

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DANIELLE DUTRA MARTINHA

CONTROLE BIOLÓGICO *IN VITRO* DE *MELOIDOGYNE INCOGNITA*
UTILIZANDO O FUNGO *HOHENBUEHELIA MASTRUCATA*

PALOTINA

2015

DANIELLE DUTRA MARTINHA

CONTROLE BIOLÓGICO *IN VITRO* DE *MELOIDOGYNE INCOGNITA*
UTILIZANDO O FUNGO *HOHENBUEHELIA MASTRUCATA*

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

Orientador: Roberto Luis Portz

Co-orientador: Vagner Gularte Cortez

PALOTINA

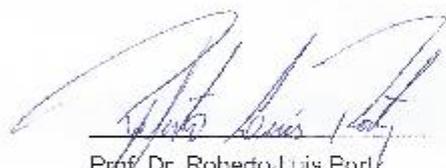
2015

TERMO DE APROVAÇÃO

DANIELLE DUTRA MARTINHA

**CONTROLE BIOLÓGICO *IN VITRO* DE *MELOIDOGYNE INCOGNITA*
UTILIZANDO O FUNGO *HYPHENBUEHELIA MASTRUCATA***

Trabalho apresentado a disciplina TCC II como requisito de conclusão do curso de Agronomia, Setor Palotina, Universidade Federal do Paraná, avaliado pela seguinte banca examinadora:



Prof. Dr. Roberto Luis Portz
Orientador: Departamento Ciências Agrônomicas
Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina



Prof. Dr. Vagner Gularte Cortez
Co-orientador: Departamento de Biodiversidade
Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina



Profa. Dra. Vivian Carré Missio
Departamento Ciências Agrônomicas
Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina

Palotina, 16 de Outubro de 2016

Ao meu pai, inspiração de pessoa e exemplo de vida. Estará sempre presente em minhas memórias e coração.

In memoriam

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço imensamente a razão da minha existência: minha mãe. Sempre esteve ao meu lado me apoiando, ajudando, aconselhando em toda a fase desse processo. Com seu carinho, atenção, auxílio e muito amor, consegui alcançar meus objetivos. Você é o motivo de eu ter alcançado essa vitória. Serei eternamente grata a você. Obrigada mãe.

Agradeço ao meu amigo, companheiro, marido, ao amor da minha vida, por todo o companheirismo e dedicação prestada. Mesmo nas horas mais difíceis você sempre esteve ao meu lado apoiando minhas decisões, mesmo que errôneas. O mundo é cruel, a humanidade está em colapso, mas “aquilo que se faz por amor, está sempre além do bem e do mal”. Tenho sorte, e muito orgulho por ter alguém como você ao meu lado. Rodrigo, carregarei você sempre em meu coração.

As minhas irmãs, amigas e companheiras: Deise, Daiane e Deliane. Suas lições de vidas me inspiram e encorajam a ser alguém melhor a cada dia. Vejo vocês desbravando o mundo a minha frente, batalhando, conquistando e amando a vida, e mesmo que sem palavras, aprendo em cada passo dado. Só tenho a agradecer a cada uma. Nosso laço é maior que o de sangue.

Aos meus sobrinhos, que pelo simples fato de existirem me estimula a lutar contra moinhos de vento para fazer desse mundo melhor para vocês. Kamylla, Sabrina e Ester vocês são a minha inspiração de vida e motivação para seguir em frente. Amo incondicionalmente cada uma, e sempre estarei com vocês onde estiverem.

A minha segunda família que com um carinho enorme sempre me apoiou. Minha sogra Bernardete, meus cunhados Greicy, Mauricio e Arthur, meus sobrinhos Eduardo e Kauany, minha eterna gratidão por vocês existirem em minha vida e por todas as conversas, conselhos e companheirismo. A Kelly e Fernanda que me acolheram em uma fase crucial de minha vida acadêmica sem esperar nada em troca, serei eternamente grata a vocês. Tenho apreço imenso por cada um.

Aos meus orientadores, professores: Roberto Luis Portz e Vagner Gularte Cortez grandes mestres do ensino. Obrigada por toda a orientação, paciência e dedicação a esse trabalho. Sem o esforço, profissionalismo e conhecimento imensurável de vocês, nada desse trabalho seria possível. Aprendi muito com suas

orientações, eterna gratidão. Não poderia deixar de mencionar a imensa ajuda para a realização desse trabalho do colega Alexandre, que partilhou seu tempo e conhecimento.

A todos os meus professores pelos ensinamentos e lições prestadas. Em especial a professora Michelle, minha primeira orientadora que se tornou uma grande amiga, serei eternamente grata por todo seu ensinamento e sabedoria, tenho imenso orgulho e gratidão por ter sido sua aluna. Tenho em você, minha inspiração profissional.

As amizades que conquistei em Palotina sempre ficarão registrada em minha memória. As festas, viagens, rio azul, estrada da melancia ... cada momento vivido foi um eterno aprendizado. Em especial a Cleonice amiga e companheira de todos os altos e baixos da vida acadêmica. Ao Marlon e Daiana, grandes amigos. Obrigada galera, vocês são demais.

Aos professores e amizades que conquistei durante meu intercâmbio em Portugal. Em especial a professora Maria do Rosário pela oportunidade de estágio e a Carla, Helena, André e minha conterrânea brasileira, Mônica pelo inesquecível estágio, minha sincera gratidão por todos os ensinamentos, companheirismos e risadas. Aos meus colegas de casa Tamires, Rebeca e Israel e aos colegas de turma Isa, Ana Guerreiro, Maria Margarida, Magda, Ana e Vissolela. Vocês são fera galera!

A todos os funcionários: professores, técnicos e servidores da Universidade Federal do Paraná, mesmo que indiretamente vocês foram essenciais para essa conquista. Obrigada UFPR.

A todos os demais que porventura não citei nesse agradecimento, mas que passaram por minha vida durante esse período de graduação. Meus sinceros agradecimentos por fazerem parte de uma fase importante da minha vida.

“Três paixões, simples, mas irresistivelmente fortes, governam minha vida: o desejo imenso de amar, a procura do conhecimento e a insuportável compaixão pelo sofrimento da humanidade.”

Bertrand Russell

RESUMO

O controle biológico torna-se ferramenta promissora na redução e/ou interrupção do ciclo de vida de nematoides, um dos principais agentes limitantes na produção de grãos. Certas espécies de fungos, denominados inimigos naturais, utilizam os nematoides como fonte de nutrientes, predando ou neutralizando-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 uso de espécies de *Hohenbuehelia* no biocontrole de *Meloidogyne incognita*. Após a coleta e identificação através de análises macroscópicas e microscópicas, o fungo foi repicado em placas de Petri em meio de cultura BDA e armazenado em BOD a 28°C. A espécie de nematoide utilizada foi obtida de plantas de soja, em uma propriedade rural de Palotina e, multiplicado posteriormente em casa de vegetação em plantas hospedeiras de *Impatiens walleriana* e *Abelmoschus esculentus*. Para o teste de predação, foi removido um disco de 5 mm de diâmetro, a partir de cultura pura de *H. mastrucata* em meio de cultivo e transferido para o centro de dez placas de Petri contendo Agar-água a 2 %. Após cinco dias de desenvolvimento micelial foi adicionado às placas 120 µl de suspensão de nematoides, logo após sua extração. As placas contendo o fungo e nematoides foram incubadas por cinco dias, em condições de escuro, à temperatura de 28°C. As observações foram realizadas diariamente em lupa, iniciando-se 24 horas após a adição dos nematoides nas placas. O número de nematoides móveis e imóveis foi registrado em planilha de anotações. As observações em microscópio foram registradas através de sistema de captura de imagens adaptado ao microscópio óptico. Resultados indicam que *H. mastrucata* reduziu em 44,21% o número de nematoides, após o quinto dia de avaliação. Para corroborar com os resultados obtidos *in vitro* por esse trabalho, testes a campo devem ser realizados para confirmar o potencial de *H. mastrucata* como possível ferramenta no manejo populacional de nematoides.

