,30 Ac	2,60 Be	9,30 Ad
<i>Arthrobotrys oligospora</i> (AO2)	76,25 Bb	49,00 Cb	82,30 Aa
<i>Arthrobotrys</i> sp.	78,00 Bb	45,25 Cc	83,80 Aa
<i>A. musiformis</i>	75,95 Ab	41,75 Cd	67,14 Bb
<i>Monacrosporium robustum</i>	3,64 Bd	2,79 Be	15,86 Ac
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	84,00 Aa	84,00 Aa	84,00 Aa

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha ou mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey com 5% de probabilidade. (FEA= Farelo de arroz, extrato de levedura e ágar; BDA= batata-dextrose-ágar; MFA= fubá e ágar).

A análise de variância do desdobramento da interação entre os meios de cultura para os isolados AO1 e AO2 de *Arthrobotrys oligospora* apresentou diferença significativa com 5% e com 1% de probabilidade, respectivamente (Tabela 2). A média do diâmetro de colônias do isolado AO1 não diferiu nos meios FEA e MFA, mas ambos diferiram de BDA (Tabela 4). Em relação ao isolado AO2 do mesmo fungo, foi observada diferença significativa a 5% para essa variável nos três meios estudados, confirmando relatos prévios sobre a variação do comportamento de isolados de uma mesma espécie em diferentes meios de cultura (CASCORELLI e PRAMER, 1962; DIAS e FERRAZ, 1993; OLIVEIRA et al., 2002). Entretanto, Cooke (1963) mencionou que *A. oligospora* tem uma alta habilidade saprofítica, tendo sido capaz de utilizar todos os carboidratos testados, incluindo vários polissacarídeos, tais como: celulose, amido e glicogênio. O crescimento dos isolados AO2 de *A. oligospora* e o de *Arthrobotrys* sp. foi significativamente diferente nos três meios utilizados, e o meio MFA proporcionou a maior taxa de crescimento de ambos os isolados. O crescimento de ambos os isolados em BDA foi inferior ao de ambos no meio FEA.

Dias (1992), trabalhando com vários meios, inclusive BDA, BDA + peptona, “corn meal agar” e meio de fubá, observou que o substrato de milho triturado foi o que apresentou melhores resultados em diâmetro de colônia e esporulação de espécies de *Arthrobotrys* em relação aos demais meios estudados. Resultados semelhantes foram observados neste estudo, no qual o meio MFA proporcionou os melhores resultados para a maioria dos fungos. O crescimento de *A. musiformis* diferiu nos três meios utilizados, e a maior taxa de crescimento foi no meio FEA.

O isolado de *M. robustum* exibiu maior crescimento no meio MFA, porém os outros dois meios estudados não diferiram. Esses dados indicam que, no cômputo geral, o meio MFA propiciou a melhor taxa de crescimento dos isolados estudados, à exceção do meio FEA, para o isolado de *A. musiformis* (Tabela 4).

A análise de variância do desdobramento da interação entre os meios de cultura e os isolados dos fungos, para a esporulação, não foi significativa apenas para o isolado de *A. musiformis* (Tabela 3). A comparação entre as médias não revelou diferença significativa para a esporulação desse isolado nos três meios em questão (Tabela 5). O isolado AO1 de *A. oligospora* não esporulou em BDA. Embora relativamente baixa, a melhor esporulação desse isolado foi obtida no meio MFA, mas não diferiu da obtida no meio FEA. Estudos têm demonstrado que as exigências nutricionais para crescimento e esporulação dos fungos nematófagos são distintas (STIRLING et al., 1998; GARDNER et al., 2000; NAIK et al., 2003; HIRSCH et al., 2001).

Assim, como em relação ao crescimento (Tabela 4), a esporulação do isolado AO2 de *A. oligospora* foi diferente nos três meios de cultura estudados, e a máxima esporulação foi obtida no meio FEA (Tabela 5), seguido de BDA e, por último, do meio MFA. A esporulação de *Arthrobotrys* sp. também foi máxima em FEA, diferindo dos meios BDA e MFA, que não diferiram entre si (Tabela 5).

Tabela 5. Estimativa dos números de conídios produzidos por seis isolados de fungos nematófagos cultivados em três meios de cultura.

Fungos	Esporulação (x 10 ⁵) ¹		
	FEA	BDA	MFA
<i>Arthrobotrys oligospora</i> (AO1)	0,21 Abc	0,00 Bd	1,69 Acd
<i>Arthrobotrys oligospora</i> (AO2)	64,43 Aab	23,42 Bb	0,59 Cd
<i>Arthrobotrys</i> sp.	32,13 Ab	6,42 Bc	10,76 Bab
<i>Arthrobotrys musiformis</i>	1,79 Ac	1,28 Acd	2,73 Abcd
<i>Monacrosporium robustum</i>	2,05 Ac	1,98 Acd	6,67 Abc
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	172,24 Aa	84,51 Aa	30,35 Ba

¹Para análise estatística os dados foram transformados em log (x+1), Médias não transformadas seguidas pela mesma letra maiúscula na linha ou mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey com 5% de probabilidade. (FEA= Farelo de arroz, extrato de levedura e ágar; BDA= batata-dextrose-ágar; MFA= fubá e ágar).

No caso do isolado de *A. musiformis*, a esporulação foi similar nos três meios (Tabela 5), já que a análise de variância do desdobramento da interação entre meios de cultura e esse isolado não havia demonstrado diferença significativa (Tabela 3).

A esporulação do isolado de *M. robustum* também não diferiu nos três meios considerados (Tabela 5). Tanto o crescimento quanto a esporulação do isolado desse fungo nos três meios utilizados não atenderiam a demanda mínima para a produção de inóculo visando à elaboração de formulações. De outra sorte, um número excessivamente grande de placas com culturas puras deveria ser preparado. Por conseguinte, outros meios que proporcionem crescimento mais rápido desse fungo devem ser pesquisados.

A esporulação do isolado de *P. lilacinus* foi maior no meio FEA, mas não diferiu da obtida em BDA. Contudo, em ambos os casos diferiram da obtida em MFA. Com efeito, confirmando a menor especificidade por substrato, tanto para o crescimento quanto para a esporulação, o isolado desse fungo exibiu valores mais altos para as variáveis diâmetro de colônia e número de conídios produzidos que os demais, independentemente do meio considerado. Essa maior habilidade de *P. lilacinus* de colonizar e esporular em diferentes meios já havia sido observada por outros pesquisadores (GOMES et al., 1997; FREITAS et al., 1999; LIU e CHEN, 2003). Os meios MFA e FEA foram melhores que o BDA, tanto para o crescimento quanto para a esporulação da maioria dos isolados em estudo.

4.3. Teste de patogenicidade dos fungos nematófagos para *Meloidogyne paranaensis*

O teste de patogenicidade evidenciou que todos os fungos testados foram patogênicos para *M. paranaensis*, mas não diferiram entre si, nos períodos de tempo considerados (Tabela 6). Contudo, a análise de variância dos dados relativos à percentagem de predação de juvenis de segundo estágio do nematóide pelos fungos, dentro dos períodos de tempo considerados, evidenciou diferença significativa para a percentagem de predação, com base no Teste F com 1 ou 5% de probabilidade (Tabela 7).

Tabela 6. Análises de variância relativas à percentagem de predação de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne paranaensis* pelos isolados AO1 e AO2 do fungo *Arthrobotrys oligospora* e por um isolado de cada um dos fungos *Arthrobotrys* sp., *A. musiformis* e *Monacrosporium robustum*.

Causa da Variação	G.L.	Quadrados Médios ¹				
		PNP D1	PNP D2	PNP D3	PNP D1+2	PNP D1+2+3
Tratamentos	4	5,9975 ^{ns}	1,8021 ^{ns}	24,7400 ^{ns}	0,2976 ^{ns}	13,4677 ^{ns}
Resíduo	15	10,3858	20,2332	15,0869	11,2441	11,1087
C.V.(%)		26,31	27,37	18,90	16,58	13,68

ns : não significativo (P > 0,05);

¹ Em cada coluna, médias não transformadas seguidas de mesma letra não diferem pelo teste de Tukey (P > 0,05). Para a análise estatística os dados foram transformados em $\arcsen \sqrt{x\%}$. PND1: nematóides predados no primeiro dia; PND2: nematóides predados no segundo dia; PND3: nematóides predados no terceiro dia; PND1+2: nematóides predados no primeiro e segundo dia; PND1+2+3: nematóides predados no primeiro, segundo e terceiro dia.

A comparação entre as médias pelo teste de Tukey, com 5 % de probabilidade, revelou que a percentagem de predação de juvenis de segundo estágio de *M. paranaensis* no terceiro dia da avaliação pelo isolado AO1 de *A. oligospora* foi diferente da observada no primeiro dia, mas não diferiu da observada no segundo (Tabela 8). Também não diferiu da predação acumulada no primeiro e segundo dias, assim como na percentagem acumulada nos três dias de avaliação (Tabela 8).

Tabela 7. Análises de variância relativas à percentagem de predação de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne paranaensis* pelos isolados AO1 e AO2 do fungo *Arthrobotrys oligospora* e por um isolado de cada um dos fungos *Arthrobotrys* sp., *A. musiformis* e *Monacrosporium robustum* dentro dos períodos de tempo considerados.

Causa da Variação	G.L.	Quadrados Médios ¹				
		<i>Arthrobotrys oligospora</i> (AO1)	<i>A. oligospora</i> (AO2)	<i>Arthrobotrys</i> sp.	<i>A. musiformis</i>	<i>Monacrosporium robustum</i>
Tratamentos	4	4,0097	2,9273	2,8126	2,2007	3,7875
Resíduo	15	0,4100	0,1791	0,3496	0,5078	0,4535
Teste F		9,78**	16,35**	8,04**	4,33*	8,35**
C. V. (%)		19,18	12,54	19,16	22,90	19,60

* : significativo (P > 0,05);

** : significativo (P < 0,01);

¹Dados transformados em $\arcsen \sqrt{x\%}$.

A percentagem de predação de juvenis de segundo estágio do nematóide pelo isolado AO2 do mesmo fungo, no terceiro dia, diferiu das observadas no primeiro e segundo, mas não diferiu da acumulada no primeiro e no segundo dias, assim como da percentagem acumulada nos três dias de avaliação. Como no caso do isolado AO1, as percentagens de predação pelo isolado AO2 do mesmo fungo no primeiro e no segundo dias de avaliação não diferiram entre si (Tabela 8).

