

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CLEONICE LUBIAN

CONTROLE BIOLÓGICO *IN VITRO* DE *PANAGRELLUS REDIVIVUS*  
UTILIZANDO ESPÉCIES DE *HOHENBUEHELIA*

PALOTINA

2016

CLEONICE LUBIAN

CONTROLE BIOLÓGICO *IN VITRO* DE *PANAGRELLUS REDIVIVUS*  
UTILIZANDO ESPÉCIES DE *HOHENBUEHELIA*

Trabalho apresentado a disciplina TCC II  
como requisito de conclusão do curso de  
Agronomia, Setor Palotina, Universidade  
Federal do Paraná.

Orientador: Dr. Roberto Luis Portz  
Co-orientador: Dr. Vagner Gularte Cortez

PALOTINA

2016

## TERMO DE APROVAÇÃO

CLEONICE LUBIAN

CONTROLE BIOLÓGICO *IN VITRO* DE *PANAGRELLUS REDIVIVUS*  
UTILIZANDO ESPÉCIES DE FUNGO DO GÊNERO *HOHENBUEHELIA* (SIN.  
*NEMATOCYTONUS*)

Trabalho de conclusão de curso aprovado como requisito parcial à obtenção do título de Engenheira Agrônoma, Curso de Agronomia no Setor Palotina da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:



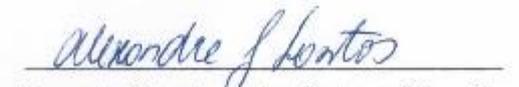
Prof. Dr. Roberto Luis Portz

Orientador – Departamento de Ciências Agrárias - UFPR Setor Palotina



Profa. Dr. Vagner Gularte Cortez

Departamento de Biodiversidade - UFPR Setor Palotina



Alexandre Gonçalves dos Santos e Silva Filho  
Mestrando em Botânica - UFPR Setor Palotina

Palotina, 06 de julho 2016

À minha família, meu tesouro, meu orgulho.

## AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida e por falar comigo inúmeras vezes, dando-me a confirmação de que estou no caminho certo.

À minha família por acreditar na minha capacidade e determinação, pelo apoio incondicional em todos os momentos e em todos os âmbitos, financeiro, moral e emocional, durante esta longa jornada. Por nós venci mais uma etapa da vida.

Ao meu orientador Professor Dr. Roberto Luis Portz por toda instrução e acompanhamento durante o processo de obtenção de dados do presente trabalho. Por seu otimismo, perseverança e paciência. Ao co-orientador Prof. Dr. Vagner Gularte Cortez e à Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Vivian Carré Missio que revelaram preciosas dicas para a conclusão desta pesquisa.

Aos técnicos do Departamento de Ciências Agrônômicas Joelmir dos Santos, Jamilson Bispo de Oliveira e Francielle Pierobon pelo assessoramento, instruções e troca de ideias que enriqueceram o trabalho.

Ao mestrando em botânica (UFPR – Setor Palotina) Alexandre Gonçalves dos Santos e Silva Filho, pelas coletas, identificação e compartilhamento dos espécimes de fungos do gênero *Hohenbuehelia*.

À mestranda em Bioenergia (UFPR – Setor Palotina) Danielle Dutra Martinha pelo auxílio nas análises estatísticas realizadas e pelas dicas sobre as metodologias anteriormente testadas.

Ao produtor Pedro Tetsuo Kanno pelo apoio durante o desenvolvimento da pesquisa.

À UFPR – Setor Palotina, Universidade da qual me orgulho de fazer parte. Agradeço pela estrutura e todo aprendizado que obtive, pelas bolsas PRAE, monitoria e ARI, pelo auxílio financeiro para a apresentação de trabalhos em congressos. Agradeço, ainda, a oportunidade de realizar um intercâmbio internacional, experiência para toda a vida.

Aos demais funcionários, professores, técnicos e servidores da Universidade Federal do Paraná, mesmo que indiretamente vocês foram essenciais para esta conquista. Obrigada UFPR.

*“Conte-me e eu esqueço. Mostre-me e eu apenas me lembro. Envolve-me e eu compreendo.”*

*Confúcio*

## RESUMO

O controle biológico é um método de controle de pragas, como nematoides, através de um organismo vivo. Dentre os agentes potenciais, os fungos se destacam, pois algumas espécie possuem habilidade nematófaga e utilizam nematoides como fonte de nutrientes, predando-os a partir da formação de um elaborado sistema de hifas. O presente trabalho teve por objetivo coletar, identificar e testar *in vitro* o potencial de predação de espécies do gênero *Hohenbuehelia* no biocontrole de *Panagrellus redivivus*; avaliar o efeito do crescimento micelial na presença dos nematoides em relação à testemunha, sem nematoides; avaliar o tipo de predação; avaliar a porcentagem de predação das espécies, e avaliar o fator de mortalidade. Após a coleta e identificação através de análises macro e microscópicas, diversos espécimes de fungos foram repicados em placas de Petri, contendo meio de cultura BDA (Batata, Dextrose, Agar) e armazenados em BOD a 25°C. Os espécimes foram identificados como *H. mastrucata*, *H. portegna*, *H. paraguayensis*, *H. sp.* e *H. aff. bullulifera*. Para o teste de predação, foi removido um disco de 5 mm de diâmetro, a partir de culturas puras em BDA e transferido para o centro de oito placas de Petri contendo Agar-água (2 %), divididas em quatro quadrantes cada. Quatro placas representaram a testemunha, sem adição de nematoides. Após o desenvolvimento micelial, foi adicionado às placas 100 µL de suspensão de nematoides, contendo uma média de 100 indivíduos. As placas contendo o fungo e os nematoides foram incubadas por três dias, em condições de escuro, à temperatura de 25°C. As observações foram realizadas diariamente em lupa, iniciando-se 24 horas após a adição dos nematoides nas placas. O número de nematoides imobilizado, bem como o desenvolvimento micelial diário foram registrados em planilhas. As observações em microscópio foram registradas através de sistema de captura de imagens adaptado ao microscópio óptico. Resultados indicaram que todas as espécies possuem habilidade nematófaga. A presença de nematoides não estimulou o desenvolvimento micelial para nenhuma espécie. Todas as espécies são agente endoparasitas de biocontrole. As espécies com melhor desempenho são *H. mastrucata*, *H. paraguayensis* e *H. portegna*, com porcentagem de predação ao terceiro dia de avaliação de 125, 180 e 228%, respectivamente. O fator de mortalidade revelou índices de predação diários, de modo que, *H. mastrucata* teve o melhor índice de predação ao segundo dia de avaliação, *H. portegna* apresentou um aumento progressivo e *H. paraguayensis*, *H. sp.* e *H. aff. bullulifera* foram constantes a partir do segundo dia de avaliação;

Palavras-chave: biocontrole, *Nematoctonus*, nematófago

## ABSTRACT

Biological control is a method of controlling pests, such as nematodes, using a living organism. Among all potential agents, the fungi stand out, because some species have nematophagous ability and use nematodes as nutrient source, preying them from an elaborate hyphae system. The present study aimed to collect, identify and test *in vitro* the predation potential of *Hohenbuehelia* species against *Panagrellus redivivus*; to evaluate mycelial growth effect in presence of nematodes compared to the control, without nematodes; to evaluate predation type; to evaluate the predacity percentage of each specie; and to evaluate mortality factor. After collecting and identification through macro and microscopical analysis, many specimens were placed in Petri plates containing PDA (Potato, Dextrose, Agar) and stored in BOD at 25°C. The specimens were identified as *H. mastrucata*, *H. portegna*, *H. paraguayensis*, *H. sp.* and *H. aff. bullulifera*. To the predacity test a 5mm disk was removed from pure colonies in PDA and transferred to eight Petri plates containing agar-agar (2%), divided into four quadrants each one. Four plates represented the control, without nematodes. After mycelial development, 100 µL of nematode suspension was added to the plates with a media of 100 individuals. The plates containing the fungus and nematodes were stored for three days in dark condition, at 25°C. The observations occurred daily and started after 24 hours of nematodes addition to the plates. The immobilized nematodes, as well as, daily mycelial growth were registered in spreadsheet. Observations through microscope were registered by a capture system connected to a microscope. Results indicate that all species have nematophagous ability. Nematodes presence didn't stimulate mycelial growth to none specie. All species are endoparasites biocontrol agents. The species with better performance are *H. mastrucata*, *H. paraguayensis* and *H. portegna*, with predation percentage at third day of 125, 180 e 228%, respectively. The mortality factor showed daily predacity indexes, so that, *H. mastrucata* had the best one at the second evaluation day, *H. portegna* presented a progressive increase and *H. paraguayensis*, *H. sp.* e *H. aff. bullulifera* were constant from the second evaluation day on.

Keywords: biocontrol, *Nematoctonus*, nematophagous

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: CÉLULAS ADESIVAS E FÍBULA (BARRON E DIERKES, 1977) .....	17
FIGURA 2: LIBERAÇÃO DE COMPOSTOS EM MEIO ARTIFICIAL ÁGAR-ÁGUA (2%), ANTECEDENDO O CRESCIMENTO DE <i>H. PARAGUAYENSIS</i> . AUMENTO DE 40X.....	26
FIGURA 3: FORMAÇÃO DE GOTÍCULAS EM CULTURAS DE <i>H. PARAGUAYENSIS</i> (A) E <i>H. PORTEGNA</i> (B). AUMENTO DE 100X.....	30
FIGURA 4: ALÇAS FORMADAS POR <i>H. AFF. BULLULIFERA</i> NA AUSÊNCIA DE NEMATOIDES (A) E NA PRESENÇA DESTES (B) AUMENTO DE 400X.....	30
FIGURA 5: LIBERAÇÃO DE SUBSTÂNCIA(S) POR <i>H. AFF. BULLULIFERA</i> EM MEIO ARTIFICIAL ÁGAR-ÁGUA (2%).....	31
FIGURA 6: MOVIMENTO ONDULATÓRIO DE NEMATOIDES EM MEIO ARTIFICIAL DE ÁGAR ÁGUA (2%) COM AS ESPÉCIES <i>H. SP.</i> (A). AUMENTO 40X E <i>H. AFF. BULLULIFERA</i> (B). AUMENTO DE 100X. ....	32
FIGURA 7: <i>HOHENBUEHELIA PARAGUAYENSIS</i> , AUMENTO DE 400X. ....	36
FIGURA 8: CÉLULAS ADESIVAS. <i>H. AFF. BULLULIFERA</i> (A) E <i>H. PORTEGNA</i> (B). AUMENTO DE 400X. ....	37
FIGURA 9: HIFAS DE <i>H. MASTRUCATA</i> (A) AUMENTO DE 40 VEZES E <i>H. PORTEGNA</i> (B) AUMENTO DE 100X. ....	38
FIGURA 10: NEMATOIDES CONSUMIDOS POR <i>H. MASTRUCATA</i> . AUMENTO DE 100X.....	39
FIGURA 11: PROVA DA PREDACÃO DE <i>H. AFF. BULLULIFERA</i> . AUMENTO DE 40X.....	40
FIGURA 12: DESEMPENHO DE PREDACÃO DE <i>H. PORTEGNA</i> . FORMAÇÃO DE EMARANHADOS (A), INTENSO DESENVOLVIMENTO DE HIFAS (B) E PENETRAÇÃO (C E D). AUMENTO DE 400X (A E D); 100X (B); 40X (C) .....	411
FIGURA 13: MODO DE PREDACÃO DE <i>H. PARAGUAYENSIS</i> . AUMENTO DE 40X.....	41

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1: RELAÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL MÉDIO INICIAL (CM) COM O TEMPO EM DIAS PARA CADA ESPÉCIE DE <i>HOHENBUEHELIA</i> .....	26
TABELA 2: MÉDIA DE CRESCIMENTO RADIAL DIÁRIO DE ESPÉCIES DE <i>HOHENBUEHELIA</i> , NA PRESENÇA (TRAT) OU AUSÊNCIA DE NEMATOIDES (TEST).....	27
TABELA 3: PORCENTAGEM DE PREDUÇÃO DE NEMATOIDES POR <i>HOHENBUEHELIA</i> SPP.....	33
TABELA 4: PREDUÇÃO DE NEMATOIDES POR <i>HOHENBUEHELIA</i> SPP.....	34
TABELA 5: FATOR DE MORTALIDADE PARA <i>HOHENBUEHELIA</i> SPP .....	35

## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1: NÚMERO DE NEMATOIDES PREDADOS POR <i>HOHENBUEHELIA</i> SPP .....	33
---	----

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>9</b>
1.1 NEMATOIDES E SEU IMPACTO NA AGRICULTURA.....	10
1.2 <i>PANAGRELLUS REDIVIVUS</i> .....	11
1.3 CONTROLE BIOLÓGICO .....	12
1.4 CONTROLE BIOLÓGICO DE NEMATOIDES .....	13
1.5 FUNGOS NEMATÓFAGOS.....	15
1.6 O GÊNERO <i>HOHENBUEHELIA</i> .....	16
1.7 CULTIVO <i>IN VITRO</i> .....	19
<b>2 OBJETIVO GERAL</b> .....	<b>20</b>
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
<b>3 METODOLOGIA</b> .....	<b>20</b>
3.1 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DE <i>HOHENBUEHELIA</i> SPP .....	20
3.2 ISOLAMENTO E MANUTENÇÃO DE <i>HOHENBUEHELIA</i> SPP .....	21
3.3 OBTENÇÃO E CONSERVAÇÃO DE <i>PANAGRELLUS REDIVIVUS</i> .....	22
3.4 AVALIAÇÃO DA PREDACÃO <i>IN VITRO</i> DE <i>HOHENBUEHELIA</i> SPP .....	22
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>23</b>
4.1 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DE <i>HOHENBUEHELIA</i> SPP.....	23
4.2 ISOLAMENTO E CRESCIMENTO DE <i>HOHENBUEHELIA</i> SPP.....	25
4.2.1 Técnicas de isolamento.....	27
4.3 AVALIAÇÃO DA PREDACÃO <i>IN VITRO</i> DE <i>HOHENBUEHELIA</i> SPP .....	29
<b>5 CONCLUSÃO</b> .....	<b>42</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>43</b>
<b>APÊNDICES</b> .....	<b>50</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil é responsável por uma enorme produção de grãos, sendo o segundo maior exportador agrícola do mundo. Para os próximos dez anos, o cultivo de soja vai ocupar metade das áreas agricultáveis, uma vez que esta cultura é a mais lucrativa e comercializada para China que apresenta uma crescente demanda. Algumas projeções visam que até 2016, o crescimento não será superior a 2% ao ano. Por outro lado, a partir de 2017, o crescimento do produto interno bruto será em média de 2,6% ao ano. Este estudo revela o Brasil num posicionamento mais competitivo nos mercados mundiais (OCDE / FAO, 2015). É importante dizer que o Brasil tem uma boa referência mundial para a segurança alimentar e sustentabilidade ambiental (PEREIRA *et al.*, 2012).

O Paraná é o segundo maior estado produtor do país. De acordo com a Secretaria de Agricultura, está previsto para o estado do Paraná uma safra recorde de soja de pouco mais de 5 milhões de hectares em 2014/2015 e se o tempo cooperar, isso representará um aumento de 18% em relação ao ano passado (Soybean and Corn Advisor, 2014). A região Oeste do Paraná é responsável pela produção de 20% de soja no estado. O solo fértil, uso intensivo de máquinas e implementos e também devido à adaptabilidade da soja, além de uma maior competitividade de mercado são fatores que proporcionam o destaque na produção de soja, milho e trigo, culturas que ocupam a maior parte da área plantada e que são à base da economia na região (SEAB, 2012).

Infelizmente, muitos fatores são responsáveis por comprometer o sucesso de todas as boas perspectivas de produção acima. Nematóides representam uma séria ameaça para a produção de soja no Brasil, mas os problemas nematológicos sempre existiram aqui (MACHADO, 2014). A espécie *Heterodera glycines* conhecida como nematoide de cisto da soja se espalhou em taxas muito rápidas nas terras cultivadas, causando danos as plantas. Hoje em dia *Pratylenchus brachyurus* chamado de nematoide das lesões não é considerado um patógeno secundário devido ao seu ataque grave à soja e sua ocorrência comum (ALVES *et al.*, 2011). O gênero *Meloidogyne*, conhecido como nematoide das galhas abrange espécies polífagas e altamente adaptadas para muitas plantas em todo o mundo,

esclarecendo que as regiões temperadas do Brasil são muito favoráveis a eles (MACHADO, 2014). O ataque de nematoides provoca perda estimada em US\$ 120 bilhões em todo o mundo, o que significa menos comida que poderia alimentar 350 milhões de pessoas (JONES; FOSU-NYARKO, 2015).