Palavras-chave: fungos nematófagos, teste de patogenicidade, *Nematoctonus*

ABSTRACT

Biological control is considered one promising tool to reduce nematodes population that is responsible for reducing grain production. Some fungi species are called nematophagous because they use nematodes as nutritional resources. These fungi prey nematodes through their complex hyphae system. This work aims to collect and identify *Hohenbuehelia* species potential to control *Meloidogyne incognita* under *in vitro* condition. After collecting and identifying the species using microscopic and macroscopic techniques, the fungus was put in Petri plates in PDA culture medium and kept in BOD incubator at 28°C. The nematodes were obtained from soybean plants in a farm area in Palotina, Paraná, Brazil. They were multiplied in greenhouses into host plants *Impatiens walleriana* and *Abelmoschus esculentus*. For the predation test it was collected a 5 mm diameter disc from a pure culture of *Hohenbuehelia mastrucata* and transferred to the center of ten Petri plates containing water-agar medium 2%. Five days after mycelial development, 120uL of nematodes suspension were added to the plates. The plates containing nematodes and fungi were incubated in dark condition at 28°C. Observations occurred daily under stereoscopic microscope right after 24 hours of interaction among fungi and nematodes. The mobile and non-mobile nematodes number was registered on sheet notes. All observations were registered by image capture system connected to the microscope. Results has shown that *H. mastrucata* reduced significantly the alive nematodes in 44,21% afterward five days. To confirm *in vitro* results farming tests are required.

Keywords: nematophagous fungi, pathogenicity test, Nematoctonus

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1: A, B – BASIDIOMA; C – ESPORO; D – QUEILOCISTIDIO; E, F – METULOIDES; G- FÍBULA.....256
- FIGURA 2: A, B - CRESCIMENTO MICELIAL EM BDA; C – SEPTO E FÍBULA OBSERVADO NO ANAMORFO; D- CÉLULA ADESIVA; E – MOVIMENTO ONDULATÓRIO DE *MELOIDOGYNE INCOGNITA*; F- DETALHES DO APARELHO BOCAL DO TIPO ODONTOESTILETE.278
- FIGURA 3: A - ANÉIS FORMADOS PELA HIFA NA PRESENÇA DO NEMATOIDE; B-CÉLULA ADESIVA; C- IMOBILIZAÇÃO DO NEMATOIDE PELA HIFA; D, E, F - PREDUÇÃO DO NEMATOIDE.....289
- FIGURA 4: EVOLUÇÃO DA PREDUÇÃO DE NEMATOIDES EM 5 DIAS.....31

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: TESTE DE MÉDIA DOS NEMATOIDES PREDADOS	30
--	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 NEMATOIDES	13
1.2. <i>MELOIDOGYNE INCOGNITA</i>	14
1.3 CONTROLE BIOLÓGICO DE NEMATOIDES.....	16
1.4 FUNGOS NEMATÓFAGOS	17
1.5 <i>HOHENBUEHELIA</i> E <i>NEMATOCTONUS</i> COMO AGENTES DE CONTROLE BIOLÓGICO.....	18
1.6 <i>HOHENBUEHELIA MASTRUCATA</i>	19
2 OBJETIVO	20
3 MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DE <i>HOHENBUEHELIA</i>	20
3.2 CULTIVO E MANUTENÇÃO DO <i>HOHENBUEHELIA</i>	21
3.3 OBTENÇÃO E CONSERVAÇÃO DE <i>MELOIDOGYNE INCOGNITA</i>	21
3.4 TESTES E AVALIAÇÃO DE BIOCONTROLE <i>IN VITRO</i>	22
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	24
4.1 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DE <i>HOHENBUEHELIA</i>	24
4.2 CULTIVO E MANUTENÇÃO DO <i>HOHENBUEHELIA</i>	26
4.3 OBTENÇÃO E CONSERVAÇÃO DE <i>MELOIDOGYNE INCOGNITA</i>	26
4.4 TESTES E AVALIAÇÃO DE BIOCONTROLE <i>IN VITRO</i>	28
5 CONCLUSÃO	32
REFERÊNCIAS	33

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um país que se destaca no setor agropecuário, atingindo altos índices de produtividade no ramo, principalmente de grãos. É o segundo maior produtor mundial de soja, com 86.120,8 milhões de toneladas produzidas na safra 2013/2014. Dentre o cenário agrícola nacional, o Paraná se destaca na produção de grãos como o segundo maior produtor do país, apresentando uma produtividade média na safra de 2013/2014 de 3.727 kg.ha⁻¹ (CONAB, 2013).

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 às condições de clima e solo brasileiros, 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 são à base da economia na região (SEAB, 2012).

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 são um dos principais agentes limitantes na produção de grãos, sendo que as maiores perdas, da ordem de 10 a 40%, são observadas em soja cultivada em solos arenosos. Apenas a espécie *Meloidogyne incognita* é responsável por perdas entre 20 a 30% (INOMOTO, 2006).

1.1 NEMATOIDES

Os nematoides compreendem um grupo vermiforme muito variado e vasto, encontrados como parasitas ou de vida livre. Os fitonematoides, ou nematoides parasitas de plantas, possuem tamanho entre 0,25 mm e 1,0 mm, entretanto alguns podem atingir 4 mm de comprimento. Possuem sistema circulatório, respiratório e digestivo e se diferem dos demais nematoides por conter em sua estrutura o estilete, utilizado para injetar enzimas nos tecidos vegetais e extrair o conteúdo

nutritivo da planta. O ciclo de vida varia conforme a espécie e também à oscilação de fatores externos, e abrangem seis etapas: ovo, quatro estágios juvenis e o adulto (BERGAMIN FILHO *et al.*, 2011).

Os nematoides fitoparasitas se dividem quanto ao hábito de vida: aqueles 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, os sedentários que se fixam em regiões nutritivas, e ectoparasitas que se nutrem no exterior da planta (COYNE *et al.*, 2007).

Dentre as espécies de nematoides, as que são comumente encontradas na região Oeste do Paraná são: *Meloidogyne javanica* (Treub, 1885 Chitwood, 1949), *M. incognita* (Kofoid & White, 1919), *Heterodera glycines* (Ichinohe, 1952), Chitwood, (1949), *Pratylenchus semipenetrans* (Cobb, 1917; Chitwood & Oteifa, 1952) e *Tubixaba tuxaua* (Monteiro & Lordello, 1980). 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).

As espécies conhecidas comumente como “nematoides da galha” estão inseridas no gênero *Meloidogyne*, sendo os que acarretam os problemas mais graves, devido a sua fácil adaptação aos diversos ecossistemas. As principais causas deste problema são a baixa eficiência de alguns sistemas de rotação de culturas na redução populacional destes parasitas e a evidente carência de cultivares resistentes adaptadas as diferentes regiões do país (PROITE, 2007).

1.2. MELOIDOGYNE INCOGNITA

A espécie *M. incognita* encontra-se no Filo *Nemata*, Classe *Secernentea*, Subclasse *Diplogasteria*, Ordem *Tylenchida*, Subordem *Tylenchina*, Superfamília *Tylenchoidea*, Família *Heteroderidae*, Subfamília *Heteroderinae*, Tribo *Heteroderini* Gênero *Meloidogyne* Espécie *incognita* e tem como característica marcante a formação de galhas (MITKOWSKI, 2003).