A percentagem de predação de juvenis do nematóide em estudo pelo isolado de *Arthrobotrys* sp. empregado, no terceiro dia, não diferiu das observadas no primeiro e no segundo dias, nem da predação acumulada nos dois primeiros nem nos três dias de avaliação (Tabela 8). O isolado de *A. musiformis* e o de *M. robustum* utilizados também exibiram o mesmo comportamento para a predação de juvenis do nematóide nos períodos de tempo considerados (Tabela 8).

Tabela 8. Comparação entre as médias da percentagem de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne paranaensis* predados pelos fungos nematófagos em estudo, dentro dos períodos considerados.

	<i>Arthrobotrys oligospora</i> (AO1)	<i>A. oligospora</i> (AO2)	<i>Arthrobotrys</i> sp.	<i>A. musiformis</i>	<i>Monacrosporium robustum</i>
PNPD 1	3,25 C ¹	4,50 D	2,50 B	4,00 B	4,50 C
PNPD 2	7,75 BC	7,00 CD	8,25 AB	7,00 AB	7,00 BC
PNPD 3	13,25 AB	12,75 AB	8,50 AB	9,25 AB	14,75 AB
PNPD 1+2	11,00 AB	11,50 BC	10,75 A	11,00 AB	11,50 ABC
PNPD 1+2+3	21,00 A	19,75 A	16,75 A	16,25 A	21,75 A
Teste F	9,78**	16,35**	8,04**	4,33*	8,35**
DMS	1,40	0,93	1,29	1,56	1,47
C.V.(%)	19,18	12,54	19,16	22,90	19,60

¹ Em cada coluna, médias não transformadas seguidas de mesma letra não diferem pelo teste de Tukey (P > 0,05). Para a análise estatística os dados foram transformados em $\arcsen \sqrt{x\%}$. PND1: nematóides predados no primeiro dia; PND2: nematóides predados no segundo dia; PND3: nematóides predados no terceiro dia; PND1+2: nematóides predados no primeiro e segundo dia; PND1+2+3: nematóides predados no primeiro, segundo e terceiro dia.

Castro et al. (2000) também estudaram, *in vitro*, a capacidade de predação de *Arthrobotrys musiformis* sobre *Meloidogyne incognita*, *M. arenaria*, *M. javanica*, *Pratylenchus brachyurus* e *Radopholus similis*. Os resultados discriminaram três grupos distintos de fitonematóides predados por *A. musiformis*, ao sexto dia de avaliação (dia de máxima predação). O primeiro, constituído por *M. javanica*, destacou-se com um valor de 91,7% dos juvenis predados. O segundo, com *M. arenaria* e *M. incognita*, teve 60 e 53% dos juvenis predados, respectivamente. No terceiro grupo, constituído pelos nematóides endoparasitos migradores, a predação foi inferior a 30%. Essas diferenças nos percentuais de predação dos diferentes fitonematóides podem ser atribuídas tanto à estrutura da cutícula quanto às diferenças na composição de carboidratos presentes na superfície dos nematóides. Com efeito, Dackman e Nordbring-Herts (1992) demonstraram que a especificidade de fungos nematófagos para certas espécies de nematóides está relacionada a lecitinas presentes na cutícula dos nematóides e nas hifas dos fungos. Nematóides de hábito migrador, como *R. similis* e *P. brachyurus*, constituem importantes patógenos de plantas, mas o efeito de antagonistas sobre esses nematóides tem sido pouco estudado. Esses fatores ligados ao reconhecimento

fungo-nematóide (DACKMAN e NORDBRING-HERTS, 1992) que causam as diferenças dos fungos quanto a patogenicidade e virulência, apenas para determinadas espécies de nematóides, possivelmente, explicam os baixos índices de captura encontrados para essas espécies.

Em relação à capacidade predatória de *M. robustum*, Maia et al. (2001) avaliaram, *in vitro*, a habilidade predatória desse fungo sobre *Heterodera glycines*. Após 24 horas do início da incubação, procederam às avaliações e verificaram que 100% das formas ativas dos juvenis de *H. glycines* haviam sido capturadas pelo fungo e os ovos estavam colonizados externamente, além de terem notado abundante esporulação do fungo. De igual modo, Bernardo e Santos, (2004) também avaliaram *in vitro* a capacidade predatória de *Monacrosporium robustum* para *Rotylenchulus reniformis* em períodos de 24, 48 e 72 horas após a adição do nematóide às culturas do fungo. Constataram que a percentagem de predação do nematóide pelo fungo foi de, respectivamente, 81,3; 99,9 e 100% no final das avaliações.

Ribeiro et al. (1999) avaliaram a capacidade predatória *in vitro* de 59 isolados de *Monacrosporium* spp. frente a *Meloidogyne javanica* e *H. glycines*. Observaram que a predação de juvenis de *M. javanica* variou de 71 a 100%, para 27 isolados, enquanto para *H. glycines*, 26 isolados não exerceram qualquer predação. Os outros 33 isolados exibiram máxima predação de apenas 1,2% de juvenis desse nematóide, e todos os isolados predaram *Panagrellus* sp.

A análise de variância dos dados relativos à percentagem de predação de ovos do nematóide pelo isolado de *Paecilomyces lilacinus* utilizado no estudo evidenciou que houve diferença significativa entre os períodos avaliados pelo teste F com 1% de probabilidade (Tabela 9).

Com efeito, a comparação das médias pelo teste de Tukey com 5% de probabilidade demonstrou que a percentagem de ovos colonizados pelo fungo no terceiro dia da avaliação foi maior que a observada no primeiro dia, mas não diferiu da observada no segundo.

Tabela 9. Análise de variância e comparação entre as médias de percentagem, não transformadas, pelo teste de Tukey da colonização de ovos de *Meloidogyne paranaensis in vitro* por *Paecilomyces lilacinus*.

Causa da Variação	G.L.	Quadrados Médios ¹ Ovos
Tratamentos	4	3,1437
Resíduo	15	0,2240
Teste F		14,04**
Médias de ovos colonizados nos períodos		
POCD 1		5,25 C ²
POCD 2		10,00 BC
POCD 3		12,75 B
POCD 1+2		15,25 AB
POCD 1+2+3		22,75 A
DMS		1,03
C.V.(%)		12,93

** : significativo (P < 0,01); ¹Para análise estatística os dados foram transformados em $\arcsen \sqrt{x\%}$

²Em cada coluna, médias não transformadas seguidas de mesma letra não diferem pelo teste de Tukey (P > 0,05)

POCD 1 = percentagem de ovos colonizados no primeiro dia; POCD 2 = percentagem de ovos colonizados no segundo dia; POCD 3 = percentagem de ovos colonizados no terceiro dia; POCD 1+2 = percentagem de ovos colonizados no primeiro e segundo dias; POCD 1+2+3 = percentagem de ovos colonizados no primeiro, segundo e terceiro dias.

Também não diferiu da acumulada no dois primeiros dias da avaliação, mas foi menor que a colonização dos ovos acumulada nos três dias da avaliação (Tabela 9). Alguns pesquisadores já mencionaram que isolados de uma mesma espécie de fungo parasita de ovos de nematóides, procedentes de diferentes regiões geográficas, variam quanto ao crescimento e quanto à capacidade parasítica *in vitro* (STIRLING e MANKAU, 1978; CARNEIRO e GOMES, 1993; FREITAS et al., 1995). Na Figura 6, foram ilustrados ovos de *M. paranaensis* colonizados pelo isolado de *P. lilacinus* utilizado no estudo. Conquanto o fungo seja considerado um parasito de ovo (Figura 6 A), observou-se que o juvenil, ainda dentro do ovo, provavelmente o de primeiro estágio, também pode ser parasitado pelo fungo (Figura 6 B).

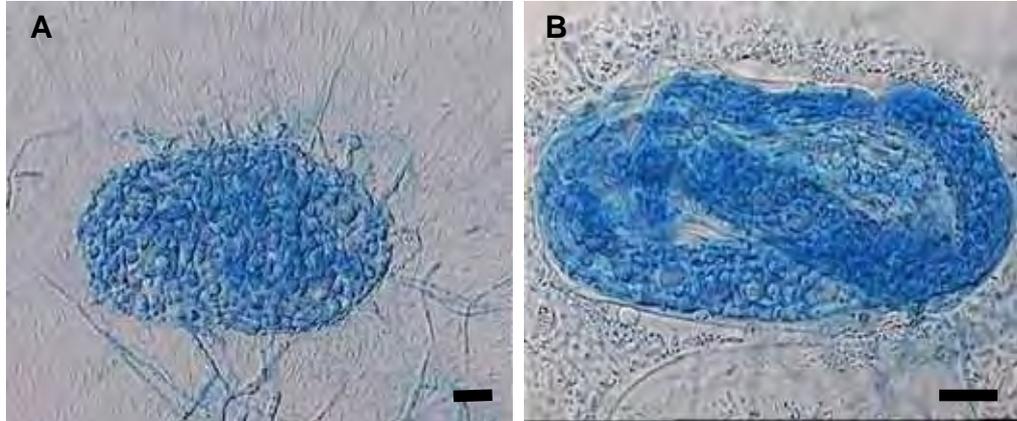


Figura 6. Fotomicrografia de ovos de *Meloidogyne paranaensis* colonizados por *Paecilomyces lilacinus*. A) Ovo colonizado em estágio inicial da embriogênese. B) Juvenil em estágio inicial de desenvolvimento parasitado pelo fungo dentro do ovo (barras das escalas = 10 μm).

4.4. Microscopia eletrônica de varredura de alguns dos fungos nematófagos incluídos no estudo

As Figuras 7 e 8 ilustram detalhes morfológicos, ao microscópio eletrônico de varredura, de *A. musiformis* e da espécie não identificada de *Arthrobotrys* incluída no estudo. O conídio de *A. musiformis* tem a forma semelhante à de uma banana e exibe duas células (um septo), e a da base é menor que a outra (Figuras 7A, 7B e Figura 5 E). Os conídios da espécie não identificada de *Arthrobotrys*, incluída no estudo, também são bicelulares, mas o septo que os divide situa-se no centro, fazendo com que as células tenham aproximadamente o mesmo tamanho, conforme ilustrado na Figura 5 B, obtida ao microscópio óptico composto. A estrutura de captura de ambos os fungos é constituída por uma rede adesiva tridimensional. Em *A. musiformis* as hifas que compõem essa rede, usualmente, são mais espessas que na espécie não identificada de *Arthrobotrys* (Figura 7 C e D e Figura 8 A e B).

