

GUILHERME SILVA DE PODESTÁ

**APLICAÇÃO DE *Pochonia chlamydosporia* EM PRÉ-PLANTIO
PARA POTENCIALIZAR O CONTROLE DE *Meloidogyne
javanica* EM TOMATE E ALFACE**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Fitopatologia, para obtenção do título
de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2010

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

P742a
2010

Podestá, Guilherme Silva de, 1983-

Aplicação de *Pochonia chlamydosporia* em pré-plantio para potencializar o controle de *Meloidogyne javanica* em tomate e alface / Guilherme Silva de Podestá. – Viçosa, MG, 2010.

ix, 40f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Leandro Grassi de Freitas.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 32-40.

1. *Meloidogyne javanica* - Controle biológico.
 2. *Pochonia chlamydosporia*. 3. Tomate. 4. Alface.
- I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 592.57

GUILHERME SILVA DE PODESTÁ

**APLICAÇÃO DE *Pochonia chlamydosporia* EM PRÉ-PLANTIO
PARA POTENCIALIZAR O CONTROLE DE *Meloidogyne
javanica* EM TOMATE E ALFACE**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Fitopatologia, para obtenção do título
de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 14 de julho de 2010.

Prof. Silamar Ferraz
(Coorientador)

Prof. Luiz Antonio Maffia

Prof^a. Rosangela Dallemole-Giaretta

Pesq. Trazilbo José de Paula Júnior

Prof. Leandro Grassi de Freitas
(Orientador)

“A nossa maior glória não reside no fato de nunca cairmos, mas sim em levantarmo-nos sempre depois de cada queda”.

Confúcio.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Ernani Ornelas de Podestá e Silvana Márcia da Silva Podestá, pela educação, amor incondicional, conselhos e ensinamentos em todos os momentos da minha vida.

À minha querida namorada Tatiane de Souza Vilela, pelo carinho, companheirismo e dedicação durante bons e maus momentos.

Aos meus irmãos Valéria e Otávio, assim como a todos os meus familiares pela confiança e amizade durante esta jornada.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), em especial ao Departamento de Fitopatologia, pela oportunidade da realização do curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.

Ao meu orientador professor Leandro Grassi de Freitas, pela atenção contínua, amizade, ensinamentos, pelos conselhos e oportunidades, e principalmente pela confiança depositada durante todo este período de convivência.

Aos professores Silamar Ferraz e Olinto Liparini Pereira, pelas críticas, pela colaboração e pelas sugestões na elaboração deste trabalho.

Ao professor Luiz Antonio Maffia, à professora Rosangela Dallemole-Giaretta e ao pesquisador Trazilbo José de Paula Júnior pelas sugestões para a correção deste trabalho.

Ao professor Francisco Xavier do Vale e ao seu orientado Eder, pela colaboração na execução da análise estatística dos experimentos.

Agradeço aos professores da UFV, principalmente do Departamento de Fitopatologia pela amizade e contribuição para a minha formação profissional.

Aos colegas do Grupo de Estudos Avançados em Fitopatologia (GEAFIP), pelas experiências e amizade.

Agradeço especialmente aos amigos do laboratório de controle biológico de fitonematoides, Paulo Afonso, Deisy, Vanessa, Murilo, Leonardo, Marilene, Fernanda, Alessandro, José Ricardo, Érica, Hugo, Michelle, além dos que passaram por lá, pela amizade, pela ajuda e pelo agradável convívio.

A todos os amigos de Viçosa, em especial ao Alan, Danilo, Geice, Talita, Thiago, Vinícius e Nolan pelos ótimos momentos de convivência e apoio em todos os momentos.

Aos colegas do Departamento de Fitopatologia, principalmente Douglas, Marcela e Poliene, que adentraram ao programa junto comigo, pela amizade, apoio e convivência durante todo o curso.

Aos funcionários, amigos e àqueles que contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

Guilherme Silva de Podestá, filho de Ernani Ornelas de Podestá e Silvana Márcia da Silva Podestá, nasceu em Cabo Verde, Minas Gerais, em 1º de Janeiro de 1983.

Em 2008, graduou-se em Engenharia Agrônômica pela Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - Minas Gerais.

Em Agosto de 2008, iniciou o Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa, em nível de mestrado.

SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT	ix
1 – INTRODUÇÃO	1
2 – REVISÃO DE LITERATURA	3
3 – MATERIAL E MÉTODOS	8
3.1. PROCEDIMENTOS GERAIS	8
3.1.1. Obtenção e preparo do inóculo	8
3.1.2. Preparo do solo	8
3.1.3. Preparo das mudas	9
3.1.4. Obtenção do fungo.....	9
3.1.5. Obtenção do inóculo de <i>Pochonia chlamydosporia</i>	9
3.1.6. Análise estatística	9
3.2. Época de aplicação de <i>Pochonia chlamydosporia</i> para o controle de <i>M. javanica</i> em tomate.....	10
3.3. Época de aplicação de <i>Pochonia chlamydosporia</i> para o controle de <i>M. javanica</i> em alface.....	11
4 – RESULTADOS	14
4.1. Época de aplicação de <i>Pochonia chlamydosporia</i> pra o controle de <i>M. javanica</i> em tomate e alface.....	14
4.1.1. Experimentos com tomate.....	14
4.1.2. Experimentos com alface	20
5 – DISCUSSÃO	27
6 – CONCLUSÃO.....	31
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32

RESUMO

PODESTÁ, Guilherme Silva de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2010. **Aplicação de *Pochonia chlamydosporia* em pré-plantio para potencializar o controle de *Meloidogyne javanica* em tomate e alface.** Orientador: Leandro Grassi de Freitas. Coorientadores: Silamar Ferraz e Olinto Liparini Pereira.

O fungo *Pochonia chlamydosporia* age sobre o nematoide das galhas ao parasitar seus de ovos antes que os juvenis eclodam. Nesse trabalho avaliou-se o efeito do tempo de aplicação do fungo ao solo infestado com o nematoide, antes do transplântio das mudas de tomate e alface, sobre a redução da população do nematoide e de seus sintomas causados na planta hospedeira. O inóculo do fungo foi obtido cultivando-se o isolado PC-10 de *P. chlamydosporia* em arroz por 21 dias a 26°C. Foram conduzidos dois experimentos com tomate em casa-de-vegetação, com diferentes doses e tipos de inóculos de *P. chlamydosporia*, no primeiro, utilizaram-se 5 g do inóculo fúngico, composto apenas de micélio, por quilograma de solo. No segundo experimento, aplicaram-se 3 g do inóculo, por quilograma de solo, o que equivale a $3,01 \times 10^4$ clamidósporos/g de solo. Com alface, também dois experimentos foram conduzidos em casa-de-vegetação, nos quais cada vaso foi infestado com 3.500 ovos de *M. javanica* e, em seguida, para cada quilograma de solo, aplicaram-se 5 g do inóculo fúngico, contendo $5,10 \times 10^4$ e $5,35 \times 10^4$ clamidósporos/g de solo, no primeiro e segundo experimento respectivamente. Utilizaram-se mudas de tomate cultivar Santa Clara com 21 dias de idade e de alface cultivar Babá de Verão com 15 dias de idade, ambas transplantadas nos períodos de 0, 5, 10, 15 ou 20 dias após a incorporação ao solo do inóculo do fungo e do nematoide. Ao início e ao final do experimento, coletou-se uma amostra composta por 3 g de solo por vaso de cada tratamento, para determinar a população do fungo no solo. Decorridos 50 dias do transplântio das mudas, avaliaram-se o peso da parte aérea, altura das plantas, peso das raízes, número de galhas e número de ovos por planta. A população de *Pochonia chlamydosporia* no solo, sem a presença das plantas cresceu, atingindo o seu máximo aos 10 dias após a sua incorporação no solo. Ao final dos experimentos, o número de unidades formadoras de colônias (UFC) do fungo no solo se manteve alta o suficiente para atuar no ciclo subsequente das

culturas. Para ambas as culturas, maior controle do número de galhas e ovos de *M. javanica* foi obtido com o aumento do tempo de contato do fungo com o nematoide no solo antes do transplântio das mudas. No segundo experimento, em ambas as culturas, houve aumento do peso da parte aérea das plantas com o aumento do tempo decorrido do preparo do solo até o transplântio das mudas. Quanto à altura das plantas e o peso das raízes, não se observou diferença em relação ao tratamento testemunha.