O ciclo de vida do *M. incognita* é dividido em fases, sendo: ovo, quatro estádios juvenis e adultos macho e fêmea. O ciclo se inicia com a deposição dos ovos no solo ou córtex da raiz envoltos por uma substância pegajosa e gelatinosa que os envolve, desenvolvendo para o estádio juvenil 1 (J1) através da ecdise ainda no interior do ovo. Em 14 dias, através da multiplicação celular e desenvolvimento embrionário, ocorre a formação do segundo estádio juvenil 2 (J2). Essa fase é considerada infectiva, pois o nematoide sai do ovo e inicia sua movimentação no solo em busca de alimento, atraídos pelos exsudados radiculares. Quando encontrada as raízes, injeta secreções sofaringianas através do estilete que estimulam a formação de células hipertrofiadas pela planta, ao redor do corpo do nematoide, denominadas células gigantes, onde ao redor ocorre a hiperplasia, caracterizada pela intensa multiplicação celular. Ao estabelecer o sítio de alimentação, o J2 se torna mais robusto, com corpo cilíndrico e perde a mobilidade, sofrendo mais duas ecdises, passando dos estádios juvenis J3 e J4 para posteriormente se tornar adultos (SHIGUERITO, 2010).

A reprodução é do tipo partenogenética, isto é, os machos vivem aproximadamente 7 dias sem se alimentar na planta e sem função sexual, sendo a forma filiforme. As fêmeas são globosas e leitosas, e pós 3 dias de estádio adulto, iniciam a ovoposição. Cada fêmea pode pôr de 800 a 2850 ovos, sendo que o ciclo se completa em 28 dias em boas condições edafoclimáticas. Para as espécies *M. arenaria*, *M. incognita* e *M. javanica*, a faixa ideal de temperatura é de 25 a 30 °C, completando o ciclo de três a quatro semanas (FIORENTIN, 2010).

Os sintomas expressos pelo parasitismo de *M. incognita*, podem ocorrer de forma direta e indireta. O primeiro sintoma direto e evidente é a formação de galhas na raiz, apresentando redução e distúrbio no sistema radicular através do engrossamento das paredes celulares o que causa baixa eficiência na absorção e translocação de água e nutrientes (SHIGUERITO, 2010).

Os sintomas indiretos ou reflexos são caracterizados pelo crescimento desigual das plantas que formam reboleiras a campo. Além disso, causa clorose internerval das folhas, redução da área foliar, murchamento temporário nos horários mais quentes do dia e conseqüentemente baixa produtividade (FIORENTIN, 2010).

O controle do *M. incognita* é dificultado principalmente pela característica de ser um patógeno polifágo, ou seja, ataca uma ampla gama de hospedeiros. Sendo

assim, o melhor método empregado é interromper os mecanismos de sobrevivência através da rotação/sucessão com culturas não hospedeiras, ou ainda a utilização de cultivares resistentes. A rotação de culturas deve ser bem planejada, uma vez que quase todas as plantas daninhas possibilitam a sobrevivência do patógeno a campo (MITKOWSKI, 2003).

Outras medidas de controle são adotadas, como a inundação dos solos, a utilização de culturas armadilhas como *Crotalaria* spp., revolvimento do solo, cultivo de culturas antagônicas e controle químico como a utilização de nematicidas fumigantes. Uma das principais vias de dispersão do nematoide é através da propagação de materiais, sendo assim a produção de mudas e sementes deve ser realizada em locais saudáveis, sendo uma das principais medidas de controle para *M. incognita* (FIORENTIN, 2010).

1.3 CONTROLE BIOLÓGICO DE NEMATOIDES

Na região Oeste do Paraná as técnicas utilizadas como estratégias de controle para os nematoides da galha, consistem em sistemas de rotação/sucessão anual de culturas e no uso de cultivares resistente (principalmente da soja). Porém, a substituição da soja no verão pelo milho “safrinha” pode não ser eficiente no controle de nematoides da galha principalmente *M. javanica* e *M. incognita* (FRANZENER *et al.*, 2005). São indicados para a rotação/sucessão da soja apenas os híbridos de milho resistente (EMBRAPA, 2003).

Porém, nem sempre cultivares resistentes são disponíveis no mercado ou tem baixa eficácia, e a rotação de culturas na maioria das vezes apenas diminui o nível populacional. O uso do controle químico e métodos como a solarização são adotados por grande parte dos produtores, o que torna inviável economicamente, tem baixa eficácia e ainda são prejudiciais ao meio ambiente e a saúde humana (PROITE, 2007).

Sob esta perspectiva o uso do controle biológico vem despertando a atenção dos pesquisadores, pois se torna uma estratégia segura, econômica e ecologicamente correta. O controle biológico é definido como redução da

capacidade de sobrevivência e de reprodução de um fitonematoide através da ação de outro organismo vivo do solo, denominados antagonista ou inimigos naturais (VIGGIANO, 2011).

Dentre os agentes de controle biológico, podem ser citados fungos, bactérias, nematoides predadores, protozoários, ácaros, colêmbolas, tardígrados, entre outros. Entre os inimigos naturais mais estudados, os fungos nematófagos têm sido alvo de cerca de 76% das pesquisas (CARNEIRO, 1992) e correspondem a 75% dos agentes do controle biológico de nematoides encontrados nos solos agricultáveis do mundo (CARDOSO, 2007).

1.4 FUNGOS NEMATÓFAGOS

O primeiro relato de fungo nematófago isolado e descrito por Fresenius foi o *Arthrobotrys oligospora*, em 1852. Em seguida, os primeiros experimentos montados para o controle de nematóides através de fungos nematófagos foram no Havaí em 1939, testando a eficácia de *Arthrobotrys oligospora*, no controle de *Meloidogyne* spp. em plantas de abacaxi (*Ananas comosus* L. Merr.). Desde então, são descritas centenas espécies de nematófagos. No Brasil, os primeiros relatos envolvendo o controle biológico de nematoides através do isolamento de fungos de nematoides infectados foi em 1981, feitos por Alcântara e Azevedo (LOPES, 2007; MARTINELLI, 2008).

Os fungos denominados ectoparasitas ou predadores são os mais promissores devido a facilidade de se estabelecer no solo, pelas suas habilidades saprofíticas, e facilidade do cultivo em meio de cultura. Estes capturam os nematoides utilizando hifas modificadas na forma de armadilhas, podendo ser adesiva ou não, aprisionando os nematoides. Independentemente da armadilha utilizada, as hifas penetram na cutícula, colonizam e consomem o conteúdo interno dos nematóides (NORDBRING, HERTZ, 1972). Em seguida, emitem para o meio externo as suas estruturas vegetativas e reprodutivas (BARRON, 1977; GRAY, 1987).

Essas estruturas podem ser formadas espontaneamente ou serem produzidas em resposta a estímulos diversos, tais como: substâncias liberadas no meio pelos nematoides, escassez de água e/ou nutrientes, motilidade, uma vez que, quanto maior for a motilidade dos nematoides, maior o estímulo para o fungo produzir armadilhas, e o chamado ritmo endógeno, onde as hifas vegetativas, ao crescerem, são ritmicamente predispostas para a produção dessas armadilhas (NORDBRING, HERTZ, 1972).