Os problemas crescentes se referem ao uso intensivo de terras com a monocultura em grandes áreas por muitos anos consecutivos, especialmente quando culturas susceptíveis são cultivadas (MACHADO, 2014). O aumento da produção e da área plantada de soja na região Oeste do Paraná causou a introdução e disseminação de patógenos de importância econômica para a cultura. Os nematoides podem causar perdas na ordem de 10 a 40% em soja cultivada em solos arenosos. Apenas a espécie *Meloidogyne incognita* é responsável por perdas entre 20 a 30% (INOMOTO, 2006).

## 1.1 NEMATOIDES E SEU IMPACTO NA AGRICULTURA

Os fitonematoides são vermes que estão presentes nos mais diversos solos agrícolas e que exploram variadas culturas comerciais nas quais geralmente parasitam seus órgãos subterrâneos, causando enorme redução de produtividade (FERRAZ; MONTEIRO, 2011).

Quanto ao hábito de vida são assim classificados: àqueles que atacam a parte aérea da planta e os que sobrevivem no subsolo próximo a rizosfera. Também se dividem quanto ao seu parasitismo: nematoides migratórios que se movimentam ao longo dos tecidos radiculares, nematoides sedentários que se fixam em regiões nutritivas, e nematoides ectoparasitas que se nutrem estando fixados no exterior da planta (COYNE *et al.*, 2007).

O gênero *Pratylenchus* contém indivíduos endoparasitas migradores (SANTOS, 2012), enquanto que indivíduos do gênero *Meloidogyne* e *Nacobbus* são endoparasitas sedentários, ambos de difícil controle. Os ectoparasitas migradores representam a maioria dos gêneros de nematoides, como *Helicotylenchus*, *Trichodorus*, *Xiphenema*, *Criconemella*, ao passo que entre os ectoparasitas sedentários têm-se os gêneros *Heterodera*, *Globodera*, *Tylenchulus*, *Rotylenchulus* (TIHOHOD, 2000).

Dentre os gêneros encontrados no Brasil há destaque para o *Meloidogyne* que possui 89 espécies, sendo as de maior importância *M. arenaria*, *M. incognita*, *M. javanica* e *M. hapla* (FERRAZ; MONTEIRO, 2011). Este gênero é considerado preocupante, pois se distribui cosmopolitamente e parasita diversas plantas, comerciais e não comerciais, características que lhe conferem fácil adaptação aos variados ecossistemas. Assim, reduz o valor comercial dos alimentos, especialmente os tuberosos, como o inhame e vagens de amendoim. Os nematoides de *Meloidogyne* afetam a planta de tal modo que formam portas de entrada na planta para o ataque de uma gama maior de fitopatógenos secundários do solo (MOURA, 1997).

Estes vermes possuem corpo arredondado com 0,4 a 1,0 mm de comprimento e 0,25 a 0,75  $\mu\text{m}$  de diâmetro para as fêmeas e de 1,2 a 1,5 mm de comprimento e 30 a 36  $\mu\text{m}$  de diâmetro para os machos (AGRIOS, 1997). As larvas possuem um estilete posicionado na porção bucal com o qual penetram a parede celular das raízes das plantas, induzindo à formação de células gigantes a partir das quais alimentam-se (BRASS; VERONEZZE e PACHECO, 2008). A forma juvenil de segundo estágio (J2) é livre e se torna parasita obrigatório até alcançar a fase adulta na qual será hospedeiro de raízes de plantas (SHARON *et al.*, 2001).

Na região Oeste do Paraná as espécies de nematoides comumente encontradas são *Meloidogyne javanica*, *M. incognita*, *Heterodera glycines*, *Pratylenchus semipenetrans* e *Tubixaba tuxaua*. De acordo com Franzener *et al.* (2005), a presença de nematoides de galha na região Oeste do Paraná é ampla, salientando que esta região do estado corresponde à 20% da produção de grãos do mesmo. A frequente ocorrência dos nematoides de cisto e da galha no Oeste do Paraná evidencia uma urgente necessidade de estratégias de controle (FURLANETTO *et al.*, 2010).

## 1.2 PANAGRELLUS REDIVIVUS

Espécie de nematoide de forma livre que naturalmente preda diversos habitantes do solo, como fungos filamentosos e protozoários, sendo que as plantas não hospedam esta espécie, nem são fontes de sua nutrição. Sua forma adulta

atinge alguns milímetros de comprimento, sendo visíveis a olho nu (SRINIVASAN *et al.*, 2013).

Indivíduos de *P. redivivus* são comumente utilizados em testes *in vitro* para diversas finalidades, pois podem ser facilmente manipulados, multiplicados e mantidos em laboratório (CUNHA; OLIVEIRA e CAMPOS, 2003).

### 1.3 CONTROLE BIOLÓGICO

Não é argumento novo o fato de que o uso de produtos químicos apresenta várias inconveniências, como um grande espectro de ação capaz de desestabilizar o balanço ecológico do solo, a poluição do ambiente, os resultados inconstantes e a tendência de manifestar a expressão de resistência nos nematoides (HUANG *et al.*, 2004).

O controle biológico no Brasil ainda não é uma prática muito difundida entre os agricultores, embora existam muitos avanços na área, especialmente no controle altamente específico de insetos-praga nas culturas de cana-de-açúcar e de soja fomentado pela implementação do manejo integrado de pragas (SCOPEL; ROZA-GOMES, 2011).

Entende-se por controle biológico a redução da capacidade de sobrevivência e/ou de reprodução de um indivíduo através da ação de outro organismo vivo, denominado antagonista ou inimigo natural (VIGGIANO, 2011). Em teoria, esta alternativa de controle é segura, econômica e ecologicamente correta.

Existem vários tipos de inimigos naturais que atuam no controle biológico: os predadores, que tendem a comer suas presas; os parasitas, que vive sobre o hospedeiro ou dentro dele; os parasitoides, geralmente menores que seu hospedeiro que depois de internamente infectado morre, e, ainda, os inimigos entomopatogênicos, uma gama variada de seres que controlam insetos (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Regina e Carneiro (1992), caracterizam um bom agente de controle biológico como aquele que apresenta habilidade de sobrevivência saprofítica, rápida colonização no solo para ter sucesso na competição com outros microrganismos, persistência, virulência, nível de controle compatível com o nível de dano, baixo custo e segurança quanto aos aspectos tóxicos.

São inúmeros os agentes que atuam naturalmente nos ecossistemas no controle biológico, como fungos, bactérias, nematoides predadores, protozoários, ácaros, entre outros. Dentre estes, os fungos correspondem a 76% das pesquisas realizadas mundialmente (CARNEIRO, 1992; CARDOSO, 2007).

As técnicas de controle biológico são: a Clássica, que consiste na introdução de um antagonista exótico no sistema em questão; a Aumentativa, para o qual são introduzidos inimigos naturais que ocorrem espontaneamente na área em questão, mas que não tem condições de se manter nela durante o ano todo, e a Conservativa, onde o ambiente é alterado a fim de beneficiar a população de antagonistas introduzida (BASTOS; TORRES, 2005).

Para Magro e Parra (2006), os empecilhos na estabilização de um programa de controle biológico em novas situações se devem, em parte, à tradição do controle de pragas via produtos químicos, à baixa credibilidade numa tecnologia de substituição, ao manuseio e disponibilidade de insumo biológico e ao desconhecimento das práticas de aplicação, como época, técnica e dose. Ainda tem-se os problemas mercadológicos como a estocagem e viabilidade no solo (FARIA; MAGALHAES, 2001), pois, recomenda-se o uso de biopesticida em no máximo 30 dias após sua fabricação, e uma vez introduzido no solo, o pico de atividade do fungo abrange de 12 a 15 dias (SIDDIQUI; MAHMOOD, 1996).

Os fungos nematófagos representam uma solução conveniente de proteção de culturas (TRANIER *et al.*, 2014) e segundo a recente notícia de 2014, o Brasil tem oportunidade de reduzir a utilização de agroquímicos em função da riqueza de biodiversidade que possui, mesmo ainda pouco explorada. Na opinião de especialistas, o país passa pelo momento mais oportuno para a adoção de técnicas de controle biológico (REYNOL, 2014).

#### 1.4 CONTROLE BIOLÓGICO DE NEMATOIDES

As técnicas de controle de nematoides hoje empregadas na agricultura consistem basicamente na rotação de culturas e na utilização de cultivares com algum grau de resistência em sistemas de sucessão anual de culturas. Entretanto é necessário conhecimento sobre quais plantas utilizar e para quais espécies de

nematoides haverá redução populacional. O milho, por exemplo, pode hospedar muitas espécies que atacam a soja posteriormente (BRAGA, 2010).

Outras técnicas como o alqueive e a solarização são inapropriadas na maioria dos sistemas de cultivo, especialmente o de monoculturas, devido ao tempo de execução, grande necessidade de mão-de-obra e, para o caso de solarização que envolve o intenso revolvimento do solo, esbarra-se nos princípios de manejo e conservação do solo (ALCÂNTARA; MADEIRA, 2008).

A técnica de prevenção deve ser priorizada, a fim de evitar a entrada de novas espécies ou raças de fitonematoides. O uso de plantas antagonistas, como crotalárias é também eficiente, pois tais plantas permitem que os nematoides a invadam, porém seu ciclo é interrompido antes da fase adulta, impedindo sua reprodução (PINHEIRO *et al.*, 2013).

Os solos da região oeste do Paraná são predominantemente argilosos (LIMA *et al.*, 2012) e, segundo Braga (2010), esta condição aliada a uma boa distribuição de chuvas e a um alto teor de matéria orgânica do solo tende a mascarar o ataque de fitonematoides às plantas, uma vez que os sintomas apresentados pela planta não ficam tão evidentes. Tal fato dificulta o controle.

De acordo com Inomoto e Asmus (2006), os produtores podem levar um tempo relativamente grande para perceber a presença de fitonematoides em sua área, por falta de monitoramento constante, baixa expressividade de sintomas (especialmente no início de disseminação de populações) ou por outros fatores.

Para diversas culturas agrícolas o uso de nematicidas é considerado não econômico e até mesmo inviável, especialmente quando se refere aos nematoides de galhas e de cistos que se alojam dentro dos tecidos da planta, dificultando qualquer contato e controle (PEREIRA *et al.*, 2005), além de causar contaminação do meio ambiente e eventualmente à saúde humana (PROITE, 2007). Neste contexto, a adoção de práticas de controle biológico ganha espaço.

A utilização de fungos, apesar das dificuldades atuais, teoricamente supera o uso de agroquímicos, pois pode controlar nematoides protegidos por galhas e cistos e, por se tratar de um ser vivo está sempre em constante adaptação de modo que se o nematoide evoluir a ponto de manifestar alguma “resistência” o fungo poderá adaptar-se em função disto (HUANG *et al.*, 2004).

Gottems (2015), divulga os estudos realizados por Artur Junior e apresentada pela Simbiose Agro que revelam a eficiência comprovada do agente de controle biológico, a bactéria *Bacillus amyloliquefaciens* contra os nematoides *P. brachyurus* e *M. javanica*. O produto sintetizado de nome NemaControl® pode ser inoculado na semente ou aplicado via sulco de plantio onde irá colonizar o sistema radicular, sítio onde as bactérias poderão nutrir-se dos exsudatos da planta. Tal bactéria produz uma variedade de toxinas e antibióticos liberados no solo que possibilitam a formação de uma capa protetora ao redor do sistema radicular (informação verbal<sup>1</sup>). Isto representa o atual e crescente direcionamento da pesquisa para o controle biológico no Brasil.

## 1.5 FUNGOS NEMATÓFAGOS

Os fungos nematófagos são classificados de acordo com sua habilidade de controlar os nematoides. Existem aqueles que formam estruturas de aprisionamento ou armadilhas e outros que parasitam ovos e os chamados fungos endoparasitas que penetram o corpo do nematoide e consomem seu conteúdo interno (CARDOSO, 2007). Por vezes são capazes de produzir substâncias que atuam indiretamente no controle destes, através de repulsão química ou por morte dos nematoides antes de sua colonização (CHEN *et al.*, 2000).

No caso dos endoparasitas, entende-se que, possivelmente os nematoides irão se aderir às hifas fúngicas presentes no solo, de modo que, quanto mais o fungo crescer maior será a probabilidade de os nematoides entrarem em contato com suas hifas (SOARES, 2008; MARTINELLI, 2012).

Os fungos nematófagos estão bem distribuídos em várias regiões do país. Os fungos endoparasitas possuem maior facilidade de se estabelecer no solo, especialmente por suas habilidades saprofíticas. Também são mais promissores, pois capturam os nematoides através de hifas modificadas em armadilhas, adesivas ou não, que imobilizam os vermes. Na sequência, as hifas penetram a

---

<sup>1</sup> GOTTEMS, L. **Simbiose Agro apresenta NemaControl no Show Safra 2015**. 2015. Disponível em: <<http://www.agrolink.com.br/noticias/NoticiaDetalhe.aspx?codNoticia=215790>> Acesso em: 17 de nov. 2015.

cutícula corporal, colonizam e nutrem-se do conteúdo interno dos nematoides (NORDBRING-HERTZ, 1972), emitindo para o meio externo as suas estruturas vegetativas e reprodutivas (BARRON, 1977; GRAY, 1987).

Segundo Tranier *et al.* (2014), fungos filamentosos podem desempenhar uma importante função no controle de fitonematoides de interesse agrícola, uma vez que podem ser endoparasitas capazes de alcançar nematoides de galha e de cistos abrigados no interior da planta.

O primeiro fungo nematófago relatado na literatura é o *Arthrobotrys oligospora*, um saprófita (SILVEIRA, 2013). Desde então outros experimentos foram estabelecidos com o propósito de controlar nematoides utilizando fungos nematófagos. No Havaí em 1939, foi testada a eficácia de *A. oligospora* contra *Meloidogyne* spp. no cultivo de abacaxi. Com o decorrer do tempo inúmeras espécies de fungos foram identificadas como eficientes para o papel de controle biológico. No Brasil, as primeiras evidências ocorreram em 1981, trabalhos realizados por Alcântara e Azevedo (LOPES, 2007; MARTINELLI, 2008).

As estruturas fúngicas geralmente são formadas em resposta a estímulos externos, como ao estresse fisiológico, a presença de nematoides e o chamado ritmo endógeno, segundo o qual as hifas vegetativas, naturalmente ao crescerem, estão predispostas à produção dessas armadilhas (NORDBRING-HERTZ, 1972).

Segundo Maia (2000) e Soares e Santos (2006) são conhecidos várias formas de armadilhas, tais como, redes adesivas tridimensionais, redes adesivas bidimensionais, nódulos adesivos, ramos adesivos, anéis constritores formados por três células dilatadoras que estrangulam o nematoide, anéis não constritores e hifas adesivas não modificadas, que apenas se aderem ao corpo dos vermes.

Os fungos nematófagos podem produzir algumas enzimas ou compostos durante seu ato de predação. É possível extrair, isolar e identificar substâncias químicas produzidas pelos fungos nematófagos, pois estas possuem propriedade nematicidas (CHEN *et al.*, 2000).

## 1.6 O GÊNERO *HOHENBUEHELIA*

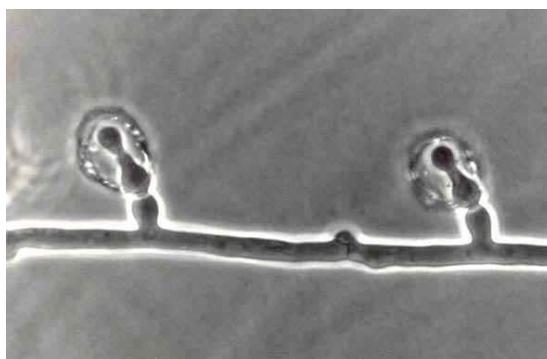
Dos fungos agaricoides, as espécies do gênero *Hohenbuehelia* são pouco estudadas. Esses organismos produzem em sua fase sexuada basidiomas

pequenos, píleo com superfície gelatinosa e himenóforo lamelado. Com hábito pleurotoide, alguns possuem um pseudoestípite, ou ainda raros possuem estípite lateral, excêntrico ou central (BAS *et al.*, 1995). A coloração pode variar entre branco e preto, alguns ainda podendo ser pigmentados. Crescem geralmente em madeira, porem há registro de espécies terrícolas e gramículas. Microscopicamente são caracterizados pelo contexto gelatinoso, hifas e esporos inamiloides, presença de fíbulas (PUTZKE; CAVALCANTI, 1995).