ABSTRACT

PODESTÁ, Guilherme Silva de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2010. **Pre-planting application of *Pochonia chlamydosporia* to improve the control of *Meloidogyne javanica* in tomato and lettuce.** Advisor: Leandro Grassi de Freitas. Co-advisors: Silamar Ferraz and Olinto Liparini Pereira.

The fungus *P. chlamydosporia* acts on populations of the root-knot nematode by parasitizing their eggs before they hatch, preventing the release of the juveniles. In this study, the effect of time the fungus is applied into the soil infested with the nematode, before the transplanting of the tomato and lettuce seedlings, on the reduction of the nematode population and of the symptoms in the host plant. The PC-10 isolate of *P. chlamydosporia* was grown on rice for 21 days at 26°C. Two experiments were run with tomato in the greenhouse with different rates and types of *P. chlamydosporia* inocula. In the first trial, 5 g of fungal inoculum, consisting only of mycelium, were used per kg of soil. In the second, 3 g of inoculum were applied per kg of soil, which provided a concentration of 3.01×10^4 chlamydospores/g of soil. With lettuce, two experiments were also carried out, and each pot was infested with 3,500 eggs of *M. javanica*, then, for each kg of soil, 5 g of fungal inoculum containing 5.10×10^4 and 5.35×10^4 chlamydospores/g of soil were applied, in the first and second experiments, respectively. 21 days old tomato seedlings cv. Santa Clara and 15 days old lettuce seedlings cv. Babá de Verão, were transplanted at 0, 5, 10, 15 or 20 days after incorporation into the soil of the fungus and nematodes. A composite soil sample of each treatment was obtained by collecting 3 g of soil per pot, to determine the population of the fungus in the soil at the beginning and at the end of the experiment. After 50 days of the transplanting, weight of shoot, plant height, root weight, number of galls and number of eggs per plant were evaluated. The concentration of *P. chlamydosporia* colony forming unit (CFU) in the soil without the plants increased with the time, reaching its maximum at 10 days after its incorporation into the soil. At the end of the experiments, the population of the fungus in the soil remained high enough to act in subsequent cycle of the crops. For both crops, the highest control of *M. javanica* was obtained by increasing the time in which the fungus and the nematode were together into the soil before transplanting seedlings. In the second experiment, for both crops, increase the shoot weight with increasing

the time in between the fungus application and the transplanting of seedlings. As for the height and weight of roots, there was no difference in relation to the control treatment.

1 – INTRODUÇÃO

O tomate (*Solanum lycopersicum* L.) está entre as hortaliças mais cultivadas no mundo, com produção de 130 milhões de toneladas ao ano, em mais de 160 países. O Brasil é o oitavo produtor mundial com aproximadamente quatro milhões de toneladas ao ano. No país, é a 11^a commodity mais produzida (FAO, 2008).

A alface (*Lactuca sativa* L.) é outra hortaliça que possui grande importância mundial, sendo cultivada em mais de 90 países, com uma produção de 23 milhões de toneladas ao ano (FAO, 2008). No Brasil, é a hortaliça folhosa de maior importância econômica, com produção em todos os estados do país.

Os fitonematoides, principalmente *Meloidogyne* spp., constituem um dos problemas mais sérios para o tomateiro. Segundo estudo realizado em conjunto por nematologistas de todo o mundo na década de 1980, as perdas devido aos nematoides chegaram a 20,6% da produção anual de tomate (Sasser & Freckman, 1987). Quando o ataque é muito severo, devido à elevada densidade populacional deste patógeno no solo e alta suscetibilidade da cultivar, as perdas na cultura podem chegar a 100% (Tihohod, 1993). Em plantações atacadas pelos nematoides das galhas, as plantas apresentam tamanho reduzido, murcha nas horas mais quentes do dia, folhas amareladas, sintomas que se assemelham à deficiência nutricional, devido à formação das células gigantes na região vascular das raízes, que rompem o fluxo de água e nutrientes do solo para a parte aérea das plantas (Charchar & Aragão, 2003).

Plantações de alface têm sido muito afetadas por problemas de infestação por nematoides das galhas, especialmente *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood e *Meloidogyne javanica* (Treib.) Chitwood, sendo estes considerados um dos maiores problemas fitossanitários da cultura. A maioria das cultivares de alface disponível aos agricultores tem alta suscetibilidade a estes patógenos (Lordello & Marini, 1974; Campos, 1985; Charchar & Moita, 1996; Mendes, 1998). Plantas de alface, atacadas por nematoides apresentam-se menos desenvolvidas, com cabeça de tamanho

reduzido, pequeno volume foliar e sem valor para o consumo *in natura* (Charchar & Moita, 1996).