Segundo Maia (2000) e Soares e Santos (2006) são conhecidos sete tipos de armadilhas: redes adesivas tridimensionais, redes adesivas bidimensionais, nódulos adesivos, ramos adesivos, anéis constritores constituídos por três células que se dilatam e estrangulam o nematoide, anéis não constritores (cujas células que os formam não se dilatam) e as hifas adesivas não modificadas, as quais se aderem ao corpo dos nematoides. Além de algumas variantes dessas armadilhas, também ocorre a penetração direta do fungo pela cutícula do nematoide através da pressão.

1.5 HOHENBUEHELIA E NEMATOCTONUS COMO AGENTES DE CONTROLE BIOLÓGICO

Dentre as espécies de fungos nematófagos, destaca-se o gênero *Hohenbuehelia* Schulzer apresentando-se como a fase teleomórfica de *Nematoctonus*, cujas espécies predam nematoides no solo apresentam a característica de saprofítico, isso é, ocorrem em madeiras, solo, fezes e outros tipos de matéria orgânica em decomposição (THORN, BARRON, 1986). O estágio anamórfico deste gênero apresenta micélio septado, em geral muito fino, com fíbulas, desenvolvendo células adesivas intercalares e/ou terminais, as quais apresentam apicalmente uma gota adesiva. Os nematoides são atraídos e fixados às gotas e rapidamente imobilizados (PUTZKE *et al.*, 2007).

Conforme observações de Barron (2003), foi evidenciada a presença de lignina e celulose sendo substâncias exclusivas de plantas nunca de animais. A produção de celulasas e lignases parece estranho para os predadores de animais,

como *Arthrobotrys* e *Hohenbuehelia*. Porém, os autores sugerem que nematoides presos pelas hifas do fungo são apenas suplementos alimentares e que a lignina e celulose podem ser as principais fontes de energia. A implicação é que o *Hohenbuehelia* é essencialmente um fungo decompositor de madeira que desenvolveu a capacidade de captura nematoides como um suplemento nutricional, e que o hábito predatório que tem atraído tanta atenção é uma capacidade secundária.

São reconhecidas atualmente 108 espécies deste gênero, das quais *Hohenbuehelia atrocaerulea*, *H. grisea*, *H. portegna*, *H. petaloides*, *H. paraguayensis* e *H. mastrucata* são destacados por possuírem habilidade positiva na predação de nematoides (THORN, BARRON, 1984).

1.6 HOHENBUEHELIA MASTRUCATA

Hohenbuehelia mastrucata (Fr.) Singer é uma espécie encontrada em restos de madeira em decomposição. Seu corpo de frutificação é diminuto de 2-7 mm de largura, convexo com a margem enrolada, semicircular no contorno em forma de “rim”, coberto com espinhos gelatinosos grossos de cor cinza escuro acastanhado ou cinzento azulado, e bastante úmido sem a presença de haste. Sob o microscópio, possui cistídios de paredes espessas com ápices incrustados (KUO, 2007).

Segundo Thorn e Barron (1984), *H. mastrucata*, juntamente com *H. petaloides*, não produzem botões adesivos nas hifas. Porém, somente na presença de nematoides, os conídios destes fungos é que produzem os botões adesivos. Estes botões estão ligados à cutícula, o qual na passagem de nematoides as hifas penetram, colonizam e digerem o conteúdo intracelular do nematoide.

2 OBJETIVO

Diante dessas constatações o presente estudo tem como objetivo geral coletar, identificar e testar o potencial uso de espécies do gênero *Hohenbuehelia* no biocontrole de *M. incognita* e assim, contribuir com o desenvolvimento de pesquisas para o manejo destes importantes patógenos agrícolas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DE *HOHENBUELIA*

Para a realização do trabalho, foram realizadas coletas semanais no Parque Estadual de São Camilo (PESC), unidade de conservação (UC) localizada no município de Palotina, Oeste do estado do Paraná, sobre as coordenadas 24°18'52.49"S; 53°54'50.51"O, área que compreende um fragmento de Floresta Estacional Semidecidual, o qual foi cuidadosamente percorrida a fim de encontrar a espécie em questão.

Após as coletas, foram realizadas análises macroscópicas e microscópicas no Laboratório de Taxonomia de Criptógamas e Fungos da UFPR Setor Palotina. As análises macroscópicas contemplaram as características fundamentais do basidioma, de acordo com os padrões morfológicos descritos. Os procedimentos foram baseados em Largent (1986) e a nomenclatura das cores foi baseada em Kornerup e Wanscher (1978).

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 incluiu dimensão das hifas e dos basidiósporos, basídios, metuloides e cystídios. As estruturas microscópicas foram fotografadas através de sistema de captura de imagens adaptado ao microscópio óptico. A identificação do espécime foi feita com

auxílio de literatura especializada assim como Putzke e Cavalcanti (1995). O espécime coletado foi desidratado, e preservado em envelopes e posteriormente tombado no Herbário do Campus Palotina (HCP).

3.2 CULTIVO E MANUTENÇÃO DO *HOHENBUEHELIA*

Após a coleta, espécies de *Hohenbuehelia* foram isolados em meio de cultura BDA (Batata, Dextrose, Agar). O meio de cultivo autoclavado a 120°C e vertido nas placas de Petri na Câmara de Fluxo Laminar devidamente esterilizada. Após resfriado e solidificado o meio, as placas recebiam o isolado do fungo, obtido a partir do contexto do material fresco.

Após o isolamento ou as repicagens, as placas foram armazenadas em estufa B.O.D. á 28°C para posteriores observações morfológicas. Após 4 a 5 dias de crescimento micelial, análises microscópicas foram realizadas a fim de localizar hifas septadas e com fíbula ou ainda as estruturas de predação do nematoide a fim de auxiliar na identificação do anamorfo. Para manter o isolado, foram removidos cerca de seis discos de 5 mm de diâmetro de cada placa e armazenados em tubos de ensaio contendo água autoclavada (CASTELLANI, 1967).

3.3 OBTENÇÃO E CONSERVAÇÃO DE *MELOIDOGYNE INCOGNITA*

Os nematoides de galha foram coletados a partir da cultura da soja, em uma propriedade rural de Palotina. Para manter a população de juvenis de nematoides de segundo estágio (J2) e fêmeas na forma globosa, plantas hospedeiras de *Impatiens walleriana* e *Abelmoschus esculentus*, foram semeadas e cultivadas em vasos de plásticos com 6 L de capacidade (duas plantas/vaso), em casa de vegetação. Após 15 dias da emergência das plantas, um solução de

fitonematoides foi vertido sobre os vasos, extraídas de raízes infectadas. As plantas hospedeiras foram regadas diariamente.

A extração de nematoides seguiu a metodologia descrita por Jenkins (1964), onde as raízes de plantas hospedeiras com sintomas, foram lavadas e cortadas com o auxílio de uma tesoura. Essas raízes foram batidas no liquidificador com água e a suspensão vertida na peneira de 20 mesh (0,840 mm de abertura) acoplada a uma de 400 mesh (0,037 mm de abertura). Com o auxílio de uma pisseta, o material retido na peneira de 400 mesh é recolhido em tubos e centrifugados por 4 minutos a 1750 rpm. Após a centrifugação, o líquido sobrenadante é eliminado e adicionado à solução de sacarose previamente preparada. Em seguida, é centrifugado novamente por 1 min. O líquido sobrenadante é vertido na peneira de 400 mesh e recolhidos os nematoides com auxílio de uma pisseta em um béquer.

A identificação seguiu a metodologia de Tihohod (1993) através do corte perineal de fêmeas maduras, região compreendida entre a vulva e o ânus e que contém marcas cuticulares características de cada espécie. As fêmeas foram extraídas das raízes e colocadas em solução de ácido láctico a 45%. Os cortes perineais foram realizados e lâminas semipermanente foram preparadas com glicerina, cobertas com lamínulas e seladas com esmalte. A identificação de espécies foi dada pela comparação com Taylor e Sasser (1983). O comportamento dos nematoides foram registrados.