Em *A. oligospora* os conídios também são bicelulares. A célula distal é cerca de duas vezes o tamanho da célula proximal, e, claramente, é observada uma ligeira constrição do conídio na região do septo (Figura 9 A e B), conforme observou Haard, 1968, citado por Jacobs (2002). A estrutura de captura, comparada à das outras espécies, não exhibe diferenças marcantes (Figura 9 C).

Em *M. robustum* os conídios são fusóides, como ilustrado na Figura 10 A, e exibem número variável de septos, geralmente de 2 a 4 (McCULLOCH, 1977), sendo a célula mediana a maior e de maior diâmetro. Na Figura 5 F, obtida ao microscópio óptico composto, também se observam esses detalhes. Prolongamentos verticais adesivos sobre as hifas de até 10 μm de comprimento por 5 μm de diâmetro (setas) constituem as armadilhas de captura do fungo, conforme ilustrado na Figura 10 B. Ao entrarem em contato com essas estruturas, os nematóides são aprisionados. Como essas estruturas são formadas sobre as hifas, próximas umas das outras, em geral o nematóide é capturado por mais de uma delas (Figura 10 B).

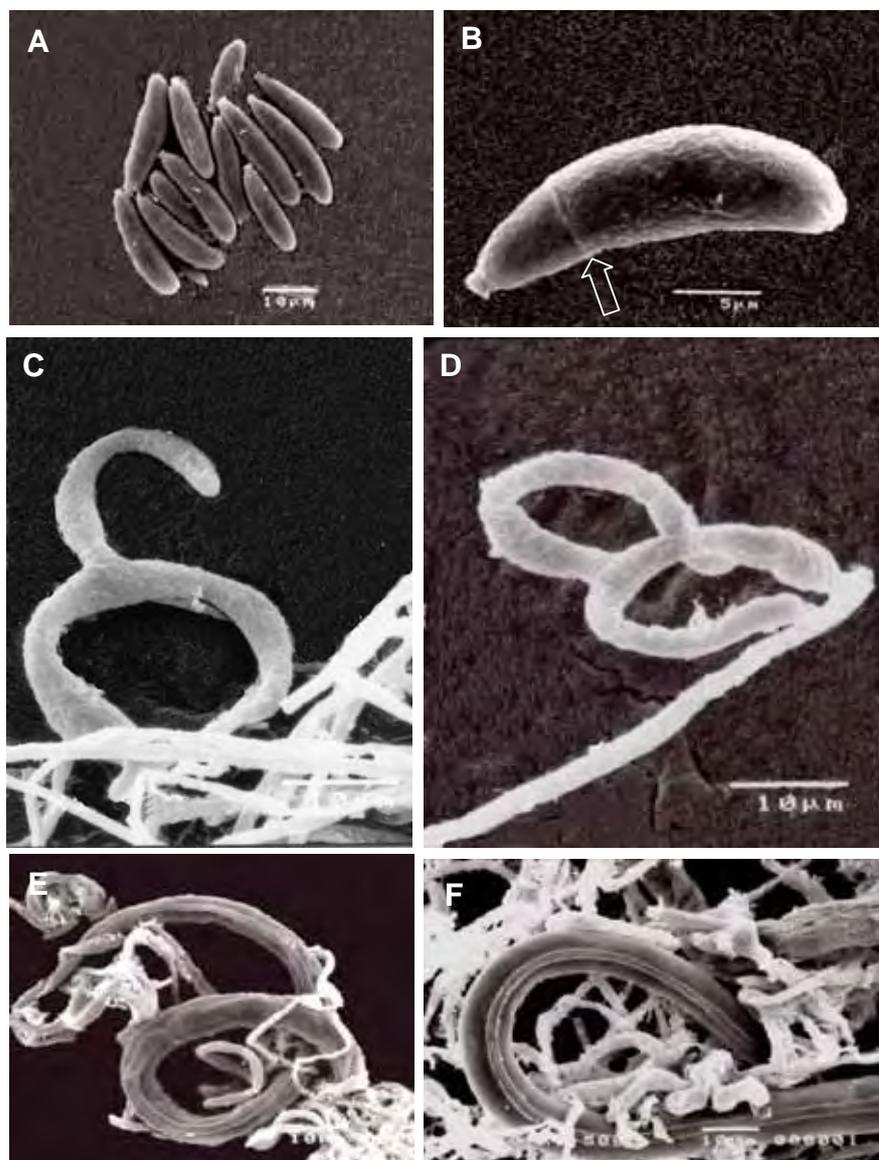


Figura 7. Eletromicrografias de varredura de *Arthrobotrys musiformis*. A e B) Conjunto de conídios e conídio individual, respectivamente, exibindo um septo (seta) e a forma característica da espécie. C e D) Estrutura de captura na forma de rede tridimensional em início de formação e exibindo duas alças já formadas. E e F) Juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne paranaensis* capturados pelo fungo.

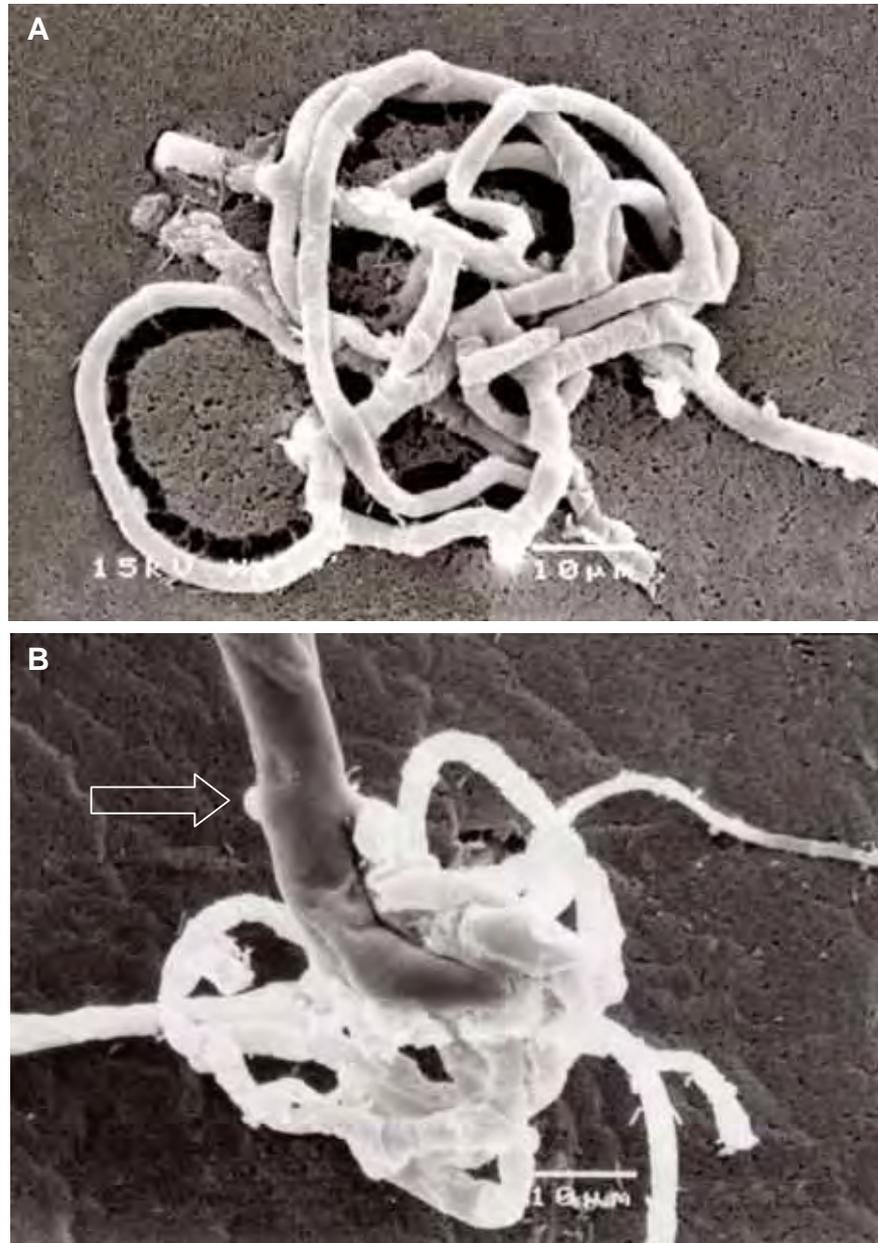


Figura 8. Eletromicrografias de varredura de *Arthrobotrys* sp. A) Estrutura de captura na forma de rede adesiva tridimensional. B) Região anterior de um juvenil de segundo estágio de *Meloidogyne paranaensis* capturado pelo fungo (seta).

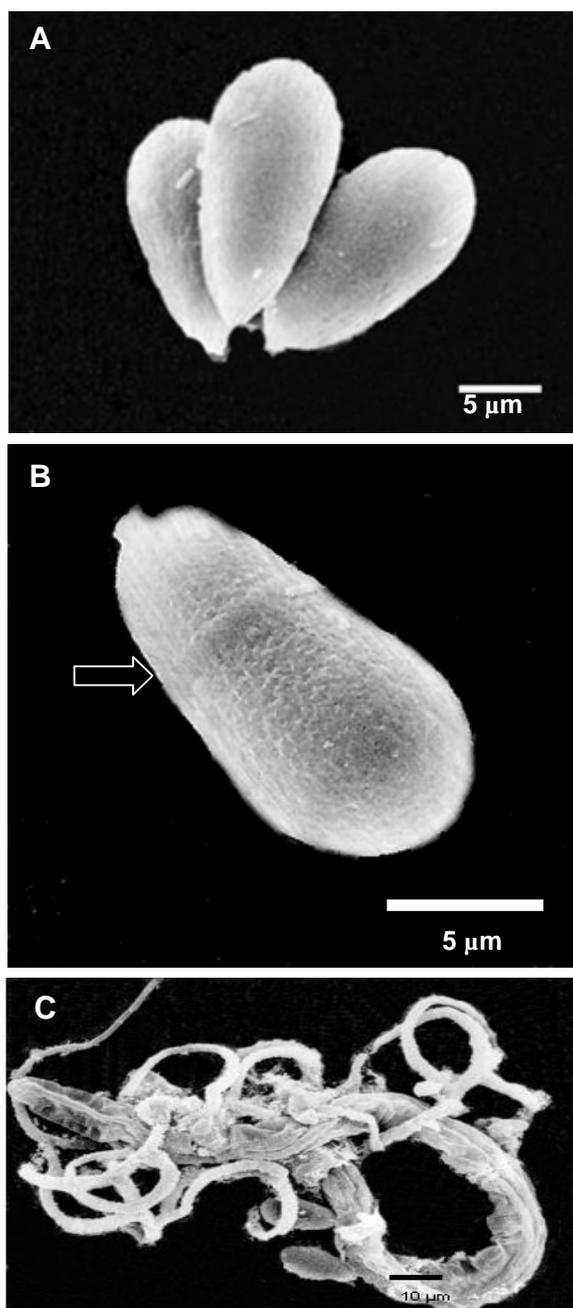


Figura 9. Eletromicrografias de varredura de *Arthrobotrys oligospora*. A) Conídios do fungo. B) Forma e septação (seta) característica do conídio. C) Nematóide capturado pelo fungo.