Este gênero possui ampla distribuição, ocorrendo em todos os continentes e contempla espécies comestíveis, com importância ecológica na decomposição de madeiras, nematófagas e produtoras de antibióticos (THORN; BARRON, 1986; PUTZKE E CAVALCANTI, 1995). Já no Brasil existem poucos registros, ocorrendo na Amazônia e Mata Atlântica e nos estados do Rio Grande do Sul, Paraná, São Paulo, Amazonas, Rondônia, Minas Gerais e Rio de Janeiro (CAPELARI; MAZIERO, 1988; SINGER, 1989; PEGLER, 1989; MEIJER 2006; MAIA *et al.*, 2015; PUTZKE; CAVALCANTI, 1995; CORNER, 1994), isto é devido à pouca investigação sobre o gênero no país.

Barron e Dierkes (1977) comprovaram a correspondência taxonômica de *Hohenbuehelia* (fase sexual) ao *Nematoctonus* (fase assexual). Segundo eles, quando as hifas se desenvolvem são capazes de produzir uma estrutura em forma de vidro de relógio envolta em muco que se adere ao corpo do nematoide e impede seus movimentos (FIGURA 1).

FIGURA 1: CÉLULAS ADESIVAS E FÍBULA (BARRON E DIERKES, 1977)



A comprovação da correspondência sexual ocorreu quando um isolado puro produziu um corpo de frutificação em meio de cultura na presença de nematoides

(THORN; BARRON, 1986). De acordo com eles, espécies de *Nematoctonus* possuem poucas características úteis para sua identificação, das quais a forma e tamanho de esporos são as mais relevantes. Seu trabalho aqui citado fornece uma chave taxonômica destas espécies.

A presença de grampos de conexão ou fíbulas identificam a espécie como pertencente ao filo *Basidiomycota*. Porém, tanto o gênero *Pleurotus* como o *Nematoctonus* apresentam tal fíbula, bem como característica ressupinada, o que tende a causar confusão. Ambos os gêneros contem espécies de fungos saprófitos que se desenvolvem em madeira em estado de alta decomposição. O que difere ambos é a presença gelatinosa no contexto (KOZIAK *et al.*, 2007) e metuloides, além da habilidade nematófaga comprovada em *Nematoctonus*. Barron (2003), diz que dentre os fungos predadores apenas *Nematoctonus* possui conexões em forma de braçadeira dispersas ao longo da hifa.

Burzynski *et al.* (2014), verificaram que tanto o gênero *Pleurotus* quanto *Hohenbuehelia* são capazes de predação e consumir nematoides.

Devido à similaridade, Barron (2003) testou espécies de ambos os gêneros e percebeu um padrão de comportamento entre eles, de modo que as espécies de *Pleurotus* produzem gotículas nematostática, mas não matam os nematoides, enquanto as espécies de *Hohenbuehelia* formam hifas adesivas especializadas na captura destes. Putzke *et al.* (2007), dizem que a formação destas estruturas especializadas é exclusividade do gênero *Hohenbuehelia*. Entretanto, Barron (2003), demonstra que estruturas semelhantes ocorrem em outros gêneros de fungos, como em micélio de *Conocybe lactea*.

Em função da similaridade morfológica dos gêneros *Pleurotus* e *Nematoctonus*, Koziak *et al.* (2007), dizem que vários trabalhos de Thorn e Barron fundamentaram o posicionamento de ambos na família Pleurotaceae.

Thorn e Barron (1986), dizem que quando estas espécies cultivadas *in vitro* alteram a coloração do meio de cultura para amarelo, vermelho ou marrom podem estar produzindo antibióticos ou outros metabólicos.

Os fungos podem apresentar diversas estratégias na imobilização, penetração e consumo dos nematoides. O gênero *Nematoctonus* desenvolve um elaborado sistema de hifas com torções nas porções terminais, bem como presença de gotículas às quais os vermes se fixam, sendo na sequência imobilizados e então

penetrados pelas hifas de forma direta ou através de orifícios (Koziak *et al.*, 2007). Além disto, de acordo com Carroll e Wicklow (1992), algumas espécies possuem esporos adesivos com potencial de imobilização.

As observações de Barron (2003), revelaram a produção ligninases e celulases, principais enzimas envolvidas na decomposição de madeira. Assim, o autor sugere que *Hohenbuehelia* é essencialmente um decompositor de madeira que desenvolveu a capacidade de captura de nematoides como um suplemento nutricional, e que o hábito predatório que tem atraído tanta atenção é uma capacidade secundária. Isto ocorre possivelmente por causa da relação carbono-nitrogênio (C:N) requerida para o crescimento do fungo. Sabendo-se que a proporção de carbono em madeiras é muito superior a de nitrogênio e que sem este último é impossível realizar decomposição, os nematoides atuam como fonte secundária na nutrição do fungo.

Estudos de Koziak *et al.* (2007), revelam a existência de dez espécies predadoras e cinco espécies parasitoides do gênero *Nematoctonus*. São reconhecidas atualmente 108 espécies deste gênero, das quais *H. atrocoerulea*, *H. grisea*, *H. portegna*, *H. petaloides*, *H. paraguayensis* e *H. mastrucata* são destacadas por possuírem habilidade positiva na predação de nematoides (THORN E BARRON, 1984).

## 1.7 CULTIVO *IN VITRO*

Dhingra e Sinclair (1995) fazem diversas colocações sobre o cultivo de fungos em meio artificial. Segundo eles, após várias transferências do fungo em meio artificial há uma tendência de redução de sua virulência e/ou esporulação; a produção de esporos geralmente ocorre quando o fungo está presente num meio de cultura adverso ao crescimento vegetativo; fungos saprófitos apresentam menor exatidão quanto aos seus requerimentos nutricionais quando comparados com fungos patogênicos, assim, para muitos fungos um ágar simples não impulsiona sua frutificação. Neste caso a confecção de meios naturais através da adição de substratos proporcionam mais facilmente a esporulação.

## 2 OBJETIVO GERAL

Avaliar a capacidade de predação *in vitro* de espécies do gênero *Hohenbuehelia* contra nematoides da espécie *Panagrellus redivivus*.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o efeito do crescimento micelial na presença e ausência de nematoides;

Avaliar o tipo de predação;

Avaliar a porcentagem de predação de espécies do gênero *Hohenbuehelia*;

Avaliar o fator de mortalidade em *Panagrellus redivivus* em função de espécies do gênero *Hohenbuehelia*;

## 3 METODOLOGIA

### 3.1 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DE *HOHENBUEHELIA* SPP

Inúmeras coletas foram realizadas na região Oeste do Paraná, especialmente no fragmento de Floresta Estacional Semidecidual do Parque Estadual de São Camilo (PESC), unidade de conservação (UC) pertencente ao município de Palotina, cujas coordenadas são 24°18'52.49"S; 53°54'50.51"O.

Seguidas as coletas, o material fresco foi submetido a análises macro e microscópicas no Laboratório de Taxonomia de Criptógamas e Fungos da Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina. A partir das análises do basidioma, as espécies foram identificadas conforme padrões morfológicos descritos na literatura, como em Largent (1986) e a nomenclatura das cores foi baseada em Kornerup e Wanscher (1978). As características de cor, forma e tamanho foram avaliadas com o material ainda fresco, pois a secagem do mesmo as alterariam.

As análises microscópicas foram realizadas através de secções do basidioma. Para reidratação e visualização de microestruturas, foram montadas

lâminas com KOH e vermelho congo (LARGENT, 1986). A descrição microscópica considerou a dimensão das hifas e de estruturas como basidiósporos, basídios, metuloides e cistídios. Para a montagem de pranchas fotográficas foi utilizado o sistema de captura de imagens do programa Toup View® adaptado ao microscópio óptico. A identificação do espécime foi feita com auxílio de literatura especializada, como Putzke e Cavalcanti (1995), que anteriormente descreveram espécies pertencentes a este gênero. Cada espécime coletado foi desidratado e preservado, enrolados em papel alumínio e dispostos dentro de envelopes contendo naftalina. Na sequência foram tombados no Herbário do *Campus* Palotina (HCP).

### 3.2 ISOLAMENTO E MANUTENÇÃO DE *HOHENBUEHELIA* SPP

Após a coleta, uma parte dos espécimes de *Hohenbuehelia* foi isolado em meio de cultura BDA (Batata, Dextrose, Agar). O meio de cultivo foi diluído na proporção de 20 gramas para 500 mL de água destilada, autoclavado a 120°C e 1 atm de pressão. A ele foram adicionados 0,1 g de antibiótico (estreptomicina + penicilina), para então ser vertido em placas de Petri dentro de Câmara de Fluxo Laminar previamente esterilizada. Quando o meio resfriou e solidificou, pedaços do contexto do basidioma dos espécimes foram adicionados a ele. Anteriormente, o basidioma foi submetido a variadas metodologias de purificação, sendo a metodologia mais eficiente a de 30 segundos de lavagem em álcool (70%), 3-5 minutos de lavagem em hipoclorito de sódio (1%) e três lavagens em água destilada autoclavada, realizado em Câmara de Fluxo Laminar esterilizada (BERGAMIN FILHO *et al.*, 2011). Cada metodologia foi detalhadamente descrita e as placas identificadas com o código de cada espécime, também receberam um código para a metodologia de purificação. Decorrido 15 meses, um total de dez isolados puros foram obtidos.

As placas contendo os espécimes foram preservadas em estufa BOD (body oxygen demand), em condição de escuro e a 25°C para posteriores observações morfológicas. Com o crescimento micelial, análises microscópicas foram realizadas, visando localizar hifas septadas contendo grampos de conexão ou fíbulas para legitimar a identificação da fase anamórfica, característica de Basidiomicota. Quando contaminações ocorriam, o intervalo do acompanhamento

do desenvolvimento micelial foi reduzido de 24 horas para 6 horas, com transferência do espécime para outra placa de BDA estéril até sua purificação. O tempo requerido para o desenvolvimento micelial variou entre os isolados.

Para manter a pureza e viabilidade dos isolados, seis discos de 5 mm de diâmetro de cada cultura foram armazenados em tubos de ensaio contendo água destilada e autoclavada (CASTELLANI, 1967). Este procedimento é de baixo custo e bastante eficaz (RODRIGUES *et al.*, 1992) e a matriz primária pode ter uma duração de até vinte anos após seu preparo sem perder suas características, podendo ainda ter seu crescimento estimulado quando renovado em meio de cultura (CAPRILES *et al.*, 1989). É importante manter os isolados em Castellani, pois com o passar do tempo o meio de cultivo em que está purificado perde água ao ponto de ressecar o isolado.

### 3.3 OBTENÇÃO E CONSERVAÇÃO DE *PANAGRELLUS REDIVIVUS*

Os nematoides da espécie *P. redivivus* foram comprados e multiplicados dentro de recipientes plásticos, aerados, contendo uma mistura simples de farinha de aveia e água destilada, mantidos em BOD à 25°C e renovada a população a cada duas semanas.

### 3.4 AVALIAÇÃO DA PREDACÃO *IN VITRO* DE *HOHENBUEHELIA* SPP

Após a purificação em BDA, cada espécime foi transferido para o centro de 8 placas de Petri, dividida em 4 quadrantes cada, contendo meio de cultura ágar-água (2%), meio menos nutritivo. Destas, 4 placas representaram a testemunha e 4 placas o tratamento de biocontrole. A testemunha foi cultivada a fim de comparar se as modificações morfológicas ocorreriam apenas na presença dos nematoides. Além disto, a velocidade de crescimento foi monitorada, podendo ser relacionada também com a presença e/ou ausência de nematoides na placa.

Os nematoides foram coletados do meio de cultivo em farinha de aveia. Sua obtenção ocorreu com a raspagem da lateral do recipiente que os alojava. Esta raspagem foi depositada em béquer contendo água destilada. Esperou-se um

tempo para que os nematoides se depositassem ao fundo do béquer, de modo que a água “suja” de farinha de aveia fosse removida com auxílio de uma pipeta de Pasteur. Novamente água destilada foi adicionada ao béquer e repetido o procedimento até obter água límpida. Então o conteúdo foi vertido em peneira de 63  $\mu\text{m}$  e os nematoides foram lavados com um pissete de água destilada e novamente coletados em béquer. Inicialmente, a quantidade de nematoide no béquer foi elevada, de modo que, o conteúdo foi dividido várias vezes até o ponto em que a coleta de 100 indivíduos pudesse ser obtida em 100  $\mu\text{L}$  de água, sendo esta apenas um veículo facilitador de sua adição às placas e um volume maior poderia interferir no processo de deslocamento dos nematoides. Foram realizadas dez contagens prévias a fim de estabelecer o número médio de nematoides adicionados.

As placas foram novamente incubadas em BOD em condições de escuro e temperatura de 25°C. As observações ocorreram diariamente a partir das primeiras 24 horas de interação fungo-nematoide com auxílio de lupa, microscópio e registros fotográficos.

Uma planilha de monitoramento foi elaborada para avaliar a predação *in vitro*. Esta planilha foi dividida em 3 dias de avaliação e cada dia abordava a predação por quadrante, separadamente, bem como o desenvolvimento micelial.

As análises estatísticas foram executadas pelo programa SISVAR® (FERREIRA, 2010) e revelam o desempenho de predação das espécies de *Hohenbuehelia*. Com o auxílio do programa ORIGIN 8.0® um gráfico foi criado para ilustrar esta comparação.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DE *HOHENBUEHELIA* SPP.

Durante 15 meses de trabalho 25 espécimes foram coletados e submetidos às tentativas de isolamento. Destes, 5 foram purificados.

Observou-se que este gênero requer longos períodos chuvosos com temperaturas amenas ou quentes, mas não frias, para a formação da estrutura de

reprodução sexual, o basidioma. Este, após formado, deve ser prontamente coletado, de preferência em dias chuvosos, pois sua exposição a uma queda de umidade relativa do ar induz ao ressecamento, mesmo que esta variação de umidade ocorra em 24 horas. Esta consideração foi possível, pois um dos espécimes desenvolveu-se sobre *Delonix regia*, conhecida como Flamboyant, no fragmento de Floresta Estacional Semidecidual, nas dependências da UFPR – Setor Palotina, privilegiando uma íntima observação.

A identificação das espécies coletadas seguiu as descrições feitas na literatura por um conjunto de poucos autores, priorizando àquelas de táxons identificados na América do Sul, como apresentado por Putzke e Cavalcanti (1995), no Rio Grande do Sul. Contudo, a apresentação destas espécies refere-se apenas a aspectos morfológicos, desprovida de informações sobre habilidade de predação de nematoides. Dentre as espécies coletadas, várias diferiram em alguns aspectos morfológicos daquelas já identificadas, o que sugere a descoberta de novas espécies.

As espécies escolhidas para o presente trabalho foram identificadas como sendo: Silva-Filho 436 *H. mastrucata*, Silva-Filho 528 *H. aff. bullulifera* Singer, Silva-Filho 581 *H. paraguayensis*, Silva-Filho 582 *Hohenbuehelia*. sp. e Silva-Filho 631 *H. portegna*.

O espécime Silva-Filho 582 não pôde ser identificado a nível de espécie em virtude da falta de esporos, estrutura indispensável para tal, sendo denominado como Silva-Filho 582 *H.* sp. Entretanto, em comparação com outras espécies coletadas, foi possível definir que não se trata de *H. mastrucata* ou de *H. paraguayensis*, pois não possui o mesmo padrão micromorfológico que estas, tendo quantidade superior de metuloides no píleo, diferente formato de queilocistídios e diferente espessura da parede do metuloide. Assim, novas coletas são necessárias para a identificação desta espécie.