3.4 TESTES E AVALIAÇÃO DE BIOCONTROLE *IN VITRO*

Para o teste de biocontrole foi utilizado o isolado de *H. mastrucata* obtido nas coletas. A partir de culturas puras do fungo em meio de cultivo foi removido um disco de 5 mm de diâmetro e transferido para o centro de placas de Petri contendo Agar-água a 2 %, conforme metodologia descrita por Koziak *et al.* (2007).

Após cinco dias de desenvolvimento micelial, as placas de petri foram divididas em quatro quadrantes e adicionado às placas 30 µl de suspensão de nematoides em cada um, com o auxílio da pipeta, contendo em média de 120

espécimes, logo após sua extração totalizando 120 µl de suspensão por placa. As placas contendo o fungo e os fitonematoides foram incubados em B.O.D. por cinco dias, em condições de escuro, à temperatura de 28°C. Foram feitas 10 repetições.

As observações foram realizadas diariamente em lupa, iniciando-se 24 horas após a adição dos nematoides nas placas. O número de nematoides moveis e imóveis foi registrado em planilha de anotações durante os cinco dias de avaliação, a qual a estatística foi processada pelo programa SISVAR, utilizando teste Tukey a 5% de probabilidade. Ao perceber as estruturas de interesse, como células adesivas e enrolamento das hifas, foram realizadas lâminas temporárias, retirando-se com o auxílio de uma agulha histológica parte do micélio com nematoides e observados na lupa, em um ambiente esterilizado com lamparina e preparando-se a lamina com água e corantes azul de algodão e vermelho congo. As observações em microscópio foram fotografadas e filmadas através de sistema de captura de imagens adaptado ao microscópio óptico.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DE *HOHENBUELIA MASTRUCATA*

A partir da identificação, foi possível constatar as seguintes características da espécie *H. mastrucata*:

Hohenbuehelia mastrucata Lilloa 22: 255.1951 (FIGURA 1 A-G) =

Agaricus mastrucatus Fr., Syst. Mycol.: 229.1818. =

Pleurotus mastrucatus Fr., Syst. Mycol.: 190.1821.

Píleo dimidiado a flabeliforme, convexo, (5E5) cinza amarronzado a (5F7) marrom com a superfície coberta com numerosos espinhos gelatinosos, 13mm de diâmetro x 5mm altura, bordos levemente involutos, não estriados (FIGURA 1-A). Contexto fino, 1mm gelatinizado, hialino ou amarronzado. Lamelas subdistantes, brancas (1A1), a acidentadas (1B1) (FIGURA 1-B). Estipe ausente. Esporada branca. Camada cortical do píleo formada por uma tricocutis, em algumas partes formando grupos de hifas em tricoderme que formam as projeções piramidais. Hifas com incrustações. Contexto com duas zonas distintas, a inferior com hifas eretas e regulares, e a superior com hifas irregularmente entrelaçadas, ambas imersas em uma massa gelatinosa. Trama da lamela regular. Basídios tetraesporados clavados 20-40 x 7-10 μm . Esporos globosos a subglobosos 8-9 x 4-5,5 μm , parede fina, hialinos e inamilóides (FIGURA 1 C). Metulóides lanceolados ou fusóides 60-95 x 14-18 μm , de parede grossa e incrustada no ápice (FIGURA 1 E-F). Queilocistídios clavados-capitados 29-35 x 4-9 μm , (FIGURA 1 D). Grampo de conexão presente em todos os tecidos. Espécime estudado: PARANÁ: Palotina, Parque estadual São Camilo, Silva Filho AGS-436, 25/05/2015, (HCP).

Mesmo apresentando poucos esporos e menor tamanho do píleo em comparação com as amostras coletadas no Rio Grande do Sul e descrita por Putzke e Cavalcanti (1995), a amostra coletada pôde ser identificada como *H. mastrucata*, pela coloração e presença de espinhos gelatinosos no píleo, formato da camada cortical píleo, pelas duas fases distintas do contexto, formato e tamanho dos queilocistídios.

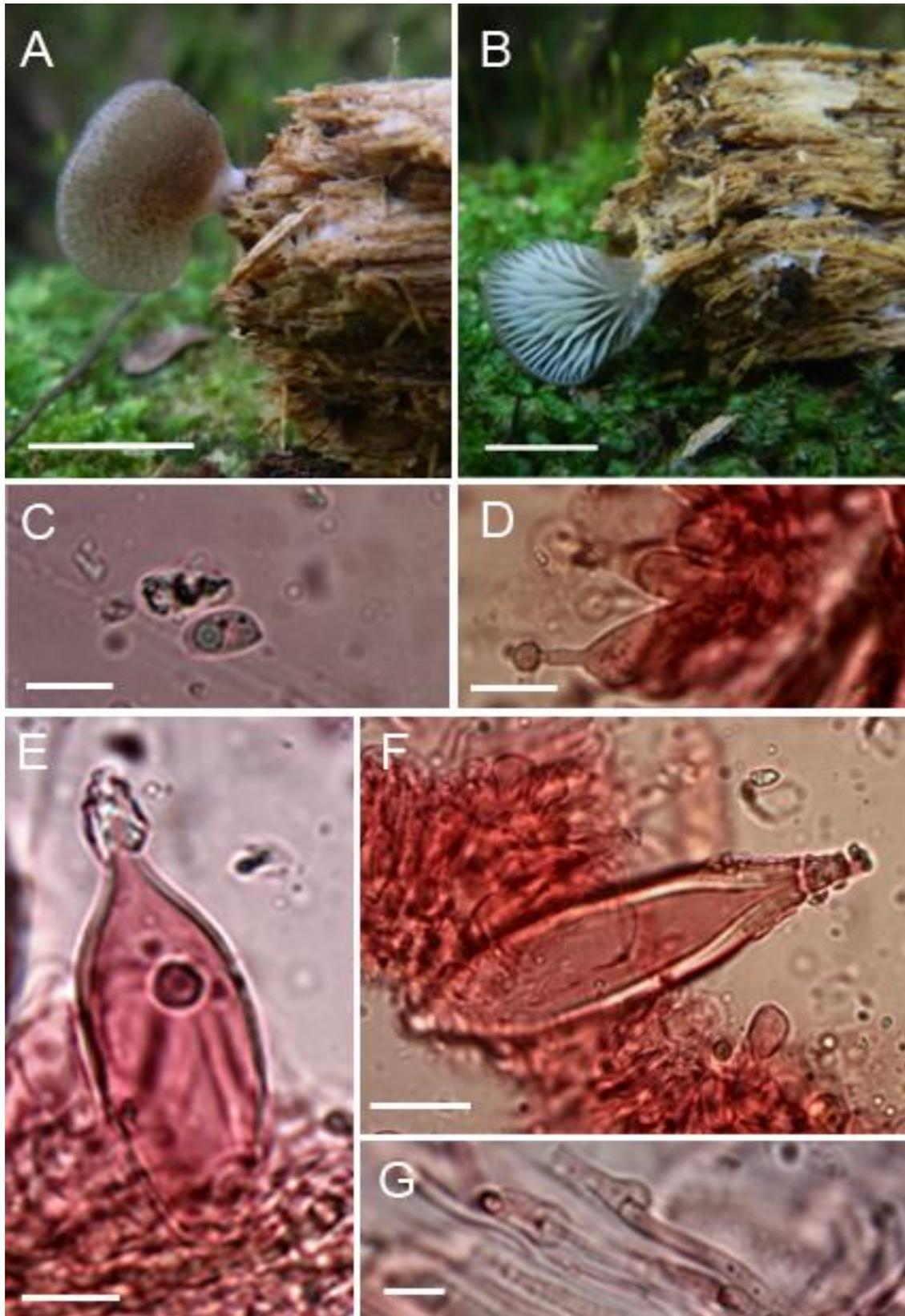


FIGURA 1: A, B – BASIDIOMA; C – ESPORO; D – QUEILOCISTIDIO; E, F – METULOIDES; G- FÍBULA. ESCALA: A, B- 10 mm; C, D, E, F, G – 10 μ m.