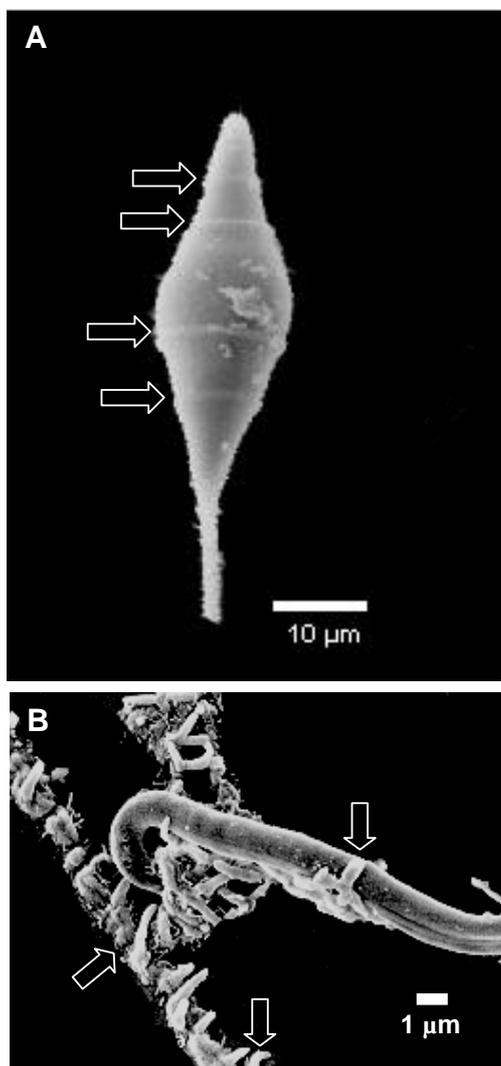


Figura 10. Eletromicrografias de varredura de *Monacrosporium robustum*. A) Conídio do fungo exibindo quatro septos (setas). B) Nematóide capturado pelo fungo e estrutura de captura na forma de ramos adesivos (setas).

A Figura 11 ilustra cadeias basipetais de *P. lilacinus* documentadas ao microscópio eletrônico de varredura. As fiálides típicas desse fungo foram documentadas ao microscópio óptico composto, conforme ilustrado na Figura 5 A. As colônias desse fungo são de rápido crescimento, de coloração próxima do lilás, nunca de coloração verde ou verde-azulada como em *Penicillium* (DOMSCH et al., 1980).

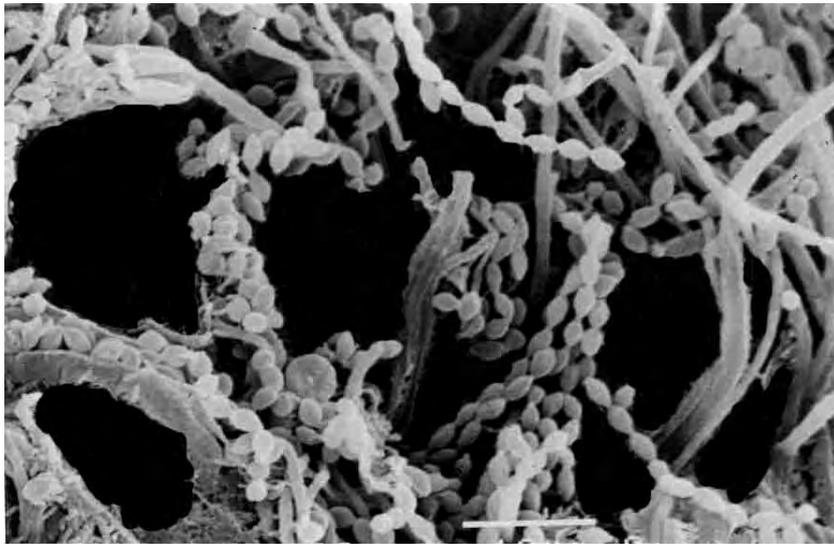


Figura 11. Eletromicrografia de varredura de cadeias basipetais de conídios unicelulares, ovóides a fusiformes de *Paecilomyces lilacinus* (barra da escala = 10 μ m).

4.5. Produção do inóculo dos fungos nematófagos incluídos no estudo

A Figura 12 ilustra o crescimento dos fungos incluídos no estudo em substrato constituído por partes iguais de palha de café e farelo de arroz autoclavado em sacos de polipropileno. Partes iguais desse material colonizado, individualmente, pelos diferentes fungos foram misturadas, e 1 L e 2 L da mistura/planta de cafeeiro foram aplicados nos testes de campo.

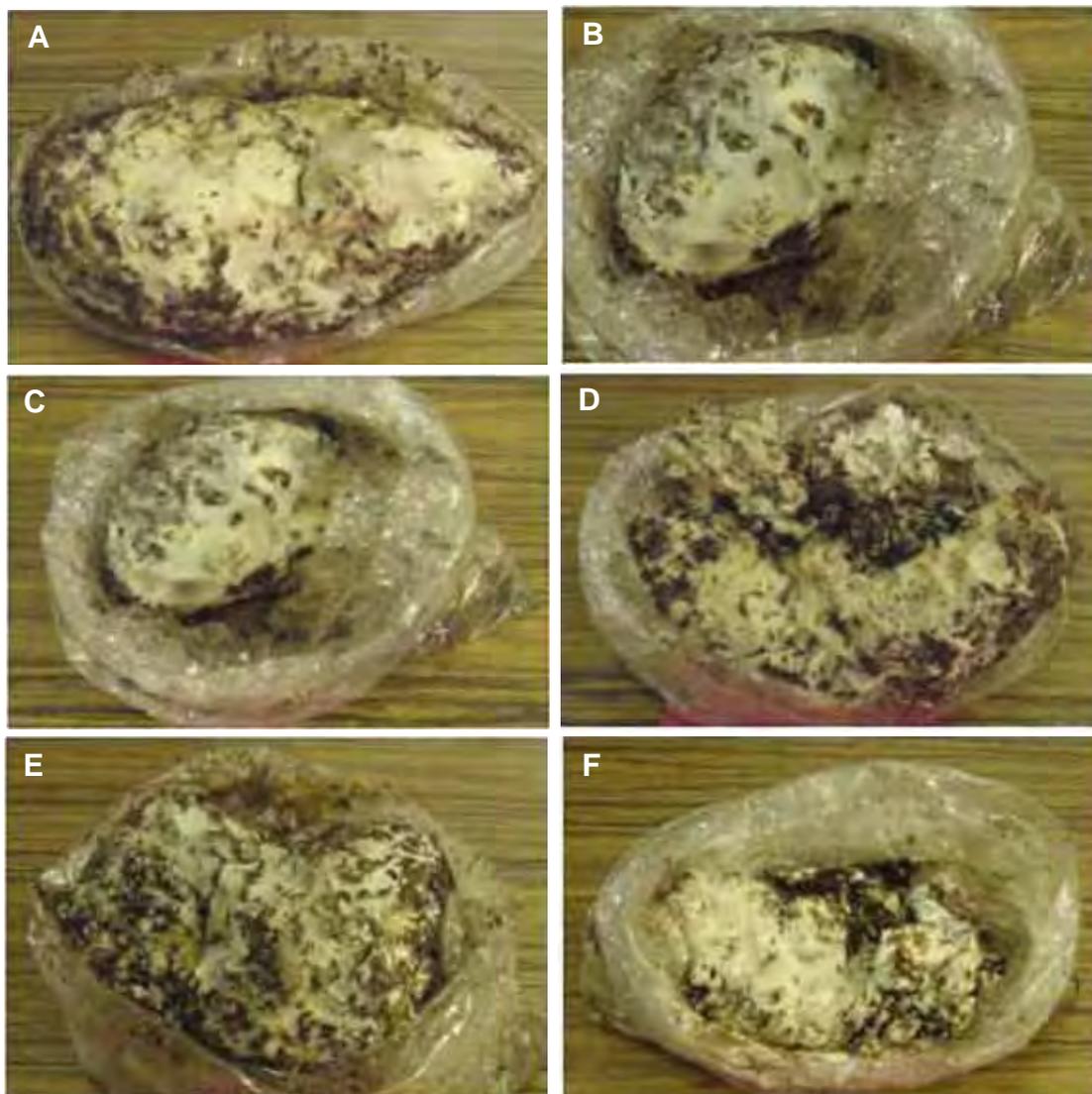


Figura 12. Porções do substrato constituído por partes iguais de palha de café e farelo de arroz em sacos de polipropileno autoclaváveis colonizadas pelos diferentes fungos nematófagos incluídos no estudo. A) *Arthrobotrys oligospora* (isolado AO1). B) *A. oligospora* (isolado AO2). C) *Arthrobotrys* sp. D) *A. musiformis*. E) *Monacrosporium robustum*. F) *Paecilomyces lilacinus*.

4.6. Avaliação da eficácia da mistura de fungos nematófagos no manejo de *Meloidogyne exigua* e *M. paranaensis* em cafeeiro no campo

O cafezal da Fazenda Delícia, no Município de Cássia dos Coqueiros – SP, onde foi conduzido o teste de campo, estava infestado pelos nematóides *M. exigua* e *M. paranaensis*, cujos caracteres marcantes para identificação de ambas as espécies estão ilustrados na Figura 13.