Existe uma chave de identificação exclusiva para o grupo de espécies de *Hohenbuehelia* de coloração negra, cujas características envolvidas abordam basidiomas pequenos e escuros, lâminas escuras e metuloides geralmente com paredes amarronzadas (THORN; BARRON, 1986). A espécie negra utilizada neste trabalho não se enquadra perfeitamente àquelas identificadas na literatura, porém está muito próxima de *H. bullulifera* que tem como importante característica a

presença de pileocistídeo cilíndrico disperso e/ou vesiculoso pedicelado (SINGER; DIGILIO, 1951). O espécime Silva-Filho 528 apresentou basidioma de dimensão reduzida com formato fusiforme estrangulado, além de incrustações de cristais em alguns pileocistídeos que variam de claviforme a amplamente claviforme. Devido à similaridade entre ambos, este espécime foi denominado como Silva-Filho 528 *H. aff. bullulifera*, podendo se tratar de uma nova espécie.

#### 4.2 ISOLAMENTO E CRESCIMENTO DE *HOHENBUEHELIA* SPP.

Inúmeras tentativas de isolamento foram efetuadas, incluindo deposição direta do basidioma em BDA, dependendo da condição de limpeza do espécime coletado. Entretanto, não houve uma metodologia padrão para a realização do isolamento, pois este ocorreu tanto a partir de basidiomas frescos recém coletados, como de basidiomas desidratados, em função da data de coleta. Além disso, as amostras trazidas do campo apresentaram variado nível de contaminação com outros microrganismos que, durante o isolamento em meio de cultivo BDA se sobressaíram em relação à espécie desejada.

De modo geral, as espécies do gênero *Hohenbuehelia* demonstraram lentidão no processo de crescimento para o isolamento. Após a purificação em meio de cultivo, os espécimes revelaram tempo diferenciado para o desenvolvimento micelial para a adição de *P. redivivus* (Tabela 1).

TABELA 1: RELAÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL MÉDIO INICIAL (CM) COM O TEMPO EM DIAS PARA CADA ESPÉCIE DE *HOHENBUEHELIA*

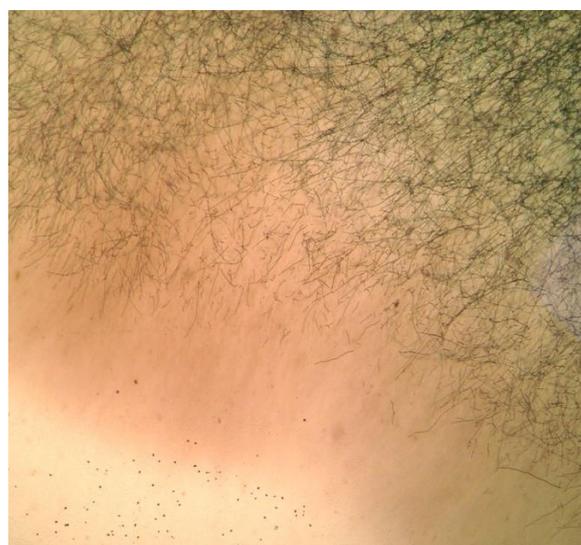
Espécie	Crescimento micelial médio inicial (cm)	Tempo (dias)
<i>H. mastrucata</i>	3.612	3
<i>H. aff. bullulifera</i>	0.931	32
<i>H. paraguayensis</i>	1.368	33
<i>H. sp.</i>	0.275	13
<i>H. portegna</i>	1.537	12

Analisando a tabela 1 é possível constatar que em termos de velocidade de crescimento e de expansão do micélio, *H. mastrucata* se sobressai. Quanto maior for o micélio e seu crescimento em menos tempo, mais nematoides podem ser predados em função da área mais abrangente. *H. portegna* permaneceu incubado 4 vezes mais dias que *H. mastrucata* e cresceu 2,3 vezes menos.

Considerando o ciclo de vida médio do gênero *Meloidogyne* no verão que é de 28 dias (GOMES; COFCEWICZ, 2005), as espécies *H. aff. bullulifera* e *H. paraguayensis*, nestas condições, apresentam atraso para o estabelecimento do micélio que além disto é reduzido.

O crescimento micelial da espécie *H. paraguayensis* foi marcado pela liberação prévia de compostos que tingiram o ágar de marrom claro (Figura 2).

FIGURA 2: LIBERAÇÃO DE COMPOSTOS EM MEIO ARTIFICIAL ÁGAR-ÁGUA (2%), ANTECEDENDO O CRESCIMENTO DE *H. PARAGUAYENSIS*. AUMENTO DE 40X.



O crescimento micelial variou não apenas na velocidade de expansão, como também na sua forma que foi tanto radial, plano, uniforme e branco (*H. mastrucata*); desuniforme, plano, irregular e branco (*H. portegna* e *H. sp.*); desuniforme, com protuberâncias, bordas onduladas com reentrâncias e branco (*H. paraguayensis*), como, desuniforme, com saliência, irregular e branco (*H. aff. bullulifera*) (Anexos). Além disto, apenas o micélio de *H. mastrucata* cobriu toda a superfície da placa, enquanto que para as demais espécies, o micélio não avançou mais que a metade da placa de Petri durante o período de avaliação.

Analisando a tabela 2 é possível concluir que a presença de nematoides não estimulou o desenvolvimento micelial de forma significativa para nenhuma espécie. Pelo contrário, a espécie *H. aff. bullulifera*, ao terceiro dia de análise, revelou crescimento reduzido na presença destes.

TABELA 2: MÉDIA DE CRESCIMENTO RADIAL DIÁRIO DE ESPÉCIES DE *HOHENBUEHELIA*, NA PRESENÇA (TRAT) OU AUSÊNCIA DE NEMATOIDES (TEST).

Dias	<i>H. mastrucata</i>		<i>H. aff. bullulifera</i>		<i>H. paraguayensis</i>		<i>H. sp.</i>		<i>H. portegna</i>	
	Trat	Test	Trat	Test	Trat	Test	Trat	Test	Trat	Test
1	3.61 eE	3.59 eE	0.93 aBCD	1.93 aCD	1.37 abcdABCD	1.73 cdCD	0.27 aA	0.34 aA	1.54 cdCD	1.45 bcdBCD
2	4.46 eE	4.50 eE	0.93 aABC	1.93 aCD	1.36 abcdABCD	1.74 cdCD	0.27 aA	0.34 aA	1.62 cdCD	1.56 bcdBCD
3	4.50 eE	4.50 eE	0.93 aABC	2.05 aD	1.33 abcdABCD	1.79 cdCD	0.32 aA	0.40 aAB	0.83 cdCD	1.83 bcdBCD

\*Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, minúsculas entre linha e maiúsculas entre colunas, pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Considerando o crescimento micelial entre os dias de avaliação, todas as espécies apresentaram a mesma proporção de expansão diariamente.

As espécies de maior e menor destaque para crescimento micelial foram *H. mastrucata* e *H. sp.*, respectivamente. As demais espécies não diferiram entre si para esta característica.

#### 4.2.1 Técnicas de isolamento

Como já explicado, a condição de limpeza de cada basidioma coletado e também a diferença do tempo de exposição ao ambiente de origem, resultou em variado desempenho de crescimento em meio de cultivo artificial. Desta forma, a metodologia comum de purificação de microrganismos “30 segundos de lavagem em álcool (70%), 3-5 minutos de lavagem em hipoclorito de sódio (1%) e três

lavagens em água destilada autoclavada, em Câmara de Fluxo Laminar esterilizada (BERGAMIN FILHO *et al.* 2011), foi eficiente apenas para algumas espécies, de tal modo que adaptações foram necessárias para outras. Todas as metodologias ocorreram dentro de Câmara de Fluxo Laminar esterilizada.

**Isolamento do espécime Silva-Filho 436 – *H. mastrucata*:** a partir do contexto fresco do basidiocarpo recém coletado, pedaços da lamela foram cortados em diminutas partes e adicionadas diretamente em BDA. Anteriormente, o basidioma foi submetido a análise em lupa e suas impurezas mais grosseiras foram removidas com auxílio de agulha. As áreas julgadas livres de impurezas foram utilizadas no processo de isolamento do espécime.

**Isolamento do espécime Silva-Filho 528 – *H. aff. bullulifera*:** o basidiocarpo passou por duas metodologias, sendo a) 30 segundos em álcool (70%), 5 minutos em hipoclorito de sódio (1%), 3 lavagens em água destilada autoclavada, submetidas a secagem em papel filtro esterilizado e b) 30 segundos em álcool (70%) seguido de cortes da lamela média com posterior adição em BDA. Apenas a segunda metodologia foi positiva.

**Isolamento dos espécimes Silva-Filho 581 – *H. paraguayensis* e Silva-Filho 582 – *H. sp.*:** o basidiocarpo foi submetido a duas metodologias, sendo, a) 30 segundos em álcool (70%), 5 minutos em hipoclorito de sódio (1%), sem nenhuma lavagem em água e b) 30 segundos em álcool (70%), 5 minutos em hipoclorito de sódio (1%) e apenas uma lavagem em água destilada autoclavada. Pequenos pedaços do contexto central foram repicados em 5 placas de BDA para cada metodologia. Para ambos, a segunda metodologia sucedeu. Em função da economia de meio de cultivo, cada placa recebeu diversos pedaços posicionados distantes um do outro e, assim que um deles manifestou crescimento micelial, foi então isolado em placa individual.

**Isolamento do espécime Silva-Filho 631 – *H. portegna*:** para este espécime pouco material foi encontrado e estava altamente contaminado, sendo submetido a três formas de limpeza: a) de 30 segundos em álcool (70%), 3 minutos em hipoclorito de sódio (1%) e 3 lavagens em água destilada autoclavada; b) hidratação por 3 segundos em água destilada autoclavada e transferência direta para BDA; e c) 1 minuto em hipoclorito de sódio (1%) e uma lavagem por 2 segundos em água destilada autoclavada. Apenas este último sucedeu.

Cada espécime recebeu um código numérico de coleta e após as tentativas de isolamento, recebeu também letras referentes às metodologias empregadas.

O momento ideal de purificação inicia com a adequada coleta, preferencialmente sob condição de alta umidade e quando o basidiocarpo formado possui tamanho mediano, sem ser muito pequeno (exceção para algumas espécies) pelo menor número de hifas disponíveis, nem muito grande, pela grande quantidade de contaminação que pode conter.

A melhor forma de isolamento se dá a partir do basidioma fresco e livre de impurezas, de preferência no mesmo dia da coleta. É válido ressaltar que faltam estudos que avaliem a constante térmica para determinar a temperatura ideal que otimiza o cultivo e crescimento de fungos basidiomicetos (FREITAS, 2010).

#### 4.3 AVALIAÇÃO DA PREDACÃO *IN VITRO* DE *HOHENBUEHELIA* SPP

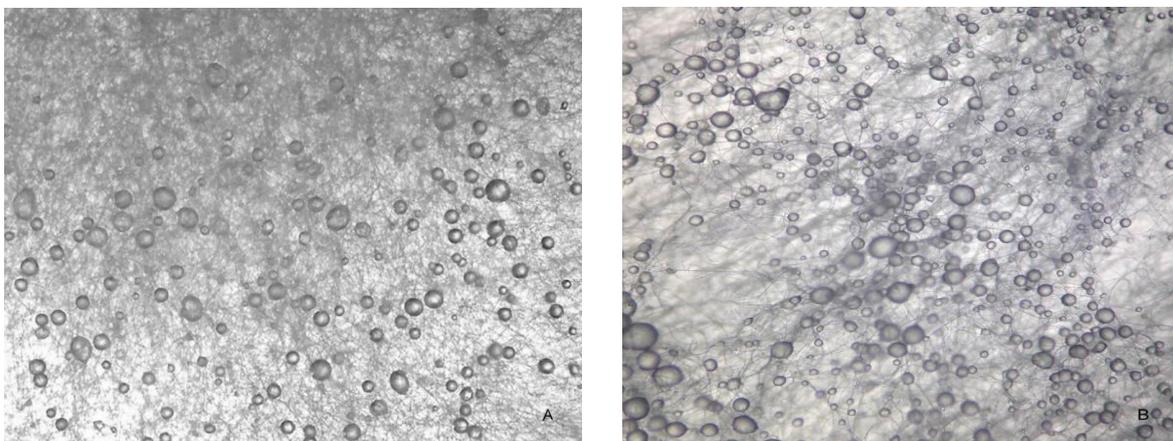
O uso de controle biológico por fungos nematófagos vem se tornando uma atividade promissora. Porém, existem pouquíssimos trabalhos referentes ao potencial de controle de espécies de *Hohenbuehelia* (anamorfo *Nematoctonus*) contra fitonematoides. Thorn e Barron (1986), Barron (2003) e Putzke *et al.* (2007), relatam os principais trabalhos realizados para esse gênero.

Outras espécies nematófagas são abordadas na literatura, como os estudos de Siddiqui e Mahmood (1996) avaliando *Paecilomyces lilacinus* no papel de controle biológico de nematoides. Entretanto, este fungo pode afetar negativamente a saúde de animais e do homem. Por sua vez, o gênero *Hohenbuehelia* não possui relatos de sobrevivência alternativa em animais no meio em que ocorre.

A semelhança morfológica entre o gênero *Pleurotus* e *Hohenbuehelia* pode conduzir a dúvidas nas avaliações dos testes de predação *in vitro*. Contudo, Barron (2003), testou espécies de ambos os gêneros e percebeu um padrão de comportamento entre eles, de modo que as espécies de *Pleurotus* produzem gotículas tóxicas não específicas que imobilizam os nematoides, enquanto as espécies de *Hohenbuehelia* formam hifas adesivas especializadas na captura destes. Entretanto, Putzke *et al.* (2007), levantam a possibilidade da fase anamórfica de *Hohenbuehelia* (*Nematoctonus*) também produzir toxinas. A figura 3

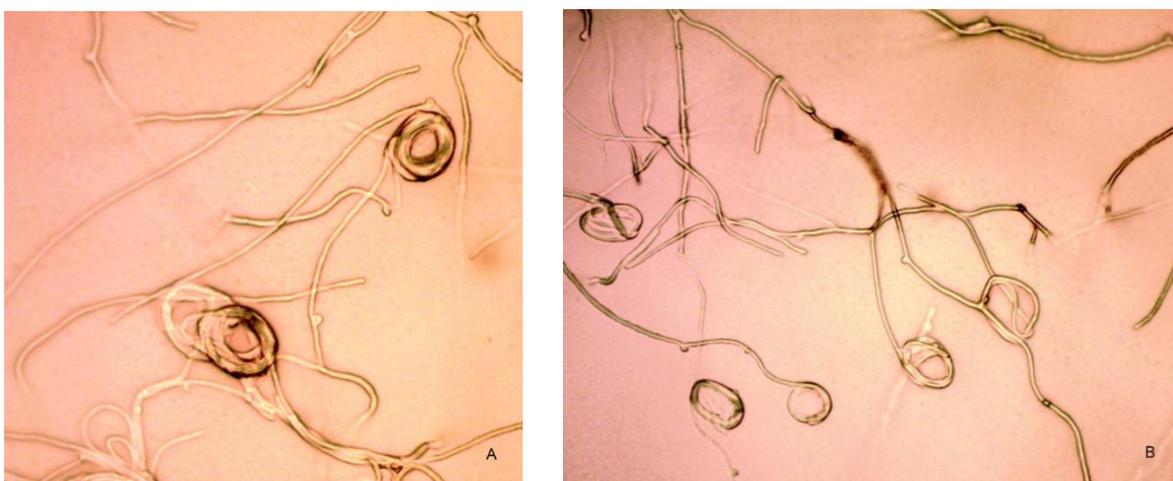
mostra a produção de gotículas não identificadas, podendo se tratar de toxinas ou substâncias de imobilização.

FIGURA 3: FORMAÇÃO DE GOTÍCULAS EM CULTURAS DE *H. PARAGUAYENSIS* (A) E *H. PORTEGNA* (B). AUMENTO DE 100X.



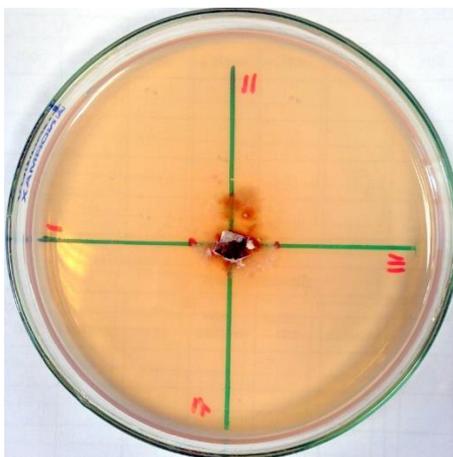
As placas testemunhas deste trabalho surtiram resultados coerentes com a colocação de Cardoso (2007), que diz que o processo de formação das armadilhas (Figura 4) é provocado, também, por condições de estresse fisiológico devido à escassez de nutrientes e água e não somente pelo estímulo resultante da interação fungo-nematoide. O estresse fisiológico causado pela troca de meios de cultivo resultou em crescimento micelial reduzido em ágar água.