4.2 CULTIVO E MANUTENÇÃO DO *HOHENBUEHELIA MASTRUCATA*

O fungo do gênero *Hohenbuehelia* demonstrou uma certa dificuldade no isolamento. Foram coletadas sete amostras de fungos do gênero *Hohenbuehelia*, porém, após inúmeras tentativas de isolamento, apenas uma teve sucesso. A dificuldade foi obter um cultivo livre de contaminantes. As amostras coletadas a campo encontravam-se extremamente contaminadas com outros microrganismos que, ao isolar em meio de cultivo BDA. Os microrganismos mais agressivos e expressivos se desenvolviam mais rápido, o que inibia o crescimento micelial de *H. mastrucata*. Após inúmeras tentativas de isolamento, o isolado 436, coletado no dia 25/05/2015 é que obteve sucesso no crescimento micelial.

A amostra apresentou um crescimento micelial radial de forma uniforme, branco e longitudinal (FIGURA 2 A-B). O crescimento ocorreu de forma satisfatória cobrindo toda a superfície da placa em sete dias. As hifas são septadas com fíbulas e apresentam células adesivas (FIGURA 2 C-D).

4.3 OBTENÇÃO E CONSERVAÇÃO DE *MELOIDOGYNE INCOGNITA*

Quanto ao comportamento dos fitonematoides avaliados, foram observados fitonematoides vermiformes e globosos (fêmea). A identificação constatou ser o nematoide de galha da espécie *Meloidogyne incognita* através da configuração do corte perineal característico da espécie.

O movimento do *M. incognita* é ondulatório (FIGURA 2 D), e apresenta aparelho bucal do tipo odontoestilete (FIGURA 2 E), caracterizando seu hábito de vida como nematoide ectoparasita que sobrevive no subsolo próximo a rizosfera, onde o estilete é utilizado para penetrar na raiz, extrair o conteúdo nutritivo da planta e injetar toxinas.

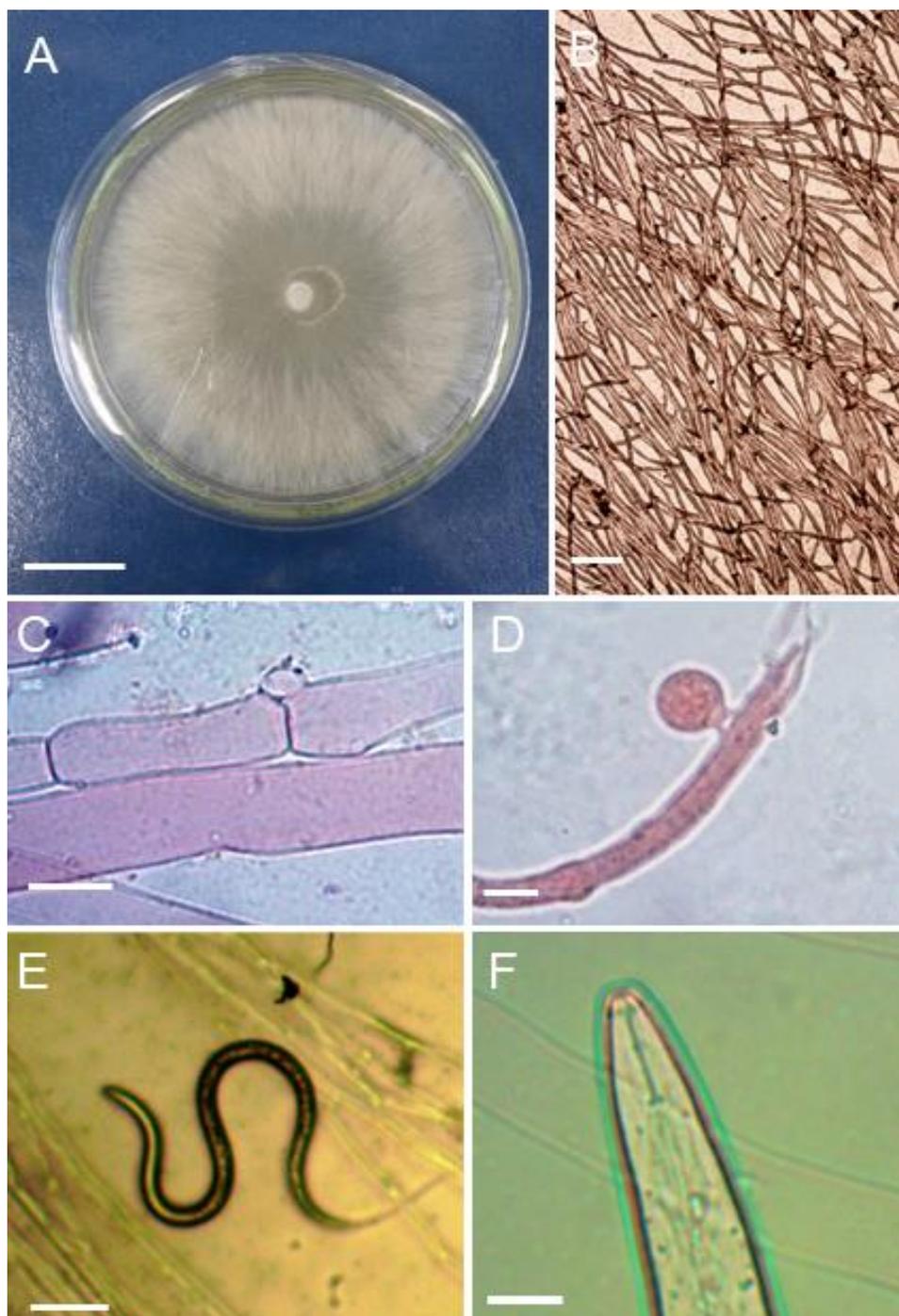


FIGURA 2: A, B - CRESCIMENTO MICELIAL EM BDA; C – SEPTO E FÍBULA OBSERVADO NO ANAMORFO; D- CÉLULA ADESIVA; E – MOVIMENTO ONDULATÓRIO DE *MELOIDOGYNE INCOGNITA*; F- DETALHES DO APARELHO BOCAL DO TIPO ODONTOESTILETE. ESCALA: A - 20 mm; B, E - 0,05 mm; C, F - 10 μ m; D - 5 μ m.

4.4 TESTES E AVALIAÇÃO DE BIOCONTROLE *IN VITRO*

A partir das observações das placas de ágar-água contendo os nematoides e o fungo, foi constatado controle positivo quanto a predação. Foi observado através dos registros fotográficos a preparação das hifas um dia após a adição dos nematoides, criando anéis (FIGURA 3 A). No segundo dia foi observado o nematoide próximo à célula adesiva (FIGURA 3 B), enquanto que no terceiro dia as hifas imobilizaram o nematoide (FIGURA 3 C). A comprovação da predação se deu a partir do quarto dia (FIGURAS 3 D-E). As análises encerraram-se após 5 dias de observações, pois os nematoides predados apresentaram a estrutura corporal altamente desintegrada e consumida pelas hifas (FIGURA 3 F).