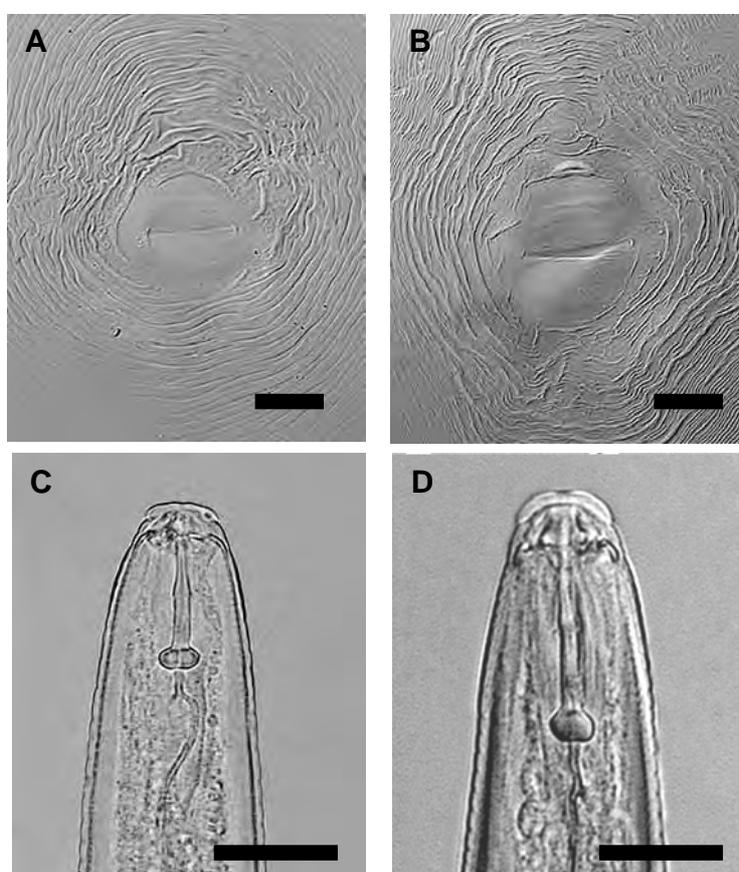


Figura 13. Fotomicrografias de caracteres morfológicos marcantes para identificação das espécies de *Meloidogyne* Goeldi envolvidas no estudo da eficácia do controle biológico de nematóides de galha do cafeeiro. A) Padrão perineal de *M. exigua*. B) Padrão perineal de *M. paranaensis*. C) Região anterior de macho de *M. exigua*. D) região anterior de macho de *M. paranaensis* (barras das escalas = 20 μm).

No decorrer do experimento (março a julho/2005), a precipitação média foi de 73,74 mm. Quanto à temperatura, a média das mínimas foi de 15,08°C, e a média das máximas foi de 27,84°C.

Nas análises das amostras de solo e raízes para as extrações e estimativas da quantidade de ovos e juvenis de *Meloidogyne* spp., aos 60, 90 e 120 dias, após a aplicação dos tratamentos, outros fitonematóides encontrados também foram considerados. A Tabela 10 contém os resultados das análises de variância e comparação entre as médias dos dados obtidos aos 60 dias após a aplicação dos fungos.

Tabela 10. Análises de variância e comparação entre as médias da população de nematóides e de ovos, aos 60 dias após a aplicação dos fungos nematófagos, em duas doses, em cafezal infestado por *Meloidogyne exigua* e *M. paranaensis*

Causas da variação	G.L.	Quadrados Médios				Ovos (número) ²
		<i>Meloidogyne</i> spp.		<i>Aphelenchus</i> sp.		
		(solo) ¹	(raízes) ²	(solo) ²	(raízes) ¹	
Fontes (F)	1	0,3530 ^{ns}	0,0004 ^{ns}	0,0053 ^{ns}	0,3642 ^{ns}	0,5766 ^{ns}
Doses (D)	1	1,0094 ^{ns}	4,2485 ^{ns}	0,0078 ^{ns}	0,0070 ^{ns}	0,0975 ^{ns}
Interação (FxD)	1	0,5615 ^{ns}	0,0002 ^{ns}	0,3356 ^{ns}	2,3105 ^{ns}	0,0849 ^{ns}
Blocos	3	2,3053 ^{ns}	6,1178 ^{ns}	6,6301*	0,7080 ^{ns}	4,6764 ^{ns}
Resíduo	9	0,6878	2,1266	1,5751	1,5694	3,4840
C.V.(%)		36,87	36,88	48,85	65,20	43,18
Médias das Fontes						
Testemunha		5,750 A ³	178,500 A	18,750 A	4,500 A	425,875 A
Plantas Tratadas		4,250 A	100,875 A	36,750 A	3,250 A	118,625 A
Médias das Doses						
1 litro		5,875 A	62,500 A	32,125 A	3,625 A	134,125 A
2 litros		4,125 A	216,875 A	23,000 A	4,125 A	410,375 A

Fontes: plantas tratadas com os fungos .

^{ns}: não significativo (P > 0,05); * significativo (P < 0,05); ¹Para a análise estatística os dados foram transformados em $\sqrt{x+1}$; ²Dados transformados em $\log(x+1)$ ³ Em cada coluna, médias não transformadas seguidas de mesma letra não diferem pelo teste de Tukey (P > 0,05).

A análise de variância evidenciou diferença estatística significativa para blocos com 5% de probabilidade, no tocante a *Aphelenchus* sp. Este fato, provavelmente, decorre do padrão de distribuição usual dos nematóides numa área. Com efeito, em geral, a distribuição espacial de nematóides obedece a um padrão de distribuição binomial (BARKER et al., 1985), resultando numa distribuição irregular do nematóide na área. Para as demais causas da variação não houve diferença entre os tratamentos.

A análise de variância dos dados obtidos aos 90 dias após a aplicação dos tratamentos evidenciou diferença estatística significativa com 5% de probabilidade para Fontes [plantas não tratadas (Testemunha) e tratadas] no tocante a juvenis de *Meloidogyne* spp. nas raízes. Para as demais causas da variação, assim como para a interação Fontes (F) x Doses (D), não houve diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 11). A comparação entre as médias pelo teste de Tukey com 5% de probabilidade demonstrou que houve diferença significativa entre plantas tratadas e não tratadas no tocante à recuperação de juvenis de *Meloidogyne* spp. nas raízes e que as doses de 1 litro e 2 litros não diferiram entre si, indicando que a dose de 1 litro foi suficiente para proporcionar o resultado obtido (Tabela 11).

A Tabela 12 contém os resultados das análises de variância e comparação entre as médias dos dados obtidos aos 120 dias após a aplicação dos fungos. Como observado aos 60 dias, a análise de variância evidenciou diferença estatística significativa somente para blocos, no tocante a *Aphelenchus* sp. Como anteriormente mencionado, esse fato foi atribuído ao padrão de distribuição binomial dos nematóides na área (BARKER et al., 1985).

Os dados evidenciam que os fungos tiveram apenas um discreto efeito reduzindo a população dos juvenis dos nematóides nas raízes, constatado aos 90 dias após a aplicação (Tabela 11). Sendo o cafeeiro uma planta perene, nos cafezais já infestados, aplicações sistemáticas dos fungos poderão ser feitas para que se possa obter um nível aceitável de controle de *Meloidogyne* spp. Com efeito, os fungos nematófagos não capturam os nematóides internamente nos tecidos das raízes.

Tabela 11. Análises de variância e comparação entre as médias da população de nematóides e de ovos, aos 90 dias após a aplicação dos fungos nematófagos, em duas doses, em cafezal infestado por *Meloidogyne exigua* e *M. paranaensis*.

Causas da Variação	G.L.	Quadrados Médios						Ovos (número) ²
		<i>Meloidogyne</i> spp. (Juvenis)		<i>Aphelenchus</i> sp.		<i>Trichodorus</i> sp.	<i>Tylenchus</i> sp.	
		(solo) ¹	(raízes) ²	(solo) ¹	(raízes) ¹	(solo) ¹	(solo) ¹	
Fontes (F)	1	10,0684 ^{ns}	6,4423*	0,0490 ^{ns}	0,0058 ^{ns}	0,0022 ^{ns}	0,2500 ^{ns}	0,9833 ^{ns}
Doses (D)	1	0,4008 ^{ns}	4,1511 ^{ns}	0,1991 ^{ns}	2,0780 ^{ns}	0,0000 ^{ns}	1,7500 ^{ns}	4,4362 ^{ns}
Interação (FxD)	1	1,5258 ^{ns}	3,4410 ^{ns}	3,1220 ^{ns}	0,0802 ^{ns}	0,0868 ^{ns}	0,2500 ^{ns}	6,4898 ^{ns}
Blocos	3	6,7322 ^{ns}	0,9670 ^{ns}	1,7992 ^{ns}	0,3070 ^{ns}	0,6767 ^{ns}	0,2014 ^{ns}	2,1111 ^{ns}
Resíduo	9	4,6430	1,0695	0,8419	0,6676	0,3098	0,5347	1,7787
C.V.(%)		52,55	21,77	47,52	57,86	40,58	54,95	22,48
Médias das Fontes								
Testemunha		27,375 A ³	392,000 A	3,875 A	1,625 A	1,000 A	1,750 A	1196,50 A
Plantas Tratadas		13,500 A	103,000 B	3,625 A	1,500 A	1,375 A	0,750 A	446,000 A
Médias das Doses								
1 litro		22,500 A	92,625 B	3,375 A	0,125 A	1,125 A	0,000 A	417,750 A
2 litros		18,375 A	402,375 A	4,125 A	3,000 A	1,250 A	2,500 A	1224,750 A

Fontes: plantas tratadas com os fungos.

^{ns}: não significativo (P > 0,05); * : significativo (P < 0,05); ¹Para análise estatística os dados foram transformados em $\sqrt{x+1}$ ²Dados transformados em log (x+1). ³Em cada coluna, médias não transformadas seguidas de mesma letra não diferem pelo teste de Tukey (P> 0,05).

Tabela 12. Análises de variância e comparação entre as médias da população de nematóides e de ovos, aos 120 dias após a aplicação dos fungos nematófagos, em duas doses em cafezal infestado por *Meloidogyne exigua* e *M. paranaensis*.