Para o manejo desses fitonematoides, o princípio da exclusão é o mais importante, pois uma vez presentes na área, a erradicação é praticamente impossível (Ferraz *et al.*, 2001). Quando a área já está infestada, as medidas mais adotadas para a redução nas populações desse patógeno são a rotação de culturas, utilização de cultivares resistentes e o controle químico. Em geral, há problemas associados a essas medidas de controle. Assim, novos métodos para o controle destes patógenos vêm sendo estudados, como é o caso do controle biológico, que é específico e não causa danos ao meio ambiente e ao ser humano (De Leij & Kerry, 1991; Campos & Campos, 1997; Freitas *et al.*, 2000). Hoje são conhecidos mais de 200 organismos considerados inimigos naturais dos fitonematoides e, entre eles, destacam-se os fungos e bactérias (Kerry, 1990; Freitas *et al.*, 2009).

O fungo *Pochonia chlamydosporia* Zare & Gams (sin. *Verticillium chlamydosporium* Goddard) é um dos mais promissores agentes de controle biológico de nematoides (Kerry & Bourne, 1996; Lopes *et al.*, 2007; Freitas *et al.*, 2009). Ele se desenvolve na superfície das raízes e parasita ovos e fêmeas de nematoides das galhas e dos cistos (Stirling, 1991). Sua efetividade no controle de *Meloidogyne* spp. já foi comprovada em vários estudos (De Leij & Kerry, 1991; Campos & Campos, 1997; Lopes *et al.*, 2007; Freitas *et al.*, 2009; Podestá *et al.*, 2009). Entretanto ainda há vários aspectos da interação do fungo com a planta hospedeira, a microbiota nativa do solo e com o nematoide que necessitam ser investigados para aumentar sua eficiência. Neste contexto, o objetivo do trabalho foi: Determinar a melhor época para a aplicação de *Pochonia chlamydosporia*, isolado PC-10, no controle de *M. javanica* em tomate e em alface.

2 – REVISÃO DE LITERATURA

O controle biológico de fitonematoides é a redução de populações de nematoides por meio da ação de organismos vivos, que não plantas resistentes (Stirling, 1991). Em condições de campo, o controle biológico pode ocorrer naturalmente pela presença de antagonistas na área, ou ser realizado com a introdução de organismos ou modificação do ambiente, visando o aumento das populações de antagonistas presentes no solo (Jatala, 1986; Stirling, 1991; Ferraz & Santos, 1995).

O solo é um ambiente muito complexo, onde a atividade dos nematoides é influenciada por vários fatores: características físicas, químicas, umidade, aeração, além de grande número de organismos, como nematoides predadores, bactérias, fungos, algas, protozoários, insetos, ácaros e outros animais do solo. Desses microrganismos, os de maior potencial para o controle biológico são os fungos e as bactérias (Jatala, 1986; Stirling, 1991; Ferraz & Santos, 1995; Freitas *et al.*, 2009).

Um fungo que vem se destacando pelo potencial de controle de fitonematoides é *Pochonia chlamydosporia* Zare & Gams (sin. *Verticillium chlamydosporium* Goddard). Esse fungo foi relatado parasitando ovos de *Heterodera schachtii* Schmidt Willcox & Tribe (1974), e posteriormente, de *Heterodera avenae* Wollenweber Kerry (1975), a ponto de causar supressão desses dois fitonematoides no campo em condições naturais. Ovos e fêmeas de *Meloidogyne arenaria* (Neal) Chitwood parasitados por *P. chlamydosporia* foram observados por Morgan-Jones *et al.* (1981) e Godoy *et al.* (1983). Posteriormente, o mesmo ocorreu com várias outras espécies do gênero (Freire & Bridge, 1985; Ribeiro & Campos, 1993; Hidalgo-Diaz *et al.*, 2000; Sun *et al.*, 2006). Em plantações de algodão no Arkansas, constatou-se que *P. chlamydosporia* também parasita ovos de *Rotylenchulus reniformis* Linford & Oliveira (Wang *et al.*, 2005). No Brasil, este organismo foi encontrado parasitando ovos e fêmeas de *M. incognita* (Kofoid & White) Chitwood pela primeira vez, em estudo realizado por Freire & Bridge (1985).