FIGURA 4: ALÇAS FORMADAS POR *H. AFF. BULLULIFERA* NA AUSÊNCIA DE NEMATOIDES (A) E NA PRESENÇA DESTES (B) AUMENTO DE 400X.



Amorim e Pascholati (2011), em seus estudos com agentes fitopatogênicos defendem a ideia de que existe uma influência de tatismo e tropismo que provoca crescimento ou movimentação direcionada de microrganismos, causados por estímulos diversos, como resposta química ou topografia de superfície, por exemplo. Apesar do gênero *Hohenbuehelia* não conter agentes fitopatogênicos, foi constatada a liberação de uma ou mais substâncias em meio artificial (Figura 5), cuja atividade e função permanecem desconhecidas, bem como a natureza química de tais compostos. Todavia, é coerente supor que estas substâncias interferem na interação entre o fungo e o nematoide.

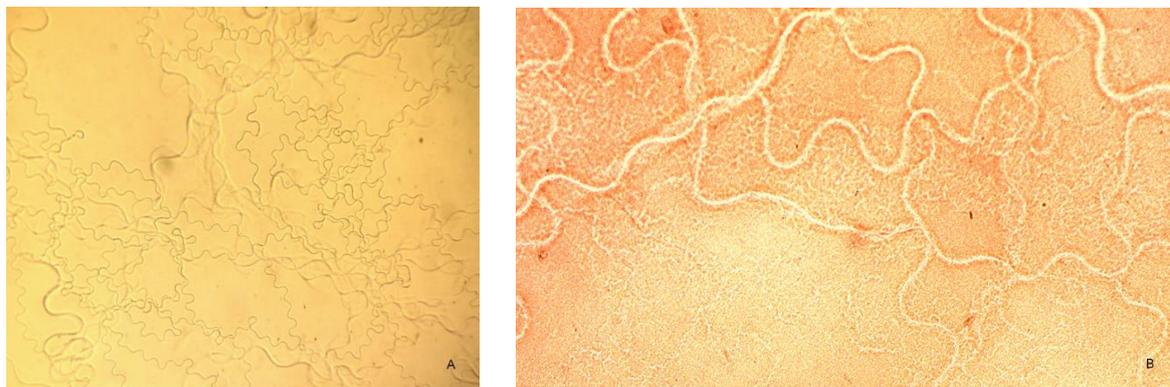
FIGURA 5: LIBERAÇÃO DE SUBSTÂNCIA(S) POR *H. AFF. BULLULIFERA* EM MEIO ARTIFICIAL ÁGAR-ÁGUA (2%).



A espécie *H. portegna* liberou substâncias transparentes após sua transferência de BDA para ágar-água, o que coincidiu com a imobilidade dos nematoides sobre suas hifas e seu alto índice de predação em 24 horas. As demais espécies, sob as mesmas condições, permitiram a livre movimentação ondulatória dos nematoides por toda placa (Figura 6 A-B). Além disto, diferentemente das outras espécies, as contaminações oriundas do meio de cultivo de nematoides e trazidas por estes, não contaminaram o micélio de *H. portegna*, sugerindo habilidade inibitória/antibiótica. A espécie *H. aff. bullulifera*, por sua vez, mesmo apresentando desenvolvimento micelial médio de apenas 0,931 cm no terceiro e último dia de avaliação, foi capaz de liberar substância(s) de coloração lilás (Figura 5), que tingiu todo o ágar, podendo representar uma possível repulsão de

nematoides. Pertinente lembrar que seu desenvolvimento micelial durou 32 dias, tempo suficiente para corar todo o ágar.

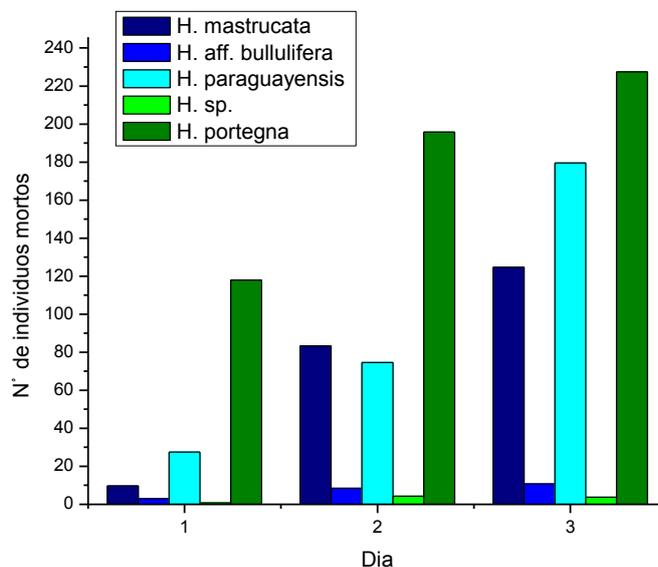
FIGURA 6: MOVIMENTO ONDULATÓRIO DE NEMATOIDES EM MEIO ARTIFICIAL DE ÁGAR ÁGUA (2%) COM AS ESPÉCIES *H. SP.* (A). AUMENTO 40X E *H. AFF. BULLULIFERA* (B). AUMENTO DE 100X.



Segundo Huang *et al.* (2004), o processo de captura envolve basicamente a imobilização, penetração e nutrição a partir do nematoide. Para tal a formação prévia de armadilhas (Figura 4) e crescimento micelial deve necessariamente ocorrer (MANKAU, 1980). Dentre as espécies, a formação de alças se deu em maior ou menor quantidade, com maior ocorrência para *H. aff. bullulifera* e menor para *H. paraguayensis*.

Observou-se neste trabalho que diferentes isolados fúngicos de um mesmo gênero apresentam variada eficiência de redução de nematoides, assim como observado por Nunes *et al.* (2010), no estudo com o gênero *Paecilomyces*.

O gráfico 1 revela o número absoluto de nematoides mortos contados e mostra que a espécie *H. portegna* apresentou maior eficiência de predação em todos os dias de avaliação, destacando-se das demais a partir do primeiro dia.

GRÁFICO 1: NÚMERO DE NEMATOIDES PREDADOS POR *HOHENBUEHELIA* SPP

A tabela 3 mostra a porcentagem de predação de nematoides para cada espécie de *Hohenbuehelia*.

TABELA 3: PORCENTAGEM DE PREDACÃO DE NEMATOIDES POR *HOHENBUEHELIA* SPP.

Dia	<i>H. mastrucata</i>	<i>H. portegna</i>	<i>H. paraguayensis</i>	<i>H. sp.</i>	<i>H. aff. bullulifera</i>
Porcentagem de predação					
0	0	0	0	0	0
1	10	118	28	0,8	3
2	72	196	71	4	9
3	125	228	180	4	11

Putzke *et al.* (2007), observaram no teste de controle *in vitro* de *M. javanica* que a espécie *H. portegna* imobilizou e consumiu 39,44% da população no quinto dia. No presente estudo a redução foi superior a 100% ao primeiro dia. Isto indica que não há restrição quanto à espécie de nematoide a ser predada, mas que há um maior ou menor grau de afinidade química por eles.

Castro *et al.* (2000), testaram, *in vitro*, a capacidade de predação de *Arthrobotrys musiformis* sobre *M. incognita*. O resultado demonstrou predação de 53% dos juvenis predados ao sexto dia de avaliação. *H. portegna*, *H. mastrucata* e *H. paraguayensis* apresentaram índices superiores a este, ao segundo dia de

avaliação. Além disto, as espécies deste estudo predaram tanto juvenis quanto adultos.

Maia (2000), obteve um isolado de *Monacrosporium robustum*, cuja predação a juvenis de segundo estágio de *M. incognita* foi de 100% no primeiro dia após sua adição à cultura do fungo. Maia *et al.* (2001), verificaram que o mesmo fungo capturou 100% das formas ativas dos juvenis de *Heterodora glycines* após 24 horas do início da incubação. Bernardo e Santos (2004), constataram que o mesmo fungo predou 100% de *R. reniformis* após 3 dias da adição do nematoide às culturas do fungo. A atividade deste agente se compara a eficiência de *H. portegna* que supera 100% de predação em 24 horas de interação com *P. redivivus*.

Apesar de *H. mastrucata* e *H. paraguayensis* terem controlado 100% da população inicial adicionada (Tabela 3), a tabela 4 revela predação significativa apenas a partir do segundo dia. Por outro lado, *H. portegna* controlou mais de 100 indivíduos em 24 horas, com predação significativa já no primeiro dia de avaliação.

TABELA 4: PREDAÇÃO DE NEMATOIDES POR *HOHENBUEHELIA* SPP.

Dias	<i>H. mastrucata</i>	<i>H. portegna</i>	<i>H. paraguayensis</i>	<i>H. sp.</i>	<i>H. aff. bullulifera</i>
0	0.000 aA	0.000 aA	0.000 aA	0.000 aA	0.000 aA
1	1.537 bA	5.390 bB	2.607 bA	0.217 abA	1.683 abA
2	4.534 cB	6.983 cC	4.187 cB	0.889 bcA	2.730 bA
3	5.497 cB	7.527 cC	6.653 dB	0.922 cA	3.130 bA

\*Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, minúsculas entre linha e maiúsculas entre colunas, pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

É válido ressaltar que, apesar das 10 contagens prévias que antecederam a adição de nematoides às placas, não é possível afirmar que o número de nematoides adicionados tenha sido exatamente 100 para todas as espécies. Assim, analisando o número absoluto de nematoides predados no primeiro dia por *H. portegna* (Gráfico 1), é nítido que esta espécie recebeu um número superior de indivíduos, implicando numa reprodução mais acentuada, superestimando seu potencial. Sua reação à presença de nematoides e velocidade de imobilização é surpreendente.

Todas as espécies permitiram a reprodução da população de nematoides durante o período de avaliação.

A tabela 4 evidencia que todas as espécies apresentaram diferença significativa entre o primeiro e segundo dia de avaliação e apenas *H. paraguayensis* apresentou uma grande variação entre o segundo e terceiro dia. Estatisticamente, *H. portegna* destacou-se das demais espécies, obtendo os melhores níveis de predação desde o primeiro ao último dia. *H. mastrucata* e *H. paraguayensis* não diferiram entre si, bem como *Hohenbuehelia*. sp. e *H. aff. bullulifera* entre si.

A tabela 4 aborda a predação em dados acumulativos entre os dias, não permitindo uma interpretação do desempenho diário de cada espécie.

Para corrigir este efeito foi realizado o teste de média do fator de mortalidade (Tabela 5), através do qual encontrou-se um ótimo em termos de eficiência de predação.

TABELA 5: FATOR DE MORTALIDADE PARA *HOHENBUEHELIA* SPP

Tratamentos	<i>H. mastrucata</i>	<i>H. paraguayensis</i>	<i>H. portegna</i>	<i>H. sp.</i>	<i>H. aff. bullulifera</i>
0	0.00 aA	0.00 aA	0.00 aA	0.00 aA	0.00 aA
1	0.00 aA	0.00 aA	0.00 aA	0.00 aA	0.00 aA
2	9.40 bB	1.58 bA	1.07 bA	0.38 abA	1.16 bA
3	1.60 aA	1.61 bA	1.30 cA	1.14 bA	1.66 bA

\*Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, minúsculas entre linha e maiúsculas entre colunas, pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

*Hohenbuehelia mastrucata* obteve um pico de predação ao segundo dia, a partir do qual reduziu seu nível. Isto pode ser devido ao fato de a população ter se reproduzido menos, por ter sobrado menos indivíduos livres na placa, uma vez que esta espécie desintegra rapidamente o corpo do nematoide após ataca-lo, ou porque sua demanda nutricional foi satisfeita ao segundo dia.

As demais espécies não diferiram estatisticamente entre si.

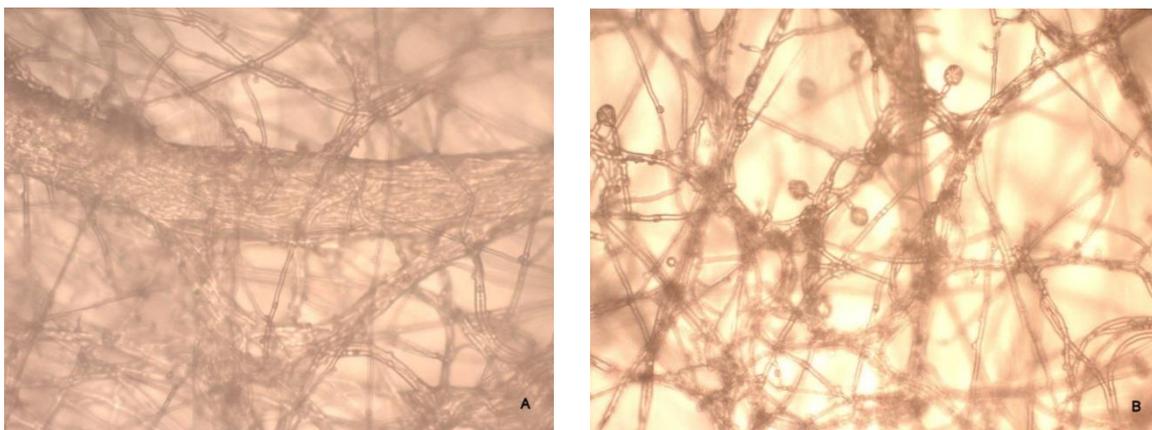
*Hohenbuehelia portegna* teve um comportamento progressivo, aumentando o número de nematoides predados de forma significativa entre os dias de avaliação.

*Hohenbuehelia* sp. e *H. aff. bullulifera* apresentaram os menores índices de predação, inferiores a 11% ao último dia de análise (Tabela 3), com fator de mortalidade constante e baixo a partir do segundo dia.

*Hohenbuehelia paraguayensis* apresentou constância alta de predação ao segundo e terceiro dia de avaliação.

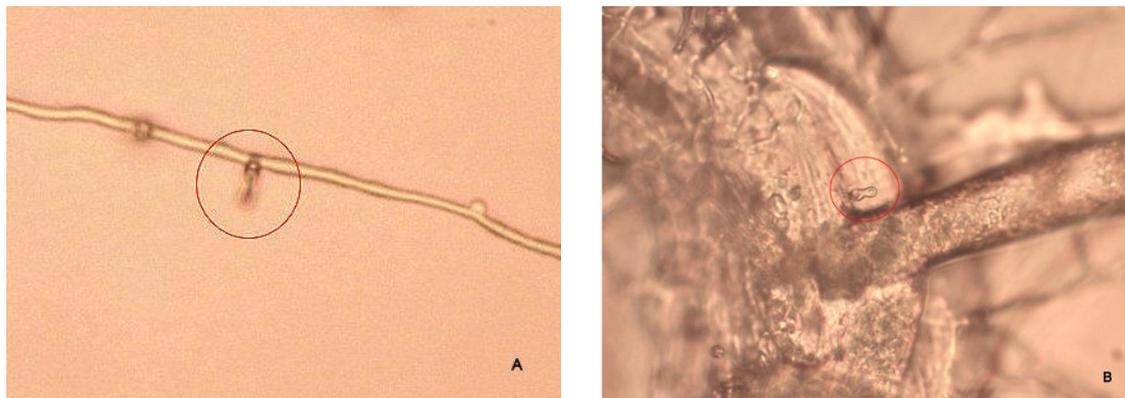
É comum observar a cutícula do corpo do nematoide esticada e por vezes rompida devido ao grande esforço demandado na tentativa de fuga. Conforme o parasitismo evolui, as hifas assumem a forma do corpo do nematoide (Figura 7 A) e produzem estruturas de reprodução (Figura 7 B).

FIGURA 7: *HOHENBUEHELIA PARAGUAYENSIS*, AUMENTO DE 400X.