Causas da Variação	G.L.	Quadrados Médios			
		<i>Meloidogyne</i> spp.		<i>Aphelenchus</i> sp.	Ovos
		(solo) ¹	(raízes) ¹	(solo) ¹	(número) ¹
Fontes (F)	1	3,4892 ^{ns}	1,8624 ^{ns}	0,0049 ^{ns}	1,1180 ^{ns}
Doses (D)	1	0,0567 ^{ns}	2,1244 ^{ns}	0,3217 ^{ns}	0,9479 ^{ns}
Interação (FxD)	1	2,6533 ^{ns}	0,6260 ^{ns}	0,3368 ^{ns}	2,3550 ^{ns}
Blocos	3	2,5167 ^{ns}	1,5061 ^{ns}	4,2196*	5,6068 ^{ns}
Resíduo	9	1,1179	1,4615	0,6291	2,0514
C.V.(%)		34,08	26,33	27,76	24,49
Médias das Fontes					
Testemunha		24,500 A ²	84,500 A	36,875 A	593,250 A
Plantas Tratadas		59,125 A	287,000 A	36,625 A	831,750 A
Médias das Doses					
1 litro		50,250 A	193,000 A	39,500 A	709,000 A
2 litros		33,375 A	178,500 A	34,000 A	716,000 A

Fontes: plantas tratadas como os fungos.

^{ns}: não significativo (P > 0,05); * : significativo (P < 0,05); ¹Para análise estatística os dados foram transformados em log (x+1).² Em cada coluna médias não transformadas seguidas de mesma letra não diferem pelo teste de Tukey (P > 0,05).

Em geral, colonizam o solo, crescendo nos espaços entre as partículas e, então, capturam os juvenis de segundo estágio enquanto estes estão migrando no solo (CARNEIRO, 1992; HAMS e WILKIN, 1961). Por conseguinte, os relatos de resultados bem sucedidos de controle de nematóides com fungos nematófagos são mais freqüentes em culturas de ciclo curto (SANTOS, 2000; SOARES et al., 2005a; SOARES et al., 2005b). Nesses casos, os fungos são aplicados no solo antes do plantio ou, no máximo, concomitante com essa operação, o que aumenta a chance de captura dos juvenis dos nematóides-de-galha antes que estes penetrem nas raízes.

Sendo o cafeeiro uma cultura exótica, a microbiota dos nossos solos não evoluiu com essa cultura de modo a tirar dela sua sustentabilidade. Além disso, a manutenção da cultura no limpo, também, exerce enorme estresse sobre a biota do solo. Em

conseqüência, os nematóides não terão muitos competidores na rizosfera do cafeeiro. Por conseguinte, quando surge um problema causado por uma espécie de *Meloidogyne* em um cafezal, usualmente o problema se agrava, causando acentuado depauperamento da cultura. Nesses casos, os fungos nematófagos terão maiores chances de sucesso se forem dadas condições adequadas de crescimento e manutenção desses agentes no solo.

A adição de matéria orgânica, a cobertura do solo para reduzir o efeito deletério da incidência direta dos raios solares sobre os fungos e a irrigação do solo são fatores que contribuirão para melhorar o desempenho desses agentes. Além disso, a aplicação de fungos nematófagos em cultura acentuadamente depauperada tem poucas chances de sucesso, já que o sistema radicular de plantas muito infectadas não mais responde emitindo novas raízes, ainda que haja expressiva redução da população dos nematóides.

Por outro lado, se o solo também já está muito degradado e pobre, mesmo que haja redução da população do nematóide com a aplicação dos fungos as plantas não terão suporte do solo para esboçar respostas ao tratamento. Além de reaplicações sucessivas dos fungos (CAMPOS e CAMPOS, 1997), as correções do solo e a adição de matéria orgânica serão necessárias para que haja recuperação da cultura.

4.7. Avaliação da eficácia da mistura de fungos nematófagos na redução da população de *Meloidogyne exigua* e *M. paranaensis* em cafeeiros cultivados em vasos em casa de vegetação

Conforme os dados da Tabela 13, a análise de variância relativa a altura das plantas, diâmetro do caule e massa de matéria fresca da parte aérea de plantas de cafeeiro cv. Mundo Novo, cultivada em vasos contendo sola naturalmente infestado pelos nematóides e tratadas ou não tratadas com os fungos nematófagos, não evidenciou diferença estatística entre os tratamentos.

Tabela 13. Análises de variância para as variáveis da parte aérea de plantas de cafeeiro cv. Mundos Novos, cultivadas em vasos contendo solam naturalmente infestado por *Meloidogyne exigua* e *M. paranaensis*, em casa de vegetação.

Causa da Variação	G.L.	Quadrados Médios		
		Altura	Diâmetro do caule	Massa de Matéria Fresca da Parte Aérea
Tratamentos	4	41,4193 ^{ns}	0,0114 ^{ns}	42,4823 ^{ns}
Resíduo	45	18,7762	0,0096	39,2375
C.V.(%)		14,11	17,92	47,47

^{ns}: não significativo (P > 0,05).

Tabela 14. Análises de variância e comparação entre médias de variáveis avaliadas em raízes de cafeeiros cv. Mundo Novo cultivados em vasos em solo naturalmente infestados por *Meloidogyne exigua* e *M. paranaensis*, em casa de vegetação.

Causa da Variação	G.L.	Quadrados Médios			
		MMFR (g)	NG ¹	NO ¹	NJR ¹
Tratamentos	4	257,1187 ^{ns}	3,4502**	11,3429**	15,4472*
Resíduo	45	158,6742	0,2393	4,2660	4,8782
C.V.(%)		84,04	9,06	29,81	40,48
Médias					
Controle (T1)		11,50 A ²	279,70 B	2.264,80 B	1.086,40 B
Tratamento 100 g (T2)		14,64 A	176,10 B	2.088,40 B	775,20 B
Tratamento 200 g (T3)		10,34 A	170,30 B	930,40 B	359,60 B
Testemunha 100 g (T4)		15,17 A	637,60 A	5.060,40 AB	334,00 B
Testemunha 200 g (T5)		23,29 A	167,40 B	11.195,60 A	3.460,80 A

^{ns}: não significativo (P > 0,05) pelo teste F; * significativo (P < 0,05) e ** significativo (P < 0,01) pelo teste F; ¹ Para análise estatística os dados foram transformados em log (x+1). ² Em cada coluna, médias não transformadas seguidas de mesma letra não diferem pelo teste de Tukey (P > 0,05). MMFR = Massa de Matéria Fresca de Raízes (grama); NG = Número de Galhas; NO = Número de Ovos; NJR = Número de Juvenis na Raiz.

Contudo, a análise de variância de quatro variáveis relativas aos sistemas radiculares de plantas tratadas e não tratadas (Tabela 14) evidenciou diferenças entre os tratamentos com 1 ou 5% de probabilidade para três delas, a saber: número de galhas (NG), número de ovos (NO) e número de juvenis nas raízes (NJR). A média da massa de matéria fresca de raízes (MMFR) foi muito variável entre os tratamentos, exibindo alto CV de 84% (Tabela 14). Provavelmente em razão desse fato, o controle

(T1), correspondente ao tratamento não inoculado e com material do solo infestado, não diferiu do tratamento testemunha 200 (g) {T5}, correspondente a 200 g de palha de café + farelo de arroz por vaso, cuja média da MMFR excedeu o dobro do anterior (Tabela 14), e também não diferiu dos demais.

Quanto ao número de galhas nas raízes, a média do tratamento testemunha 100 g (T4) foi maior que as dos demais e diferiu de todas elas. A adição de 100 g por vaso da matéria orgânica constituinte do substrato (palha de café + farelo de arroz), sem os fungos, estimulou o crescimento das raízes, resultando em maior disponibilidade de espaço vital para penetração de juvenis e conseqüentes formações de galhas. De fato, esse tratamento propiciou a segunda maior média para MMFR (Tabela 14), embora não tenha diferido dos demais. Os tratamentos T2 e T3, respectivamente 100 e 200 g do substrato colonizado pelos fungos, por vaso, não diferiram do controle (T1), correspondente ao solo naturalmente infestado sem adição do substrato colonizado ou não pelos fungos, indicando que houve redução da população dos nematóides pelos fungos. Entretanto, a testemunha 200 g (T5), correspondente à adição de 200 g da mistura de palha de café com farelo de arroz, também não diferiu desses tratamentos (Tabela 14). Com efeito, a adição de matéria orgânica, por si só, em muitos casos, propicia razoável controle de nematóides, notadamente quando as condições do ambiente favorecem o crescimento de organismos da biota do solo que, então, passam a competir com os nematóides (CAMPOS e CAMPOS, 1997).

Considerando-se que os fungos nematófagos são muito comuns em nossos solos (MAIA et al; 2001), outros desses, presentes no solo naturalmente infestado, podem ter sido beneficiados quando o volume de matéria orgânica de 200 g por vaso foi adicionado. A contagem de galhas em raízes de cafeeiro infectadas por *M. paranaensis* usualmente é muito difícil, uma vez que esse nematóide coloniza raízes lignificadas, resultando num aspecto corticento (Figura 2 B e C), em vez das galhas características, geralmente formadas nas raízes ainda em sua estrutura primária. Nas infecções de raízes por *M. exigua*, por outro lado, não ocorre o estabelecimento do nematóide em tecidos lignificados. Em vez disso, há formação de galhas de menor diâmetro nas raízes que ainda se encontram em sua estrutura primária.

Quanto ao número de ovos nas raízes, os dados da Tabela 14 indicam que a adição de T2 100 ou T3 200 g da mistura de palha de café + farelo de arroz por vaso favoreceu a reprodução dos nematóides. De fato, com T3 200 g da mistura obteve-se a máxima reprodução dos nematóides, embora esta não tenha diferido da obtida com T2 100 g, mas diferiu das obtidas nos demais tratamentos. Entretanto, esse fato pode estar associado ao maior espaço vital resultante do maior desenvolvimento das raízes (MMFR), embora não tenha sido observada diferença significativa entre os tratamentos, no que se refere à variável MMFR (Tabela 14). A reprodução dos nematóides, avaliada em função do número de ovos obtido por sistema radicular, nos tratamentos correspondentes a 100 e 200 g do material colonizado pelos fungos, também não diferiu do controle (T1), correspondente ao solo infestado, apenas confirmando que o tratamento com os fungos exerceu ação contra os nematóides. Entretanto, os dados confirmam haver uma relação direta entre a massa de raízes (MMFR) e a infecção (NG) e a reprodução dos nematóides (NO), salvo o fato já mencionado de que as galhas formadas por *M. paranaensis* nem sempre são conspícuas. A maior massa de raízes resulta em maior espaço vital para infecção.