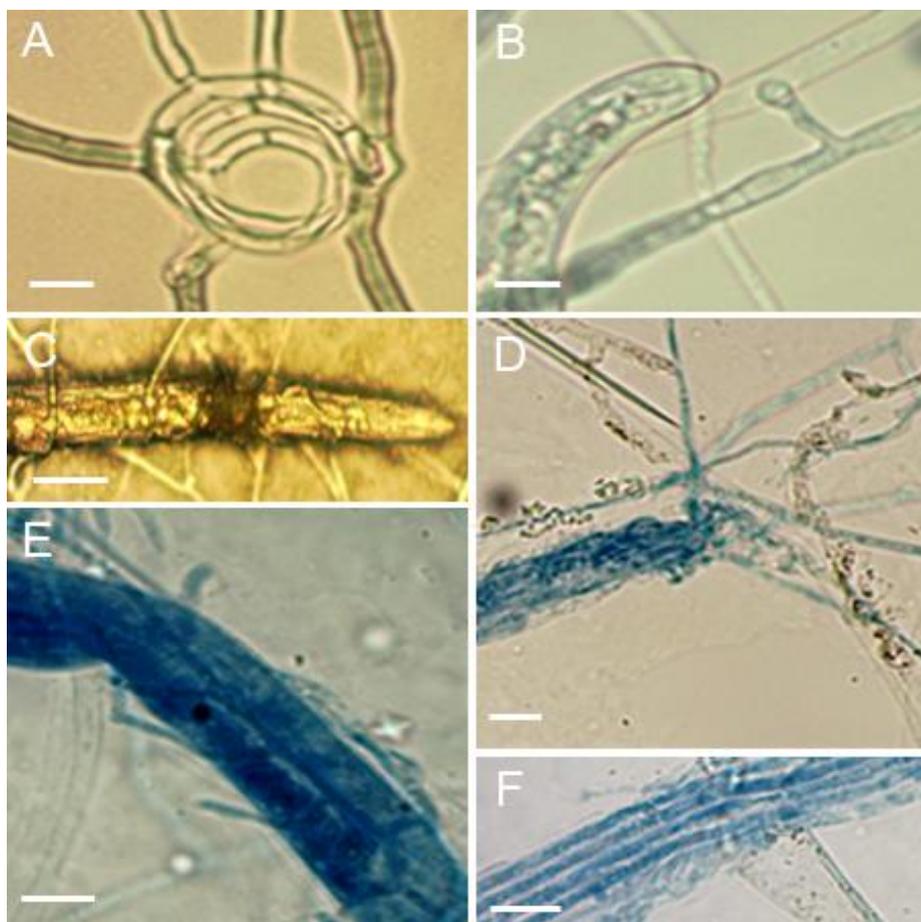


FIGURA 3: A - ANÉIS FORMADOS PELA HIFA NA PRESENÇA DO NEMATOIDE; B-CÉLULA ADESIVA; C- IMOBILIZAÇÃO DO NEMATOIDE PELA HIFA; D, E, F - PREDUÇÃO DO NEMATOIDE. ESCALA A, C, D- 2 μ m; B, E, F - 10 μ m.

Quanto as avaliações quantitativas, foi anotado a percentagem de nematoides predados a cada dia de observação, sendo realizado o teste de média (TABELA 1). No primeiro dia, não ocorreu nenhuma predação não diferindo estatisticamente do segundo dia, onde a predação foi relativamente baixa, igualando ao terceiro dia. Este por sua vez não difere do quarto dia, sendo que o maior índice de predação ocorreu no último dia. A testemunha apresentou um alto índice populacional. De modo geral, para as 10 repetições não houve necessidade de transformar os dados, sendo aplicado o teste Tukey a 5% de probabilidade.

TABELA 1: TESTE DE MÉDIA DOS NEMATOIDES PREDADOS

Tratamento	Médias
1° Dia	0,0 a
2° Dia	2,0 ab
3° Dia	4,3 bc
4° Dia	6,4 cd
5° Dia	10,3 d
Testemunha	25,1 e

*As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente a 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

Analisando-se os dados após a aplicação do teste de médias, verifica-se que, em relação a primeira variável (1° dia) a percentagem da predação de nematoides foi nula. *Hohenbuehelia mastrucata* demonstra controlar significativamente *M. incognita* a partir da terceira variável (3° dia), sendo altamente eficientes em imobilizar e predar, reduzindo a população de nematoides em média de 44,21%, no quinto dia de análise sendo altamente significativa (FIGURA 4).

O uso de controle biológico por fungos nematófagos vem se tornando uma atividade promissora. Porém, existem pouquíssimos trabalhos referem à patogenicidade de espécies *Hohenbuehelia* (ou da fase anamórfica *Nematoctonus*) a fitonematoides. Thorn E Barron (1986), Barron (2003) e Putzke et al, (2007) são os principais, trabalhos realizados para esse gênero.

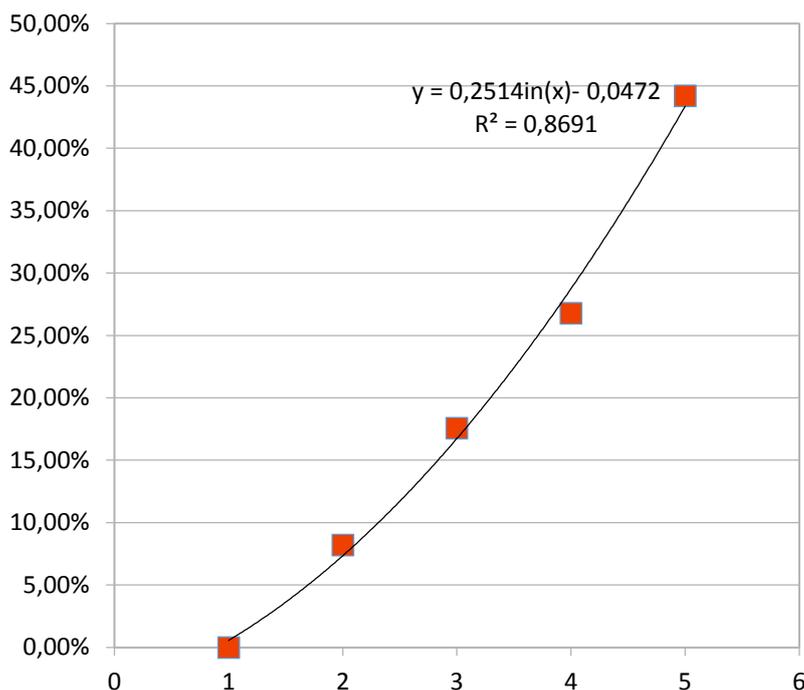


FIGURA 4: EVOLUÇÃO DA PREDUÇÃO DE NEMATÓIDES EM 5 DIAS.

Putzke *et al* (2007) descreve que no teste de patogenicidade *in vitro* de *M. javanica*, a espécie *Hohenbuehelia portegna* imobilizou e consumiu 39,44% da população no quinto dia, o que demonstra que a espécie *H. mastrucata* é mais eficiente na predação em relação ao *H. portegna*, porém, é menos eficiente que *H. paraguayensis constatado* no mesmo experimento que predou 84,96% da população de nematoides no quinto dia.