Segundo Putzke *et al.* (2007), e Barron (2003), as hifas produzem protuberâncias adesivas em forma de vidro de relógio contendo uma fina cobertura de muco gelatinoso que contém uma lectina que se une quimicamente a um açúcar no corpo do nematoide antes da invasão (Figura 8). Devido a habilidade de formação de hifas adesivas, um grande número de nematoides podem ser capturados concomitantemente (THORN; BARRON, 1986). Carroll e Wicklow (1992), dizem que estas estruturas são o meio pelo qual a aderência ao corpo do nematoide é feita, a fim de imobilizá-lo e reproduzir um novo ciclo de crescimento. Entretanto, para as espécies estudadas neste trabalho, um número muito pequeno de tais estruturas foram observadas e apenas ao terceiro dia de avaliação, o que sugere que elas podem sim estar envolvidas na imobilização do nematoide, mas que este processo não ocorre exclusivamente através delas.

FIGURA 8: CÉLULAS ADESIVAS. *H. AFF. BULLULIFERA* (A) E *H. PORTEGNA* (B). AUMENTO DE 400X.



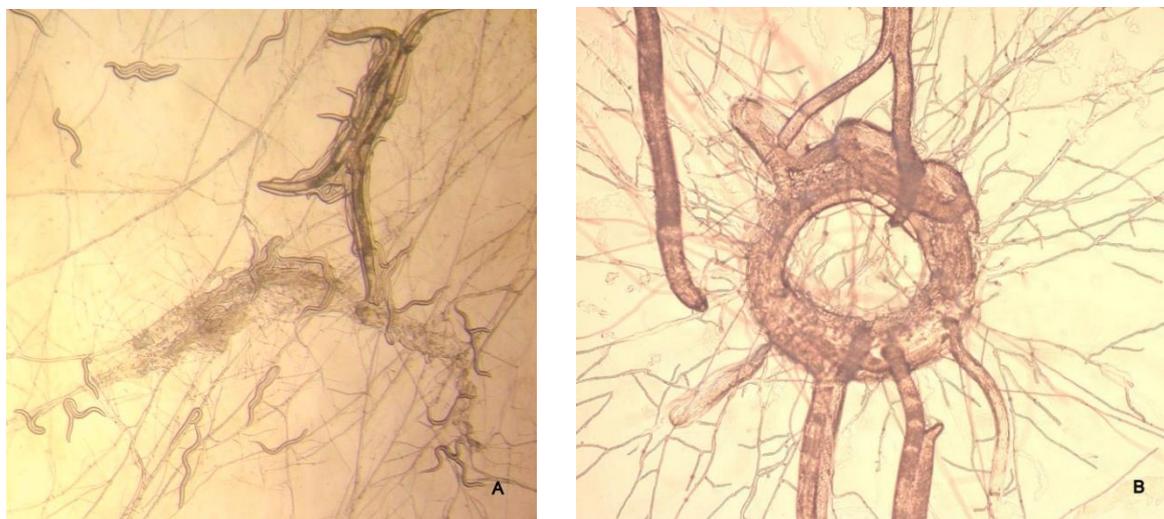
Além da aderência às estruturas adesivas, do enroscamento em armadilhas e da penetração direta da hifa, *P. redivivus* e outros nematoides não parasitas de plantas podem, ainda, ingerir esporos fúngicos que eventualmente germinam no esôfago, controlando-os (MANKAU, 1980). A produção de esporos pelas espécies de *Hohenbuehelia* não aparenta ser a principal via de controle, uma vez que a esporulação foi muito baixa e o controle elevado. Fungos nematófagos que se utilizam de esporos para realizar o controle não abrangem nematoides fitopatogênicos de importância econômica, pois estes são dotados de um aparato bucal diferenciado, contendo estilete que impossibilita a ingestão. Além disto, o controle via ingestão de esporos é indireto, não havendo empenho do fungo em parasitar o nematoide, mesmo havendo esporos capazes de aderir ao corpo e penetrá-lo.

O perfil da predação nas situações *in vitro* e em casa de vegetação são de extrema importância para avaliar a viabilidade de uma possível condução de experimentos a campo, uma vez que, o sucesso da redução da população de nematoides *in vitro* não condiz, necessariamente com os mesmos resultados a campo. Esta colocação é feita por Mankau (1980), que percebeu uma super estimativa relacionando a eficiência de predação de nematoides por fungos em ágar-água e em vasos com solo. Deste modo, os fungos que obtiveram performance positiva no controle de nematoides em meio artificial devem ser testados em casa de vegetação, ao invés de superestimar seu potencial.

Marino e Silva (2013) confirmaram a eficiência de predação de *Pleurotus ostreatus* contra nematoides, porém a metodologia por eles empregada utilizou-se de solo autoclavado, não podendo ser comparado com o presente trabalho.

Tranier *et al.* (2014), defendem que a seleção de “cepas” nativas é ideal, pois, o fungo já se encontra no meio em que deve atuar e portanto, já está adaptado as condições de clima e solo do local desejado. Todos os espécimes testados no presente estudo se enquadram nesta colocação. As espécies avaliadas demonstraram predação tanto para indivíduos adultos como para juvenis e recém eclodidos, predando-os individualmente ou em massa. Foi observado que anteriormente à eclosão dos juvenis de primeiro estágio (J1), as fêmeas entram em estado de repouso, oportunizando a invasão das hifas em seu corpo. Assim, quando os J1 eclodiram, a fêmea já encontrava-se rendida. Os J1 por sua vez, permaneceram certo tempo próximos à progenitora, sendo também controlados (Figura 9).

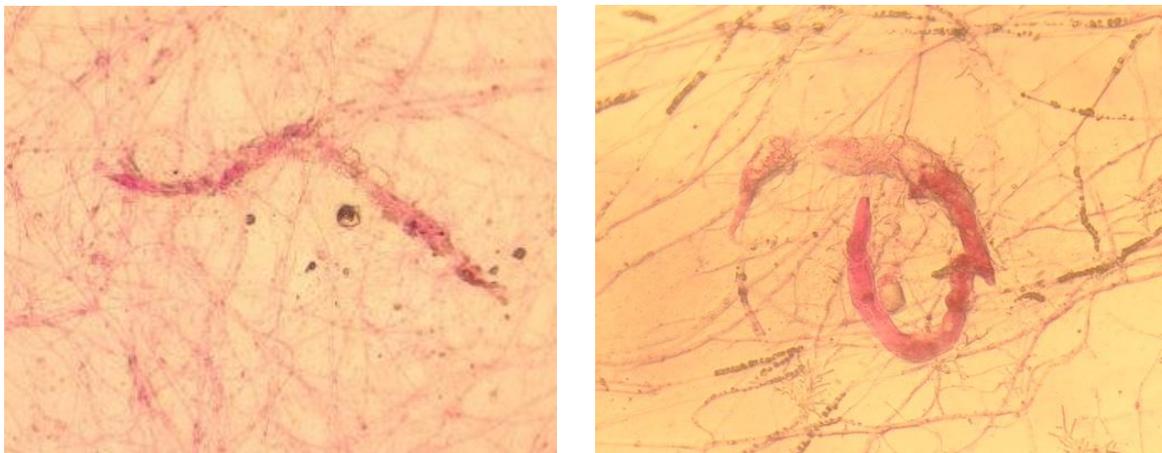
FIGURA 9: HIFAS DE *H. MASTRUCATA* (A) AUMENTO DE 40 VEZES E *H. PORTEGNA* (B) AUMENTO DE 100X.



Durante as avaliações foi observado que a espécie *H. portegna* foi capaz de imobilizar prontamente os nematoides assim que estes tiveram contato com o micélio em desenvolvimento, ao contrário de *H. mastrucata* que, apesar de não tê-lo feito foi mais agressivo no processo de penetração, formando um número maior de alças/anéis de imobilização e desintegrando rapidamente o corpo do nematoide

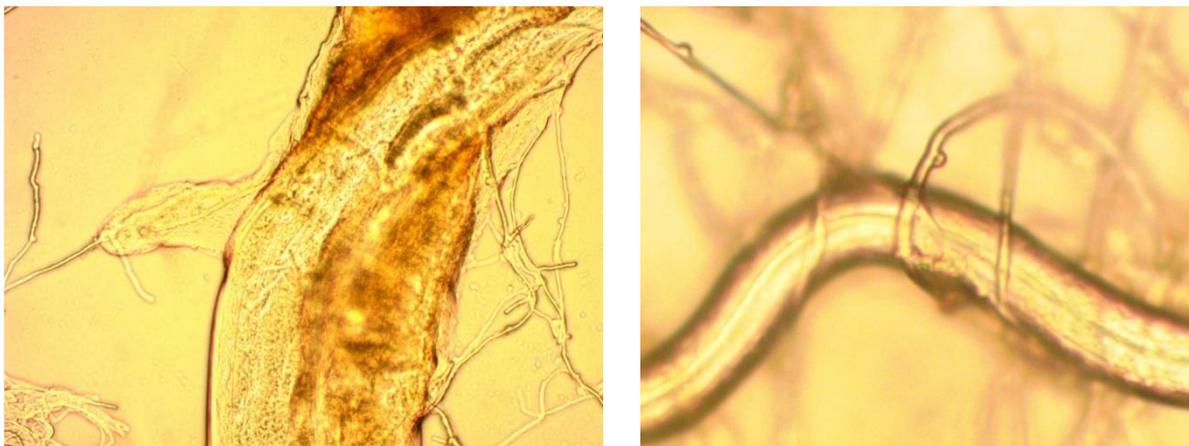
(Figura 10). Sobre isto, Lopes *et al.* (2007), defendem que a mistura de fungos nematófagos com diferentes forma de ação potencializa o controle de nematoides.

FIGURA 10: NEMATOIDES CONSUMIDOS POR *H. MASTRUCATA*. AUMENTO DE 100X.



Esta diferença de predação pelos diferentes gêneros de fungos pode ser explicada por Nordbring-Hertz (1972), que demonstrou a existência de especificidade do fungo com relação ao nematoide, e que esta é de natureza bioquímica. Ahren e Tunlid (2003), mencionam que o fato da coevolução das espécies de fungos nematófagos com os nematoides é um pré-requisito para o desenvolvimento da capacidade predatória dos fungos. Já Freitas *et al.* (1999), explica essa diferença de predação em função dos isolados de um mesmo gênero serem procedentes de regiões geográficas diferentes.

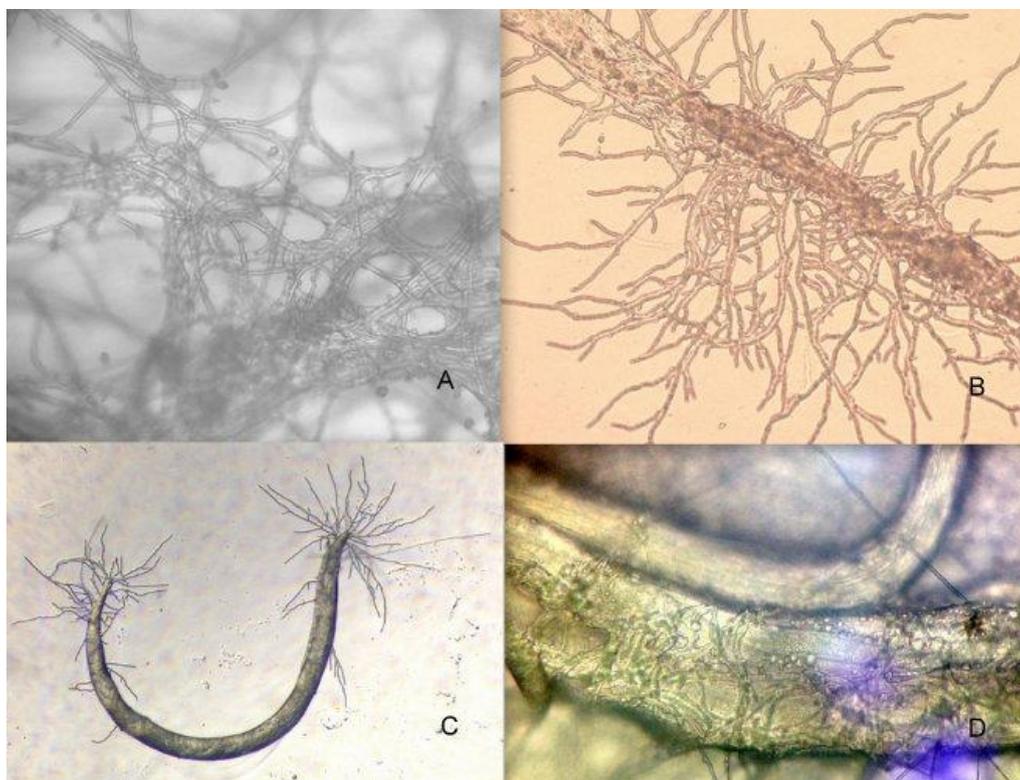
A análise estatística revelou baixa mortalidade de nematoides por *H. aff. bullulifera*, o que sugere morte natural, mas fotos comprovam sua ação nematófaga (Figura 11). Isto permite a reflexão de que, ou esta espécie requer pouca quantidade de nematoides para satisfazer suas demandas nutricionais ou as substâncias por ela liberadas tiveram efeito de repulsão, uma vez que os nematoides foram observados subindo nas paredes das placas de Petri, como se estivessem fugindo do ágar.

FIGURA 11: PROVA DA PREDACÃO DE *H. AFF. BULLULIFERA*. AUMENTO DE 40X.

A espécie *H. portegna* se destacou quanto ao potencial de predação, representando o melhor agente de biocontrole deste estudo. A figura 12 mostra a predação desta espécie ao segundo dia de avaliação.

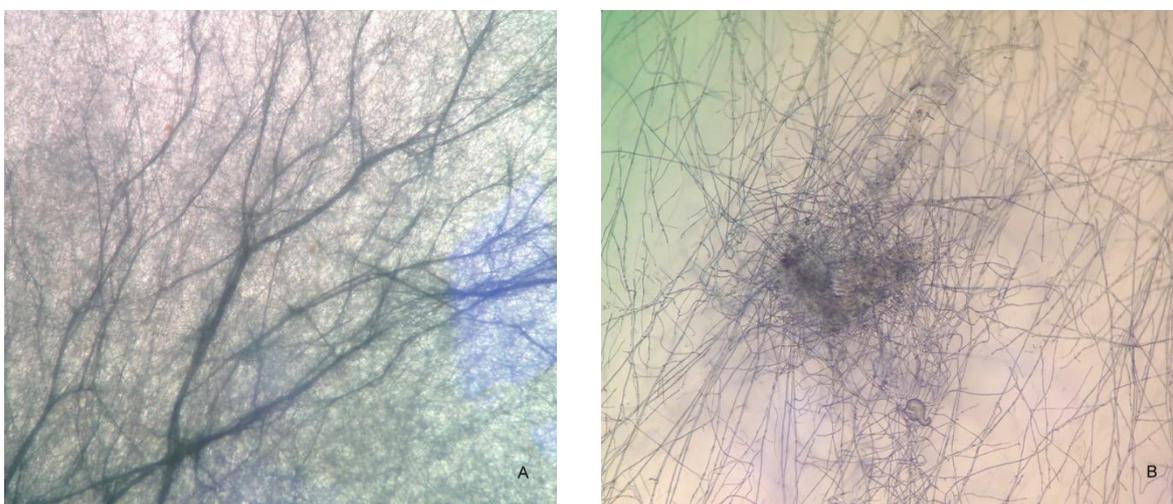
Esta espécie não forma alças, mas emaranhados que constituem-se em barreiras físicas (A) e abundante formação de hifas na tentativa de aprisionar o nematoide (B). Ainda é possível observar sua penetração no corpo do nematoide (C e D). *H. portegna* extraiu água do meio de cultivo a ponto de rachá-lo, evidenciando sua intensa atividade. Apesar da penetração não ter ocorrido tão rapidamente quanto *H. mastrucata*, o processo de imobilização foi imediato, possivelmente devido as substâncias que liberou.

FIGURA 12: DESEMPENHO DE PREDACÃO DE *H. PORTEGNA*. FORMAÇÃO DE EMARANHADOS (A), INTENSO DESENVOLVIMENTO DE HIFAS (B) E PENETRAÇÃO (C E D). AUMENTO DE 400X (A E D); 100X (B); 40X (C)



A espécie *H. paraguayensis* formou poucas alças e espessou bastante o micélio, formando barreiras densas (Figura 13 A). Ao atacar os nematoides formou emaranhados de hifas ao seu redor (Figura 13 B).

FIGURA 13: MODO DE PREDACÃO DE *H. PARAGUAYENSIS*. AUMENTO DE 40X



## 5 CONCLUSÃO

Os resultados indicam que todas as espécies do gênero *Hohenbuehelia* testadas apresentam diferenciado potencial de predação de nematoides, sendo todas endoparasitas.