O maior número de juvenis nas raízes (NJR) também foi obtido no tratamento correspondente a 200 g da mistura de palha de café + farelo de arroz (T5), que diferiu de todos os demais, e estes não diferiram entre si (Tabela 14). Mesmo assim, no tratamento controle (T1) foi recuperado um número de juvenis nas raízes acentuadamente maior que nos tratamentos em que os fungos foram aplicados, e 200 g do material colonizado pelos fungos reduziu à metade o número de juvenis nas raízes que o tratamento correspondente a 100 g desse material (Tabela 14). Esses dados indicam que, conquanto a cultura no campo não tenha evidenciado melhoria significativa em seu quadro geral, os fungos demonstraram possuir potencial como agentes do controle biológico dos nematóides do cafeeiro. Entretanto, cafezais excessivamente depauperados devem ser preferencialmente erradicados. Em seguida, trabalhos de manejo do solo, assim como dos nematóides, devem ser implementados, antes do estabelecimento de novos cafezais na área. O controle biológico dos

nematóides, por conseguinte, teria maior chance de uso com sucesso em cafezais que, embora infestados, ainda exibem apreciável massa de raízes ativas.

V. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo dão suporte às seguintes conclusões:

1. Fungos nematófagos predadores são muito comuns em diferentes agroecossistemas, exibem exigências nutricionais especiais tanto para o crescimento quanto para a esporulação, assim como diferentes níveis de patogenicidade para nematóides *Meloidogyne exigua* e *M. paranaensis*.
2. Embora seja considerado um parasito de ovos, *Paecilomyces lilacinus* é apenas moderadamente patogênico para ovos de *M. paranaensis*.
3. O exame morfométrico de conídios, assim como das estruturas de captura dos fungos, ao microscópio eletrônico de varredura é um dos meios mais seguros para a identificação das espécies dos fungos nematófagos.
4. O meio de farelo de arroz, extrato de levedura e ágar e o de fubá e ágar são adequados tanto para o crescimento quanto para a esporulação da maioria dos fungos nematófagos.
5. A mistura de palha de café com farelo de arroz é adequada para a formulação de fungos nematófagos, em caráter experimental.
6. Conquanto os fungos nematófagos reduzam a população de nematóides associados ao cafeeiro, as culturas depauperadas, em solos degradados, não mostram sinais de recuperação com uma única aplicação.
7. Infere-se, pois, que o controle biológico dos nematóides do cafeeiro com fungos nematófagos será tanto mais efetivo quanto mais cedo forem iniciadas as aplicações nos cafezais infestados. Por se tratar de uma cultura perene, um programa sistemático de aplicações dos fungos deve ser estabelecido em cada caso.

VI. REFERÊNCIAS

AI-HAZMI, A. S; IBRAHIM, A. A. M.; ABDUL-RAZIQA, A. T. Evaluation of a nematode-encapsulating fungi complex for control of *Meloidogyne javanica* on potato. **Pakistan Journal of Nematology**, Islamabad, v.11, n.1 p.139-149, 1993.

BAERMANN, G. Eine einfache Methode Zur Auffindung von Ankvlostomum (Nematoden) Larven in Erdproben. **Tijdschr.Ned.** Indië, n.57, p.131-137, 1917.

BARKER, R. K.; CARTER, C. C.; SASSER, N.J. **An Advanced treatise on Meloidogyne methodology**. North Carolina.: International *Meloidogyne* project. v. II, 1985. 223 p.

BARRON, G. L. **The nematode-destroying fungi**. Guelph: Canadian Biological Publications, 1977. 140 p.

BERNARDO, A. R. A. **Eficácia do controle biológico de *Rotylenchulus reniformis* (Linford & Oliveira, 1940) em algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) com fungos nematófagos**. 2002. 74 f. Dissertação (Mestrado em Entomologia Agrícola) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2002.

BERNARDO, A. R.; SANTOS, J. M. dos. Patogenicidade *in vitro* de *Monacrospori robustum* a *Rotylenchulus reniformis*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.4, p.1-5, 2004.

CAMPOS, H. D.; CAMPOS, V. P. Efeito da época e forma de aplicação dos fungos *Arthrobotrys conoides*, *A. musiformis*, *Paecilomyces lilacinus* e *Verticillium chlamydosporium* no controle de *Meloidogyne exigua* do cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.22, n.3, p.361-365, 1997.

CAMPOS, V. P. Perspectivas do controle biológico de fitonematóides. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.16, n.172, p.26-30, 1992.

CARNEIRO, G. D. M. R. Princípios e tendências do controle biológico de nematóides com fungos nematófagos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.27, p.113-121, 1992.

CARNEIRO, R. M. D. G.; GOMES, C. B. Metodologia e testes de patogenicidade de *Paecilomyces lilacinus* e *P.fumosoroseus* em ovos de *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v.17, n.1, p.66-75, 1993.

CASCORELLI, W.; PRAMER, D. Nutrition and growth of *Arthrobotrys conoides*. **Journal of Bacteriology**, Raleigh, v.1, n.84, p.60-64, 1962.

CASTRO, J. M. C.; LIMA, R. D.; FERRAZ, S. NEVES, L. C. J. Capacidade de predação de *Arthrobotrys musiformis* a fitonematóides. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v.26, n.1, p.58-62, 2000.

CHEN, J.; ABAWI, G. S.; ZUCKERMAN, B. M. Efficacy of *Bacillus thuringiensis*, *Paecilomyces marquandii* and *Streptomyces costaricanus* with and without organic amendments against *Meloidogyne hapla* infecting lettuce. **Journal of Nematology**, Lake Alfred, v.32, n.1, p.70-77, 2000.

CLIFF, G. M.; HIRSCHMANN, H. Evaluation of morphological variability in *Meloidogyne arenaria*. **Journal of Nematology**, Leiden, v.17, p.445-449, 1985.

COIMBRA, J. L.; CAMPOS, V. P.; SOUZA, R. M. Isolamento e parasitismo de fungos de fêmeas de *Meloidogyne javanica* e *Meloidogyne exigua*. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v.23, n.1, p.25-33, 1999.

COOKE, R. C. Ecological characteristics of nematode-trapping Hyphomycetes. In. Preliminary studies. **Annual Applied Biology**, Oxford, v.52, n.1, p.431-437, 1963.

COOLEN, W. A.; D'HERDE, C. J. **A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue**. Ghent Agriculture Research Center, Belgium, 1972, 77 p.

CORBANI, R. Z. **Potencial do controle biológico de *Tylenchulus semipenetrans* com fungos nematófagos.** 2002. 44 f. Dissertação (Mestrado em Entomologia Agrícola) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2002.

D'ANGIERI FILHO, C.N.; CAMPOS, V. P. Controle de *Meloidogyne javanica* em Jaborandi (*Pilocarpus microphyllu*) com *Arthrobotrys conoides*, *Paecilomyces lilacinus* e *Verticillium chlamydosporium* **Nematologia Brasileira**, Brasília, v.21, n.2, p.1-29, 1997.

DACKMAN, C.; NORDBRING-HERTZ, B. Conidial traps-a new survival structure of the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. **Mycological Research**, Cambridge, v.96, n.2, p.194-198, 1992.

DALLA PRIA, M. **Controle biológico de *Meloidogyne incognita*, raça 3, pelos fungos *Verticillium chlamydosporium* e espécies de *Monacrosporium*, isolados ou combinados.** (Dissertação de Mestrado) em- Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1992.

DALLA PRIA, M.; FERRAZ, S.; MUCHOVEJ, J. J. Isolamento e identificação de fungos nematófagos de amostras de solo de diversas regiões do Brasil. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v.15, n.2, p.170-178, 1991.

DAVIDE, R. G. Nematodes problems affecting agriculture in the Philippines. **Journal of Nematology**, Leiden, v.20, n.2, p.214-218, 1968.

DAVIDE, R. G.; HAHN, S. K.; CAVENESS, F. E. Biological control of nematodes using *Paecilomyces lilacinus* in the Philippines. Integrated pest management or tropical root and tuber crops. In: THE GLOBAL STATUS OF AND PROSPECTS FOR INTEGRATED PEST MANAGEMENT OF ROOT AND TUBER CROPS IN THE TROPICS, 1987, Ibadan, Nigeria. **Proceedings...** Ibadan: International Institute of Tropical Agriculture, 1990, p.156-163.

DIAS, W. P. **Controle de *Meloidogyne incognita*, Raça 3 com *Arthrobotrys* spp.** 1992. 71 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1992.

DIAS, W. P.; FERRAZ, S. Crescimento e esporulação de *Arthrobotrys* spp. em diferentes substratos, meios de cultura, pH e níveis de temperatura. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v.17, n.2, p.169-181, 1993.

DIAS, W. P.; FERRAZ, S. Avaliação de espécies de *Arthrobotrys* para o controle de *Meloidogyne incognita*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.19, n.2, p.189-192, 1994.

DOMSCH, K.H.; GAMS, W.; ANDERSON, T. H. **Compendium of soil fungi**. London: Academic Press, v.1, 859 p., 1980.

DRECHSLER, C. Some hyphomycetes that prey on free living terricolous nematodes. **Mycology**, Adelaide, v.29, p.447-552, 1937.

DRECHSLER, C. Some clampless hyphomycetes predacious on nematode and rhizopods. **Annual Mycology**, Australia, v.15, n.2, p.9-25, 1961.

FAPESP. Combate natural na terra cultivada. **Revista Pesquisa FAPESP**, São Paulo, v.78, p.72-74, Agosto 2002.

FERRAZ, S.; DIAS, C. R.; FREITAS, L. G. de. Controle de nematóides com práticas culturais. In: ZAMBOLIM, L. **Manejo integrado Fitossanidade: cultivo protegido, pivô central e plantio direto**. Viçosa: UFV, 2001, p.1-53.

FREITAS, L. G., FERRAZ, S., MUCHOVEJ, J. J. Effectiveness of different isolates of *Paecilomyces lilacinus* and an isolate of *Cylindrocarpon destructans* on the control of *Meloidogyne javanica*. **Nematropica**, Auburn, v.25, p.109-115, 1995.