Segundo Thorn e Barron (1986), os caracteres desenvolvidos na fase anamórfica de *Hohenbuehelia* baseiam-se principalmente nas características das hifas vegetativas, estruturas adesivas e tipo de conídio formado. Putzke *et al* (2007) levantam a possibilidade da fase anamórfica de *Hohenbuehelia* (*Nematoctonus*) também produzir toxina. Os mesmos referem que nematoides foram imobilizados por contato com conídios em germinação de *Nematoctonus*. Porém, o presente trabalho isolou apenas a partir da fase teleomórfica de *H. mastrucata*, não sendo possível visualizar tais constatações.

Putzke *et al.*(2007) cita também, que é exclusivo do gênero o sistema de captura das espécies de *Hohenbuehelia*, sendo que este desenvolve a hifa especializada com extremidade gelatinosa para fixar-se aos nematoides quando percebe a presença deste. Porém BARRON (2003) demonstram que estruturas

semelhantes ocorrem em outros gêneros de fungo como em micélio de *Conocybe lactea* (Bolbitiaceae).

Ao averiguar sobre controle biológico de fitonematoides utilizando outros gêneros de fungos, verificou-se que Castro *et al.* (2000) testou, *in vitro*, a capacidade de predação de *Arthrobotrys musiformis* sobre *Meloidogyne incognita*. O resultado demonstrou ao sexto dia de avaliação 53% dos juvenis predados. Maia (2000) obteve um isolado de *Monacrosporium robustum* cuja patogenicidade a juvenis de segundo estágio de *M. incognita* foi de 100% no primeiro após a adição dos juvenis à cultura do fungo. Maia *et al.* (2001) verificou que o mesmo fungo capturou 100% das formas ativas dos juvenis de *H. glycines* após 24 horas do início da incubação. Enquanto que Bernardo e Santos, (2004) constatou que o mesmo fungo predou 100% de *Rotylenchulus reniformis* após 3 dias de adição do nematoide às culturas do fungo.

Essa diferença de predação pelos diferentes gêneros de fungos pode ser explicada por Nordbring-Hertz (1972) que demonstrou a existência da especificidade do fungo com relação ao nematoide, e que esta é de natureza bioquímica. Segundo Spiegel *et al.*, 1982, citado por Ribeiro (1999) o ácido siálico pode estar presente no gênero *Meloidogyne* 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 devido ao fato de isolados de gêneros diferentes de fungos são procedentes de regiões geográficas diferentes, o que *in vitro* variam quanto a capacidade predatória.

Para corroborar os resultados obtidos *in vitro* por esse trabalho, testes a campos devem ser realizados. Segundo Regina e Carneiro (1992), para um agente de controle biológico seja efetivo no solo, deve apresentar 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.

5 CONCLUSÃO

O teste de predação foi positivo, sendo possível cumprir com o objetivo proposto:

1. Foi coletado espécies do gênero *Hohenbuehelia*
2. A partir de um conjunto de características, identificou como *H. mastrucata*
3. O teste de biocontrole *in vitro* foi positivo, sendo que o *H. mastrucata* demonstrou habilidade na predação de *M. incognita*, apresentando redução de quase metade da população em cinco dias de análise.

Vale ressaltar que esta interação deve ser amplamente estudada, visto que as ações predatórias das células adesivas são conhecidas apenas em ambientes *in vitro*. Testes a campo devem ser realizados para corroborar a ação nematófoga do fungo em questão. Espera-se que outras espécies nativas do gênero venham a ser isoladas e testadas, a fim de ampliar o conhecimento sobre a ação nematófoga e suas expectativas no controle biológico.

REFERÊNCIAS

AHREN, D.; TUNLID, A. **Evolution of parasitism in nematode-trapping fungi.** Journal of Nematology, Lawrence v. 35, n. 2, p. 194-197, 2003.

BERGAMIN FILHO, A. *et al.* **Manual de Fitopatologia.** 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.

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

BARRON, G. L. **Predatory fungi, wood decay, and the carbon cycle.** Biodiversity, 4:1, 3:9. 2003.

CARDOSO, E. R. **Fungos nematófagos em diferentes solos e caracterização fisiológica de *Arthrobotrys oligospora*.** 63 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho" São Paulo, 2007.

CARNEIRO, R. M. D. G. **Princípios e tendências do controle biológico de nematóides com fungos nematófagos.** Pesq. Agropec. Bras. Brasília, v. 27, n. s, p. 113-121, 1992

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

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

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. 2013. **Acompanhamento da Safra Brasileira 2013/2014**. Disponível em <<http://www.conab.gov.br>> Acesso em 09 de maio de 2015.

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.

EMBRAPA Soja. Sistemas de Produção I. 2003. **Tecnologias de produção da soja, região central do Brasil 2003**. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br> > Acesso em 10 de maio de 2015.

FIORENTIN, F. **Identificação de *Meloidogyne* spp. em reservas legais e avaliação do parasitismo de *Meloidogyne incognita* raça 03 e *M. javanica* em plantas nativas do Oeste Paranaense**. Dissertação (Mestrado em Agronomia) Programa de Pós-graduação em Agronomia. Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Marechal Cândido Rondon. 2010

FRANZENER G, UNFRIED JR, STANGARLIN JR, FURLANETTO C. **Nematoides formadores de galha e de cisto patogênicos a cultura da soja em municípios do Oeste do Paraná**. Nematologia Brasileira 29:261-265. 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.

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

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

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

JENKINS, W. R. **A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil**. Plant Disease Reporter, v. 48, n. 9 p. 692, 1964.

KORNERUP A, WANSCHER JH. 1978. **Methuen Handbook of Colour**. 3rd. ed. London, Eyre Methuen. 1978.

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

KUO, M. **Hohenbuehelia mastrucata**. Retrieved from the Mushroom Expert. April 2007. Disponível em <<http://www.mushroomexpert.com> > Acesso em 15 de maio de 2015.

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

LOPES, E. A. **Formulação de condicionadores de solo com propriedades Nematicidas**. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, 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. dos; Di MAURO, A. O. **Estudo ‘*in vitro*’ da habilidade predatória de *Monacrosporium robustum* sobre *Heterodera glycines***. Fitopatologia Brasileira, Brasília, v.26, n.4, p.732-736, 2001.

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

MITKOWSKI, N.A. and G.S. Abawi.. **Nematoide das galhas**. (Portuguese translation by E.A, Lopes, R. Dallemole-Giaretta, and B.S.Vieira, 2011). The Plant Health Instructor. 2003.

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

PROITE, K. **Busca de genes envolvidos na resistência de Amendoim Silvestre ao Nematóide de Galha (*Meloidogyne arenaria*)**. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) – Programa de pós-graduação em Biologia Molecular Departamento de Biologia molecular. Universidade de Brasília. 2007.

PUTSKE J.; CAVALCANTI MA. **O gênero *Hohembuehelia* Schulzer (Basidiomicota, Agaricales) no Rio Grande do Sul**. Caderno de pesquisa sér. Bot., 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 Volume 19 (3): 38-81. 2007.

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

RIBEIRO, R.C. F. **Avaliação da eficiência de isolados de *Monacrosporium spp.* no controle de *Meloidogyne javanica* e *Heterodera glycines***. Tese apresentada ao Curso de Fitopatologia, UFV, MG. 87p. 1999.

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.

SHIGUERITO, D. **Tecnologia “kit de cultivares de café resistentes aos nematóides” na viabilização da cafeicultura em áreas infestadas**. Tese (Doutorado em Fitossanidade) - Programa de pós-graduação em Agronomia, Universidade Estadual de Londrina, 2010.

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

TAYLOR, A. L.; SASSER, J. N. **Biología, identificación y control de los nematodos del nódulo de la raíz**. Carolina del Norte: Agencia de Estados Unidos para Desarrollo Internacional, 1983.

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

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 vol. XXV n°2 pp. 3321-453. 1986

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