As espécies com melhor desempenho foram *H. portegna*, *H. mastrucata* e *H. paraguayensis*, com porcentagem de predação ao segundo dia avaliação de 196, 72 e 71%, respectivamente.

As espécies *H. sp.* e *H. aff. bullulifera* controlaram, ao terceiro dia de avaliação, 4 e 11% da população de *P. redivivus*, respectivamente, não apresentando desempenho endoparasita significativo.

Outras formas de controle podem ter ocorrido como pela liberação de compostos por *H. aff. bullulifera* que aparentemente repeliu os nematoides.

A presença de nematoides não estimulou o desenvolvimento micelial das espécies testadas.

O fator de mortalidade revelou índices de predação diário das espécies, havendo um ótimo de predação para *H. mastrucata* ao segundo dia de avaliação, um aumento progressivo para *H. portegna* e constância para *H. paraguayensis*, *H. sp.* e *H. aff. bullulifera*, a partir do segundo dia de avaliação.

## REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**, 4. ed. Academic Press. San Diego, CA. 1997.
- AHREN, D.; TUNLID, A. Evolution of parasitism in nematode-trapping fungi. **Journal of Nematology**, Lawrence v. 35, n. 2, p. 194-197, 2003.
- ALCÂNTARA, F. A.; MADEIRA, N. R. **Manejo do solo no sistema de produção orgânico de hortaliças**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 12p. 2008 (Circular Técnica. 64).
- ALVES, T. C. U.; SILVA, R. A.; BORGES, D. C.; MOTTA, L. C. C.; KOBAYASTI, L. Reação de cultivares de soja ao nematoide das lesões radiculares *Pratylenchus brachyurus*. **Revista Biodiversidade** v. 10, n. 1, 2011.
- AMORIM, L.; PASCHOLATI, S. F. Ciclo de relações patógeno-hospedeiro. In: BERGAMIN FILHO, A. *et al.* **Manual de Fitopatologia**. v. 1. São Paulo: Agronômica Ceres, 2011. p. 59-99.
- BAS, C.; KUYPER, T. W.; NOORDELOOS, M. E.; VELLINGA, E. C. **Flora Agaricina Neerlandica** -- Critical monographs on the families of Agarics and Boleti occurring in the Netherlands. v. 3: Tricholomataceae. Hardcover. v. 3, n.1, p. 200, 1995.
- BASTOS, C. S.; TORRES, J. B. **Controle Biológico e o Manejo de Pragas do Algodoeiro**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 63p. 2005. (Circular Técnica, 72).
- BARRON, G. L. **The nematode-destroying fungi**. Ghelph: Canadian Biological Publications Ltda. 140 p, 1977.
- BARRON, G. L.; DIERKES, Y. Nematophagous fungi: *Hohenbuehelia*, the perfect state of *Nematoctonus*. **Canadian Journal of Botany**, v. 55, n. 24, p. 3054-3062. 1997.
- BARRON, G. L. Predatory fungi, wood decay, and the carbono cycle. **Biodiversity**, v. 4, n. 1, p. 3-9. 2003.
- BERGAMIN FILHO, A. *et al.* **Manual de Fitopatologia**. 1. ed. v. 1. São Paulo: Agronômica Ceres, 2011.
- 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.
- BRAGA, G. N. M. **O controle dos nematoides pela rotação de culturas**. 2010.

BRASS, F. E. B.; VERONEZZE, N. C.; PACHECO, E. Aspectos biológicos do *Meloidogyne* spp. relevantes à cultura de café. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**. v. 7, n. 14, p. 1-7, 2008.

BURZYNSKI, M., *et al.* **Omphalina**. Foray Newfoundland & Labrador : Canadá. v. 5. n. 11. 2014.

CAPELARI, M; MAZIERO, R. Fungos macroscópicos do estado de Rondônia região dos Rios Jaru e Ji-Paraná. **Hoehnea**, v. 1, n. 15, p. 28-36. 1988.

CAPRILES, C. H.; MATA, S.; MIDDELVEEN, M, J. Preservation of fungi in water (Castellani): 20 years. **Mycopathologia**. v. 106, n. 2, p. 73-9. 1989.

CARDOSO, E. R. **Fungos nematófagos em diferentes solos e caracterização fisiológica de *Arthrobotrys oligospora***. 82 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Jaboticabal, São Paulo, 2007.

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

CARROLL, G. C.; WICKLOW, D. T. **The fungal community: its organization and role in the ecosystem**. 2 ed. New York: CRC Press. 952 p. 1992.

CASTELLANI, A. A. Maintenance and cultivation of the common pathogenic fungi of man in sterile distilled water. **Journal of Tropical Medicine & Hygiene**, v. 70, p. 181-184. 1967.

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

CHEN, S. Y.; DICKSON, D. W.; MITCHELL, D. J. Viability of *Heterodera glycines* exposed to fungal filtrates. **Journal of Nematology**, Hannover, v. 32, p. 190-197, 2000.

CORNER, E. J. H. On the agaric genera *Hohenbuehelia* and *Oudemansiella*. Part I: *Hohenbuehelia*. **The Gardens' Bulletin Singapore** 46: 1-47. 1994.

COYNE, D. L.; NICOL, J. M.; CLAUDIUS-COLE, B. **Nematologia prática: um guia de campo e de laboratório**. Tradução de Isabel Abrantes. SP-IPM Secretariat, International Institute of Tropical Agriculture (IITA), Cotonou, Benin, p. 85. 2007.

CUNHA, F. R.; OLIVEIRA; D. F.; CAMPOS, V. P. Extratos vegetais com propriedades nematicidas e purificação do princípio ativo do extrato de *Leucaena leucocephala*. **Fitopatologia brasileira**, v. 28 n. 4 Brasília, 2003.

DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. **Basic plant pathology methods**. 2. ed. CRC Press Reference, Boca Raton, FL. 355 f. 1995.

FARIA, M. R.; MAGALHAES, B. P. O uso de fungos entomopatogênicos no Brasil. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, 22 set/out 2001.

FERRAZ, L. C. C. B.; MONTEIRO, A. R. Nematoides. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. eds. *Manual de Fitopatologia. Volume 1 - Princípios e Conceitos*. 4ª Edição. Editora Agronômica Ceres Ltda. São Paulo. 704p. 2011.

FERREIRA, D. F. **SISVAR - Sistema de análise de variância**. Versão 5.4, Build 80. Lavras-MG: UFLA, 2010.

FRANZENER, G. UNFRIED, J. R.; STANGARLIN, J. R.; FURLANETTO, C. Nematoides formadores de galha e de cisto patogênicos a cultura da soja em municípios do Oeste do Paraná. **Nematologia Brasileira**, v. 29, n. 2, p. 261-265, 2005.

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.

FREITAS, D. F. **Exigências térmicas do fungo cultivado por formigas cortadeiras do gênero *Acromyrmex mayr*, 1865 (Hymenoptera, Formicidae)**. 2010. 37 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Pós Graduação em Fitossanidade, Universidade Federal de Pelotas, Rio Grande do Sul. 2010.

FURLANETTO, C. *et al.* Desenvolvimento das culturas de soja, milho e trigo cultivadas em áreas infestadas com o nematoide *Tubixaba tuxaua* no Oeste do Paraná. **Tropical Plant Pathology**, v. 35, n. 5, p. 295-302, 2010.

GOMES, C. B.; COFCEWICZ E. T. **Sistema de Produção do Morango**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2005. (Sistemas de Produção, 2005).

GRAY, N. F. Nematophagous fungi with particular reference to their ecology. **Biological Review**, Cambridge, v. 62, p. 245-304, 1987.

HUANG, J. *et al.* Finding new components of the target of rapamycin (TOR) signaling network through chemical genetics and proteome chips. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 47, p. 16594-9, 2004.

INOMOTO, M. M. **Principais nematoides na cultura da soja e seu manejo**. Piracicaba: ESALQ/USP, 2006.

INOMOTO, M. M.; ASMUS, G. L. Controle de nematoides une resistência, rotação e nematicidas. **Visão Agrícola**, v. 6, p. 47-50, 2006.

JONES, M.; FOSU-NYARKO, J. The nematode worm has turned for better crop plants. **Bulletin 3.01 Crop Production & Biosecurity**. 2015.

KORNERUP, A.; WANSCHER, J. H. **Methuen Handbook of Colour**. 3. ed. London, Eyre Methuen. 1978.

KOZIAK, A. T. E.; DIAZ F. C., DIAZ J.; GARCIA M.; JANZEN D. H.; THORN, R. G. Costa Rican species of *Nematoctonus* (anamorphic Pleurotaceae). **Canadian Journal of Botany**. v. 85, p. 749–761 Canadá, 2007.

KOZIAK, A. T. E.; CHENG, K. C.; THORN, R. G. Phylogenetic analysis of *Nematoctonus* and *Hohenbuehelia* (Pleurotaceae). **Canadian Journal of Botany**. v. 85, p. 762-773, 2007.

LARGENT, D. L. 1986. **How to Identify Mushrooms to Genus I: Macroscopic features**. 2. ed. California, Mad River press. 1986.

LIMA, V. C.; LIMA, M. R.; MELO, V. F. **Conhecendo os principais solos do litoral do Paraná**: abordagem para educadores do ensino fundamental e médio – Curitiba : Sociedade Brasileira de Ciência do Solo / Núcleo Estadual Paraná, 2012.

LOPES, E. A. **Formulação de condicionadores de solo com propriedades Nematicidas**. 112 f. Tese (Pós graduação em fitopatologia – *Doctor Scientiae*) - Universidade Federal de Viçosa, 2007.

LOPES, E. A.; FERRAZ, S.; FERREIRA, P. A.; FREITAS, L. G.; DHINGRA, O. D.; GARDIANO, C. G.; CARVALHO, S. L. Potencial de Isolados de Fungos Nematófagos no Controle de *Meloidogyne javanica*. **Nematologia brasileira**. v. 31, n. 2, 2007.

MAIA, A. S. **Isolamento, identificação e potencialidade de fungos como agentes de biocontrole de *Meloidogyne spp.* e *Heterodera glycines***. 2000. 117 f. Tese (Doutorado Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2000.

MAIA; A. S.; SANTOS, J. M.; 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.

MACHADO, A. C. Z. Current nematode threats to Brazilian agriculture. **Current Agricultural Science and Technology**, v. 20, p. 26-35, 2014.

MAIA, L. C. *et al.* Diversity of Brazilian Fungi. **Rodriguésia**, v. 66, n. 4, p. 1033-45, 2015.

MAGRO, S. R.; PARRA, J. R. P. A prática do controle biológico de pragas no Brasil. In: PINTO, A. S.; NAVA, D. E.; ROSSI, M. M.; SOUZA, D. T. M. **Controle Biológico de pragas: na prática**. Piracicaba: CP 2, v. 22, p. 247-253, 2006.

MANKAU, R. Biocontrol: Fungi as nematode control agentes. **Journal of Nematology**, v. 12, p. 244-252, 1980.

MARINO, R. H.; SILVA, D. G. C. Controle do nematoide das galhas por *Pleurotus ostreatus* em alface. **Scientia Plena**, v. 9, n. 10, 2013.

MARTINELLI, P. R. P. **Estudo do controle biológico dos nematoides dos citros no estado de São Paulo**. 131 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita" - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias- *Campus* de Jaboticabal. São Paulo, 2008.

MARTINELLI, P. R. P.; SANTOS, J. M.; SOARES, P. L. M. Estabelecimento de fungos nematófagos aplicados no campo. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 28, n. 4, p. 696-675, Sept./Oct.. 2012.

MEIJER, A. A. R. Preliminary list of the macromycetes from the Brazilian state of Paraná. **Boletim do Museu Botânico Municipal**, v. 68, p. 1-59, 2006.

MOURA, R. M. O gênero *Meloidogyne* e a meloidoginose. In: **Revisão Anual de Proteção de Plantas**, v. 5, p. 281-315, 1997.

NORDBRING-HERTZ, B. Scanning electron microscopy of the nematode-trapping organs in *Arthrobotrys oligospora*. **Physiologia Plantarum**, Frederiksberg, v. 26, p. 279-284, 1972.

NUNES, H. T.; MONTEIRO, A. C.; POMELA, A. W. V. Uso de agentes microbianos e químico para o controle de *Meloidogyne incognita* em soja. **Acta Scientiarum. Agronomy (Online)** v. 32 n. 3 Maringá July/Sept. 2010.

OECD/FAO 2015. Brazilian agriculture: Prospects and challenges. In: **OECD-FAO Agricultural Outlook 2015-2024**. OECD Publishing, 2. 2015.

OLIVEIRA, A. M.; MARACAJÁ, P. B.; DINIZ FILHO, E. T.; LINHARES, P. C. F. Controle biológico de pragas em cultivos comerciais como alternativa ao uso de agrotóxicos. **Revista Verde**, v. 1, n. 2, p.01-09 de julho/dezembro de 2006.

PEGLER, D. N. Agaricales of Brazil described by J. P. F. C. Montagne. *Knew Bull.*, v. 45, n. 1, p. 161-177, 1989.

PEREIRA, D. P.; *et al.* Nematoides e métodos de controle. Embrapa Clima Temperado. **Sistemas de Produção**, 4 Versão Eletrônica Nov./2005.

PEREIRA, P. A. A.; MARTHA JUNIOR, G. B.; SANTANA, C. A. M.; ALVES, E. The development of Brazilian agriculture: future technological challenges and opportunities. **Agriculture & Food Security**, v. 1, n. 4. 2012.

PINHEIRO, J. B.; PEREIRA, R. B.; CARVALHO, A. D. F.; RODRIGUES, C. S. **Manejo de nematoides na cultura do quiabeiro**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2013. 7p. (Circular Técnica. 127).

PROITE, K. **Busca de genes envolvidos na resistência de amendoim silvestre ao nematoide de galha (*Meloidogyne arenaria*)**. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) – Programa de pós-graduação em Biologia Molecular Departamento de Biologia molecular. Universidade de Brasília. 2007.

PUTZKE, J.; CAVALCANTI, M. A. O gênero *Hohenbuehelia* Schulzer (Basidiomycotina, Agaricales) no Rio Grande do Sul, Brasil. **Caderno de pesquisa**, Série Botânica, Santa Cruz do sul, v. 7, n. ½, p. 3-106. 1995.

PUTZKE, M. T. L. *et al.* Taxonomia e importância das espécies de *Hohenbuehelia*, *resupinatus* e *Pleurotus* no controle de *Meloidogyne javanica*. **Caderno de Pesquisa**, série Biologia, v. 19, n. 3, p. 38-81, 2007.

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

REYNOL, F. **Brasil tem oportunidade para controle biológico**. 2014. Disponível em: [http://agencia.fapesp.br/brasil\\_tem\\_oportunidade\\_para\\_controle\\_biologico/20332/](http://agencia.fapesp.br/brasil_tem_oportunidade_para_controle_biologico/20332/) < > Acesso em: 2 fev. 2016.

RODRIGUES, E. G.; LIRIO, V. S.; LACAZ, C. S. Preservação de fungos e Actinomicetos de interesse médico em água destilada. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 34, n. 2, p. 159-165, Apr. 1992.

SANTOS, T. F. S. **Metodologia de avaliação a *Pratylenchus brachyurus* e reação de genótipos de soja aos nematoides das galhas e das lesões**. Dissertação (Pós Graduação em Engenharia Agrícola), Instituto de Ciências Agrárias e Tecnológicas, Rondonópolis, MT. 87p. 2012.

SCOPEL, W.; ROZA-GOMES, M. F. Programas de controle biológico no Brasil. **Unoesc & Ciência – ACET**, Joaçaba, v. 2, n. 2, p. 2015-223, jul./dez. 2011.

SEAB. Secretaria da Agricultura e do Abastecimento do Paraná. **Estimativa de safras. 2012**. Disponível em < <http://www.seab.pr.gov.br> > Acesso em 09 de maio de 2015.

SHARON, E; BAR-EYAL, M; CHET, I; HERRERA-ESTRELLA, A; KLEIFELD, O; SPIEGEL, Y. Biocontrol of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. **Phytopathology**, v. 91, p. 687-693, 2001.

SIDDIQUI, Z. A.; MAHMOOD, I. Biological Control of plant parasitic nematodes by Fungi: a review. **Bioresource Technology** 58. Aug/sep.1996.