FREITAS, L. G.; FERRAZ, S.; ALMEIDA, S. A. Controle de *Meloidogyne javanica* em tomateiro pela produção de mudas em substrato infestado com *Paecilomyces lilacinus*. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v.23, n.1, p.65-73, 1999.

GARDNER, K.; WIEBE, G.; GILLESPIE, T.; TRINCI, P. J. Production of chlamydospores of the nematode-trapping *Duddingtonia flagrans* in shake flask culture. **Mycological Research**, Manchester, v.104, n.2, p.205-209, 2000.

GOELDI, E. A. Relatório sobre a moléstia do cafeeiro na Província do Rio de Janeiro. **Archivos do Museu Nacional**, Rio de Janeiro, v. 8, p. 7-123, 1892.

GOMES, C. B.; CARNEIRO, R. M. D. G. Receptividade de diferentes solos á colonização pelo fungo *Paecilomyces lilacinus* em três formulações. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v.21, n.2, p.61-69, 1997.

GOODEY, J. B. **Laboratory methods for work with plant and soil nematodes**. London: Her Majesty's Stationery Office, 1963. p.12-56. (**Technical bulletin, 2**).

HAARD, K. Taxonomic studies on the genus *Arthrobotrys* Corda **Mycologia**, New York, v.60, p.1140-1159, 1968.

HAMS, A. F.; WILKIN, G. D. Observations on the use of predacious fungi for the control of *Heterodera* spp. **Annals of Applied Biology**, Oxford, v.49, p.515-523, 1961.

HIRSCH, P. R.; ATKINS, S. D.; MAUCLINE, T. H.; MORTON, C. O.; DAVIES, K. C.; KERRY, B. R. Methods for studying the nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium* in the root environment. Interactions- in- the- root-environment: an- integrad-approach. In: **Millennium Conference on Rhizosphere Interactions, 2001 Rothamsted. Proceedings... Rothamsted : IACR**, 2001. p. 150.

HUSSEY, R. S.; BARKER, K. R. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. **Plant Disease Reporter**, St. Paul. v.57, p.1025-1028, 1973.

JACOBS, P. **Nematophagous Fungi: Guide by Philip Jacobs**, BRIC-Version. Disponível em: <<http://www.biological-research.com/philip-jacobs%20BRIC/index.htm>> Acesso em: 22.Jul.2003.

JATALA, P. Biological control of plant-parasitic nematodes. **Annual Review of Phytopathology**, Stanford, v.24, n.1, p.453-489, 1986.

JATALA, P.; SALAS, R.; BOCANGEL, M. Multiple application and long-term effect of *Paecilomyces lilacinus* in controlling *Meloidogyne incognita* under field condition. **Journal of Nematology**, Leiden, v.13, n.4, p.445, 1981.

JENKINS, W. R. A rapid centrifugal flotation technique for separating nematodes from soil. **Plant Disease Reporter**, St. Paul, v.48, n.1, p.692, 1964.

KERRY, B. R. Fungi as biological control agents for plant parasitic nematodes. In: WHIPPS, J. M.; LUMSDEN, R. D. (Ed) **Biotechnology of fungi for improving plant growth**. Cambridge: Cambridge University Press, 1989. p.153-170.

KERRY, B. R.; CRUMP, D. H. ; MULLEN, L. A. Studies of cereal cyst nematode, *Heterodera avenae* under continuous cereals, 1975-1978. II fungal parasitism of nematode females and eggs. **Annals of Applied Biology**, Oxford, v.10, n.3, p.389-499, 1982.

KERRY, B. R.; SIMON, A.; ROVIRA, A. D. Observations on the introduction of *Verticillium chlamydosporium* and other parasitic fungi into soil for control of the cereal cyst-nematode, *Heterodera avenae*. **Annals of Applied Biology**, Oxford, v.105, n.3, p.509-516, 1984.

KHAN, T. A.; HUSAIN, S. I. Studies on the Efficacy of Seed Treatments with Pesticides, Oil-Cakes, Neem-Leaf and culture Filtrate of *Paecilomyces lilacinus* for the Control of Diseases Caused by presence of *Rotylenchulus reniformis*, *Meloidogyne incognita* and *Rhizoctonia solani* Either Individually or Concomitantly on Cowpea. **Indian Journal of Nematology**, Lawrence, v.2, n.1, p.192-198, 1988.

KO, M. P.; BERNARD, E. C.; SCHMITT, D. P.; SIPES, B. S. Occurrence of pasteuria-like organisms on selected plant-parasitic nematodes of pineapple in the hawaiian islands. **Journal of Nematology**, Lake Alfred, v.27, n.2, p.395-408, 1995.

LILLY, V. G.; BARNETT, H. L. **Growth physiology of the fungi**. New York: McGraw-Hill, 1951. 432 p.

LIMA, R. D. **Caracterização de isolados e avaliação de patogenicidade de *Arthrobotrys* spp. a fitonematóides**. 1996. 88 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia)-, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1996.

LIU, X. Z.; CHEN, S. Y. Nutritional requirements of *Pochonia clamydospora* and ARF 18 fungal parasites of nematode eggs. **Journal Invertebrate Pathology**, Orlando, v.83, n.1, p.10-15, 2003.

LIU, X. Z.; ZHANG, K. Q. Nematode-trapping species of *Monacrosporium* with special reference to two new species. **Mycological Research**, Manchester, v.98, p.862-868, 1994.

MAIA, A. S. **Isolamento, identificação e potencialidade de fungos como agentes de biocontrole de *Meloidogyne* spp. e *Heterodera glycines***. 2000, 116 f. Tese (Doutorado em Agronomia Produção Vegetal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Universidade Estadual Paulista; Jaboticabal, 2000.

MAIA, A. S.; SANTOS, J. M. dos. A SEM technique for preparing biological control agents of nematodes in action. **Acta Microscópica**, Rio de Janeiro, v.8, suppl.B, p.550-551, 1997.

MAIA; A. S.; SANTOS, J. M. dos; Di MAURO, A. O. Estudo 'in vitro' da habilidade predatória de *Monacrosporium robustum* sobre *Heterodera glycines*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.26, n.4, p.732-736, 2001.

MANKAU, R. Biocontrol fungi as nematode control agents. **Journal of Nematology**, Leiden, v.12, n.4, p.253-25, 1980.

McCULLOCH, J. S. New species of nematophagous fungi from Queensland. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge ,v.68, n.2, p.73-179, 1977.

NAIK, D.; RAO, M. S.; LAKSHMI, R.; REDDY, M. K.; RAHIMAN, B. A. Molecular detection of *Verticillium chlamydosporium*, a nematophagous fungi against root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*), **Horticultural: Ecosystems**, Bangalore, v.9, n.1, p.77-83, 2003.

NAVES, R. L.; CAMPOS, V. P. Ocorrência de fungos predadores de nematóides no Sul de Minas Gerais e estudo da capacidade predatória e crescimento *in vitro* de alguns de seus isolados. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v.15, n.167, p.72-76, 1991.

NOVARETTI, W. R. T. Controle biológico de nematóides fitopatogênicos. In: REUNIÃO SOBRE CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS DE PLANTAS, 1: 1986, Campinas. **Anais...** Piracicaba: Fundação Cargill, 1986. p.24-38.

OLIVEIRA, R. D'ARC de L.; FERRAZ, S.; ALFENAS, A. C.; DIAS-ARIEIRA, C. R. Caracterização morfológica e isométrica de espécies de *Arthrobotrys* ocorrentes no Brasil. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v.26, n.2, p.181-197, 2002.

RIBEIRO, R. C. F.; CAMPOS, V. P. Controle de *Meloidogyne javanica* com fungos parasitas de ovos. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v.17, n.2, p.193-202, 1993.

RIBEIRO, R. C. F.; FERRAZ, S.; MIZOBUTSI, E. H.; MENDES, M. Levantamento de espécies de *Monacrosporium* predadoras de nematóides em diversas regiões brasileiras. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v.23, n.2, p.41-47, 1999.

SANTOS, J. M. dos. 2000. "Coquetel" de fungos combate vermes em flores e hortifrutigranjeiro Disponível em:

<<http://www.horticiencia.com.br/news/news2.asp?id=578>> Acesso em: 29 nov. 2005.

SANTOS, M. A. ; FERRAZ, S. Eficiência de cinco isolados de fungos nematófagos no controle de *Meloidogyne* spp. ao longo de três cultivos sucessivos. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v.24, n.2, p.193-201, 2000.

SANTOS, M. A. **Detecção, isolamento e avaliação do potencial antagonista de fungos nematófagos presentes em solos brasileiros**. 1991. 97f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1991.

SASSER, J. N. **Plant – parasitic nematodes the former's hidden enemy**. Raleigh: North Carolina State University, 1989. 115 p.

SOARES, P. L. M.; BARBOSA, B. F. F.; NOZAKI, M. H.; SANTOS, J. M. dos; BARBOSA, J. C.; MUSCARI, A. M. Controle biológico de *Meloidogyne incognita* e *Rotylenchulus reniformis* no cultivo de alface em ambiente protegido. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, 25., 2005.a, Piracicaba. **Resumos...** Brasília: SBN, 2005a, p.112.

SOARES, P. L. M.; FERRAZ, M. P. S.; BARBOSA, B. F. F.; NOZAKI, M. H.; BRAZ, L. T., SANTOS, J. M. dos; BARBOSA, J. C.; MUSCARI, A. M. Controle biológico de *Meloidogyne incognita* na produção comercial de pimentão em ambiente protegido. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, 25, 2005b, Piracicaba. **Resumos...**, Brasília: SBN, 2005b., p.112-113.

STIRLING, G. R.; MANKAU, R. Parasitism of *Meloidogyne* eggs by a new fungal parasite **Journal of Nematology**, Leiden, v.10, n.1 p.236-240, 1978.

STIRLING, G. R.; SMITH, L. J.; LICASTRO, K. A.; EDEN, L. M. Control of root-knot nematode with formulations of the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys dactyloides*. **Biological Control**, San Diego, v.11, n.1, p.224-230, 1998.

VAN OORSCHOT, C. A. N. Taxonomy of *Dactylaria complex* V. A. review of *Arthrobotrys* and allied genera. **Studies in Mycology**, Amsterdam, v.26, n.2, p.61-96, 1985.