O potencial do fungo como agente de controle biológico vem sendo estudado para outros patógenos habitantes do solo. Jacobs *et al.* (2003), em

estudo sobre a interação de fungos nematófagos e saprofíticos, observaram que *P. chlamydosporia* reduziu o crescimento de *Rhizoctonia solani* e *Fusarium oxysporum*, *in vitro*. Este antagonista também foi capaz de reduzir a colonização do sistema radicular de plantas de trigo por *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (Monfort *et al.*, 2005).

Pochonia chlamydosporia tem muitas características desejáveis, relacionadas ao controle biológico. Em vista de sua atividade saprofítica, o fungo pode sobreviver no solo mesmo na ausência do nematoide (Kerry *et al.*, 1982; Stirling, 1991). Além disso, é capaz de colonizar a superfície das raízes de muitas espécies de plantas, sendo capaz de eliminar grande quantidade de ovos produzidos pelos nematoides das galhas (Stirling, 1991). Outra característica importante é a produção de clamidósporos, estruturas de sobrevivência. Esse fungo também possui a capacidade de colonizar raízes endofiticamente, o que favorece o seu estabelecimento no solo e promove o crescimento das plantas (Lopez-Llorca *et al.*, 2002; Monfort *et al.*, 2005; Dallemole-Giaretta *et al.*, 2006; Ebadi *et al.*, 2009; Freitas *et al.*, 2009; Maciá-Vicente *et al.*, 2009).

Segundo Morgan-Jones *et al.* (1983), *P. chlamydosporia* parasita os ovos de nematoides levando os juvenis à morte. Após a hifa penetrar no ovo, ocorre a dissolução enzimática das camadas de quitina e de lipídios. Além do efeito direto do parasitismo de *P. chlamydosporia* sobre o embrião, o efeito enzimático sobre a casca do ovo aumenta sua permeabilidade e facilita a passagem de possíveis toxinas produzidas pelo fungo no ambiente, pois os juvenis de segundo estágio (J₂) não eclodem na presença do fungo (Stirling, 1991). Apesar de os clamidósporos serem as formas mais eficientes de inóculo, por favorecer o estabelecimento do fungo e a sobrevivência por longos períodos no solo (Kerry, 2001), o micélio também pode ser usado como fonte de inóculo para o controle do nematoide das galhas (Mukhtar & Pervaz, 2003; Khan *et al.*, 2001).

Outra vantagem desse antagonista é sua capacidade de colonizar a rizosfera de várias espécies de plantas, mesmo na ausência de nematoides (Bourne *et al.*, 1994; Bourne *et al.*, 1996; Bordallo *et al.*, 2001; Monfort *et al.*, 2005; Maciá-Vicente *et al.*, 2009). *Pochonia chlamydosporia* coloniza o sistema

radicular de cevada, desenvolvendo-se no rizoplano com grande crescimento micelial na região das junções celulares, onde a concentração de exsudatos é alta, proporcionando a formação de muitos clamidósporos. Após a formação do apressório, a hifa penetra nas células epidermais e coloniza até as células do córtex, não atingindo os feixes vasculares. Três semanas após a inoculação de *P. chlamydosporia*, é possível observar modificações celulares, como gotículas fenólicas e deposições de calose, o que pode ser um indicativo de indução de resistência mediada pela colonização do sistema radicular pelo fungo (Lopez-Llorca *et al.*, 2002).

A capacidade de colonizar endofiticamente raízes de cevada foi também relatada por Marciá-Vicente *et al.* (2009). Colonização do sistema radicular de pistache por dois isolados de *P. chlamydosporia* foi observada por Ebadi *et al.* (2009). A partir de tais resultados, pode-se inferir que as raízes, assim como os nematoides que as infectam, são importantes fontes de alimento para o fungo, o que garante sua persistência no solo.

A efetividade de *P. chlamydosporia* como agente de controle biológico de *Meloidogyne* spp. já foi comprovada em vários estudos (De Leij & Kerry, 1991; Campos & Campos, 1997; Bourne & Kerry, 1999; Bourne & Kerry, 2000; Mukhtar & Pervaz, 2003; Dallemole-Giaretta, 2008; Freitas *et al.*, 2009; Podestá *et al.*, 2009). Ao estudar o potencial de vários fungos nematófagos para o controle de *M. javanica* em tomateiro, Lopes *et al.* (2007) observaram que dois isolados de *P. chlamydosporia* reduziam o número de ovos em mais de 75%. Dallemole-Giaretta (2008), trabalhando com o mesmo patossistema, observou reduções de 21% e 60% no número de galhas e de ovos, respectivamente.