SILVEIRA, W. F. 76 p. **Associação de fungos nematófagos dos gêneros *Duddingtonia*, *Monacrosporium* e *Arthrobotrys* no controle biológico de nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes**. Dissertação (Pós-Graduação em Medicina Veterinária) UFV, Viçosa 2013.

SINGER, R.; DIGILIO, A. P. L. Prodrómo de la flora Agaricina Argentina, **Lilloa**, v. 25, p. 6-461, 1951.

SINGER, R. New taxa and new combination of Agaricales (Diagnoses fungorum Novorum Agaricalium) 4. **Fieldiana Botany** 21: 1-133. 1989.

SOARES, P. L. M.; SANTOS, J. M. **Utilização de fungos nematófagos no controle biológico de fitonematoides**. In: BORTOLI, S. A.; BOIÇA JÚNIOR, A. L.; OLIVEIRA, J. E. M. Agentes de controle biológico: metodologia de criação, multiplicação e uso. Jaboticabal: FUNEP, p. 1-59, 2006.

SOARES, S. M. V. 61 p. **Potencialidade do uso de fungos nematófagos no biocontrole de fitonematoides em *Heliconia* spp.** Dissertação (Mestre em Produção Vegetal) Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus. 2008.

Soybean and Corn Advisor. **Farmers in Parana, Brazil Opt for More Soybean Production**. 2014. Disponível em: <[http://www.soybeansandcorn.com/news/Sep9\\_14-Farmers-in-Parana-Brazil-Opt-For-More-Soybean-Pr9oduction](http://www.soybeansandcorn.com/news/Sep9_14-Farmers-in-Parana-Brazil-Opt-For-More-Soybean-Pr9oduction)> Acesso em: 15 de janeiro de 2016.

SRINIVASAN, J.; DILLMAN, A. R.; MACCHIETTO, M. G.; HEIKKINEN, L.; LAKSO, M.; FRACCHIA, K. M.; ANTOSHECHKIN, I.; MORTAZAVI, A.; WONG, G.; STERNBERG, P. W. The draft genome and transcriptome of *Panagrellus redivivus* are shaped by the harsh demands of a free-living lifestyle. **Genetics**. Apr; v. 193, n. 4, p. 1279–1295, 2013.

TIHOHOD, D. **Nematologia Agrícola Aplicada**. Jaboticabal: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 1993.

TIHOHOD, D. **Nematologia agrícola aplicada**. 2. ed., FUNEP, Jaboticabal, 473p. 2000.

THORN R. G., BARRON, G. L. **Carnivorous Mushrooms**. Department of Environmental Biology, University of Guelph, Ontario, Canada. 1984.

THORN R. G., BARRON, G. L. *Nematoctonus* and the tribe Resupinateae in Ontario, Canadá. **Mycotaxon**. v. 25, n. 2 pp. 3321-453. 1986.

TRANIER, M. S.; POGNANT-GROS, J.; QUIROZ, R. C.; GONZÁLEZ, C. A. G.; MATEILLE, T.; ROUSSOS, S. Commercial biological control agents targeted against plant-parasitic root-knot nematodes. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 57 n. 6, p. 831-841, Nov/Dec 2014.

VIGGIANO, J. R. ***Pochonia chlamydosporia* no controle do nematoide das galhas e na produção de alface e pepino**. 137 f. Tese (Doutorado-Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, 2011.

## APÊNDICES

FIGURA 14: *HOHENBUEHELIA MASTRUCATA*; A – BASIDIOMA; B – ESPOROS; C – METULOIDE; D – QUEILOCISTIDIO; E – MICÉLIO; F – FÍBULA. ESCALA: A – 5 mm; B, C, D, F – 10 µm. FOTOS: ALEXANDRE SILVA FILHO.

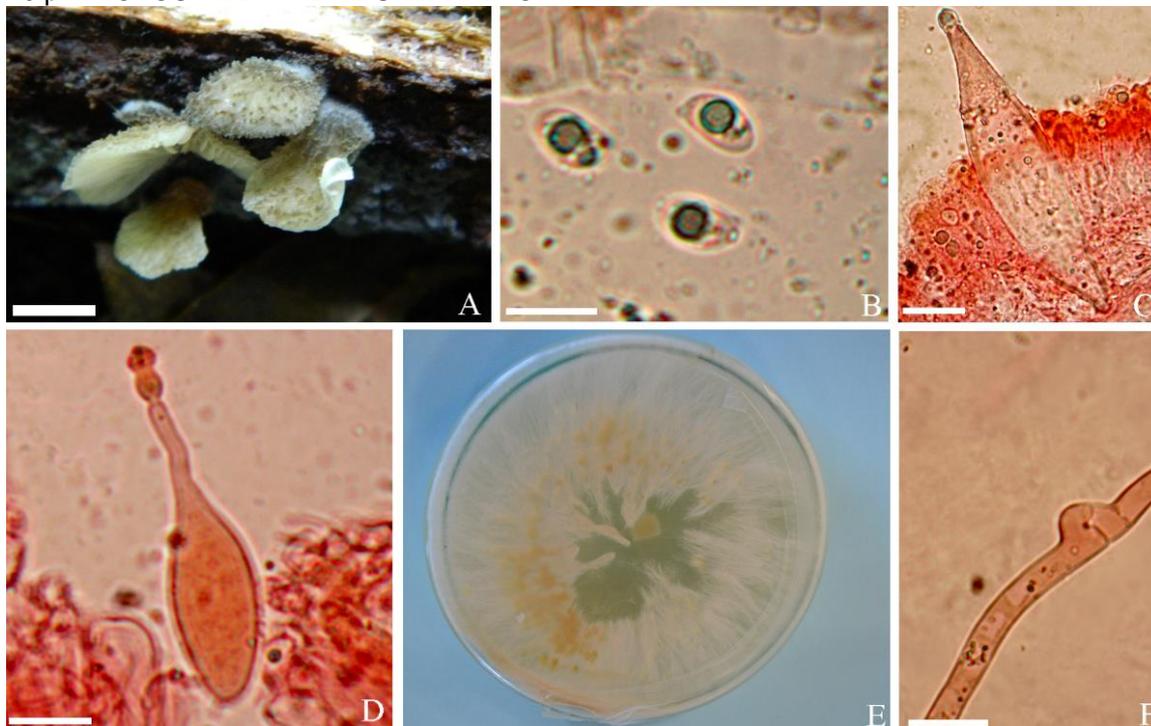


FIGURA 15: *HOHENBUEHELIA* AFF. *BULLULIFERA*; A – BASIDIOMA; B – ESPOROS; C – METULOIDES; D – QUEILOCISTIDIOS; E – MICÉLIO; F – CLAMIDÓSPORO; G – FÍBULAS; H – ALÇAS. ESCALA: A – 5 mm; B, C, D, F, G, H – 10 µm. FOTOS: A, B, C, D, E, G: ALEXANDRE SILVA FILHO, F, H: CLEONICE LUBIAN.

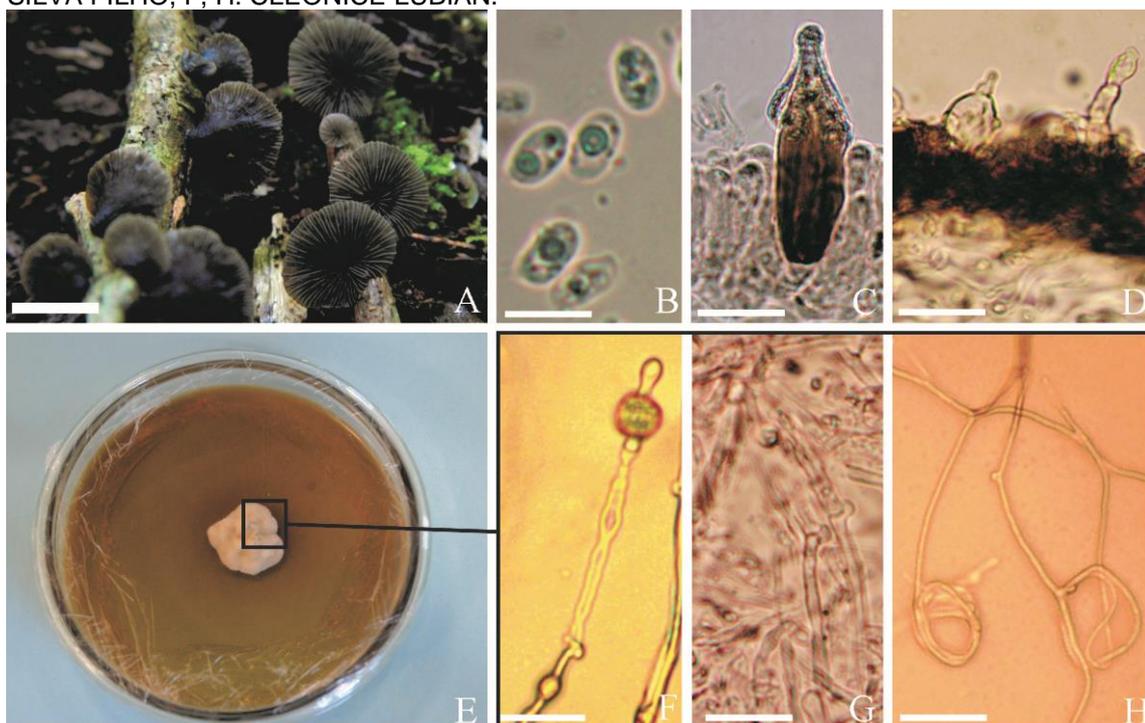


FIGURA 16: *HOHENBUEHELIA PARAGUAYENSIS*; A – BASIDIOMA; B – ESPOROS; C – METULOIDE; D – QUEILOCISTIDIO; E – MICÉLIO; F – CÉLULA ADESIVA; G – FÍBULA; H – ESTRUTURA NÃO IDENTIFICADA. ESCALA: A – 5 mm; B, C, D, F, G, H – 10 µm. FOTOS: A, B, C, D, E, G: ALEXANDRE SILVA FILHO, F, H: CLEONICE LUBIAN.

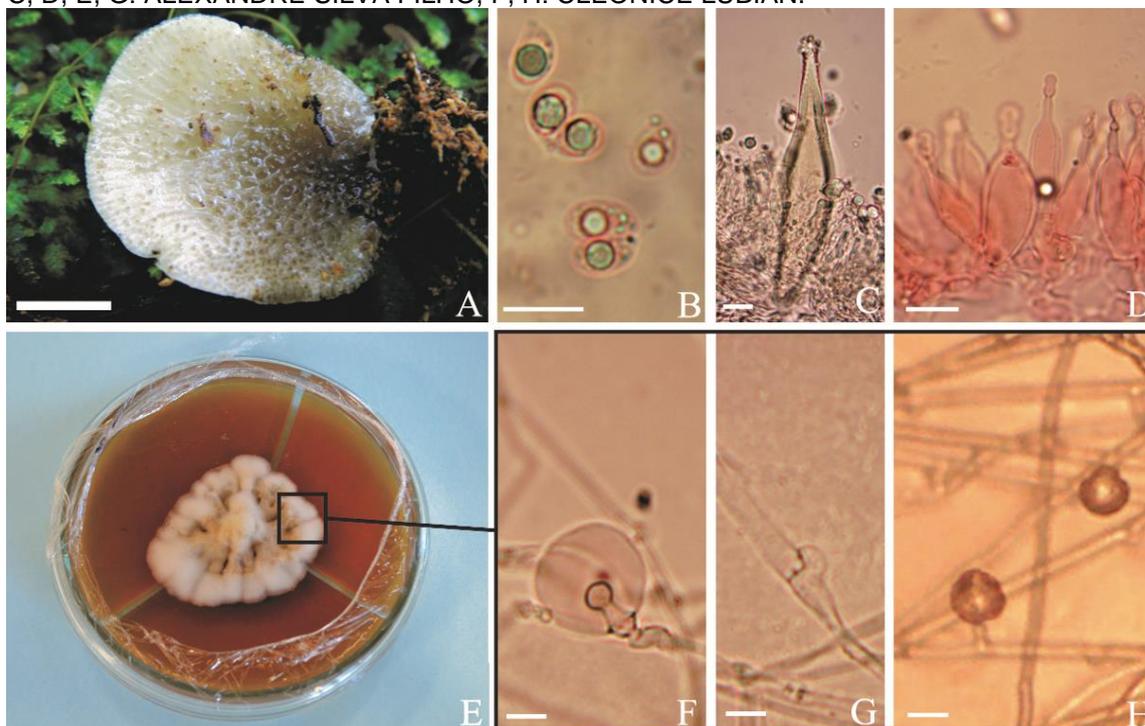


FIGURA 17: *HOHENBUEHELIA PORTEGNA*; A – BASIDIOMA; B – ESPOROS; C – METULOIDE; D – TRAMA DO CONTEXTO; E – MICÉLIO; F – CÉLULA ADESIVA; G – FÍBULA; H – ESTRUTURAS NÃO IDENTIFICADAS. ESCALA: A – 5 mm; B, C, D, F, G, H – 10 µm. FOTOS: A, B, C, D, E, G: ALEXANDRE SILVA FILHO, F, H: CLEONICE LUBIAN.

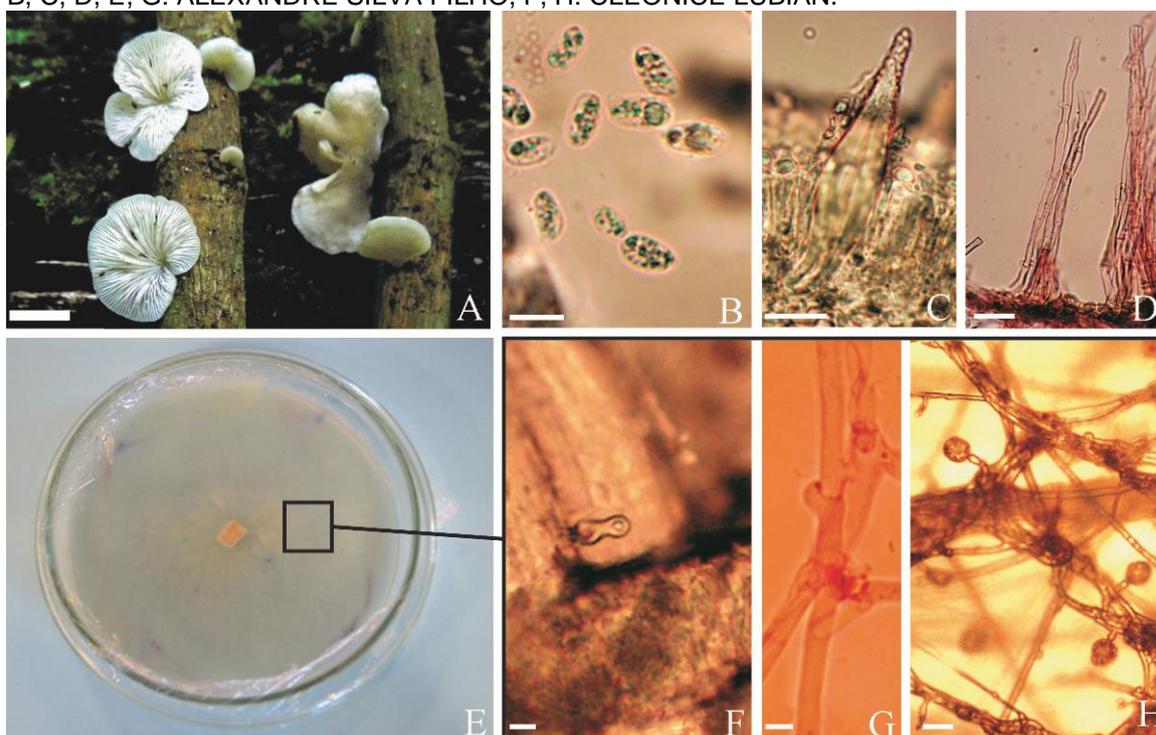


FIGURA 18: *HOHENBUEHELIA* SP.; A – BASIDIOMA; B – METULOIDE; C – QUEILOCISTIDIO; D – MICÉLIO; E – ALÇA, CLAMIDÓSPORO E FÍBULA; F – ESTRUTURAS NÃO IDENTIFICADAS. ESCALA: A – 5 mm; B, C, E, F – 10  $\mu$ m. FOTOS: A, B, C, D: ALEXANDRE SILVA FILHO, E, F: CLEONICE LUBIAN.