Existem diferenças na competência saprofítica e na capacidade de predação de ovos do nematoide entre isolados de *P. chlamydosporia*, assim como diferenças de hospedabilidade do sistema radicular de diferentes espécies de plantas ao fungo, o que resulta em níveis diferentes de controle para culturas diferentes (Bourne *et al.*, 1996; Mauchline *et al.*, 2004; Dallemole-Giaretta, 2008; Ebadi *et al.*, 2009). Bourne & Kerry (1999) avaliaram sete espécies de plantas: couve, feijão, quiabo, tomate, berinjela, soja e sorgo. Dentre estas, plantas de couve foram as que suportaram maior colonização da

rizosfera pelo antagonista, seguidas por tomate, quiabo e sorgo. Em feijão, berinjela e soja ocorreu a menor colonização do sistema radicular.

Siddiqui *et al.* (2009) trabalharam com diferentes isolados de *P. chlamydosporia* originados de ovos de nematoides dos cistos e nematoides das galhas, observando haver uma preferência por nematoide hospedeiro: biótipos originados de nematoides das galhas parasitavam maior quantidade de ovos de *M. hapla* que de *Globodera pallida*, e biótipos originados de nematoides dos cistos parasitavam maior quantidade de ovos de *Globodera pallida* que de *M. hapla*. Os autores também observaram que a colonização do solo esterilizado é mais eficiente que de solo condições naturais. Kerry *et al.* (1986) relataram haver diferenças entre isolados com relação a condições ótimas de temperatura, pH e água para o crescimento, produção de conídios, clamidósporos e na patogenicidade em ovos de *H. avenae*.

Há relatos recentes sobre o efeito de promoção de crescimento de plantas na presença de *P. chlamydosporia*. Monfort *et al.* (2005) estudando o efeito da aplicação de fungos nematófagos para o controle de *Gaeumannomyces graminis var. tritici* (Ggt), observaram que plântulas de trigo eram mais desenvolvidas na presença de *P. chlamydosporia*, na presença ou na ausência de Ggt. O crescimento de plantas de grão-de-bico infectadas por fitonematoides foi maior quando o fungo era inoculado juntamente com a bactéria fixadora de nitrogênio, *Rhizobium* sp., do que quando inoculados separadamente, ou sem inoculação do fungo (Siddiqui & Akhtar, 2009). *Pochonia chlamydosporia* foi também relatado promovendo o crescimento em plântulas de tomate e cevada (Dalle-mole-Giaretta, 2008; Marciá-Vicente *et al.*, 2009).

Em vários estudos, mostrou-se que a colonização do sistema radicular por *P. chlamydosporia* depende da quantidade de inóculo fúngico aplicado ao solo (De Leij & Kerry, 1991; De Leij *et al.*, 1992; Bourne & Kerry, 2000). Bourne & Kerry (1999), ao aplicarem 5.000, 10.000 ou 50.000 clamidósporos/g de solo em várias espécies de plantas, observaram, que a colonização da rizosfera foi significativamente maior em todas as espécies quando se aplicou a maior dose de clamidósporos. O aumento da dose de clamidósporos resultou em menor número de nematoides em couve e feijão, mas não apresentou diferença em

sorgo e tomate. Já plantas de berinjela e quiabo só apresentaram redução no número de nematoides na maior dose. Podestá *et al.* (2009), em trabalho com *M. javanica* em tomateiro, verificaram que a incorporação de 10.000 clamidósporos/g de solo resultou em 41% a mais de controle do que a aplicação de 5.000 clamidósporos/g de solo.

Não só a concentração de fungo no solo altera o nível de controle, assim como a época de aplicação no solo. Como ovos são o inóculo inicial dos nematoides no solo e também são importante fonte de alimento para o fungo, a aplicação de *P. chlamydosporia* antes do plantio da cultura, propiciando maior tempo de contato entre eles, pode potencializar o controle de *Meloidogyne* spp., pois reduz o número de juvenis que penetram nas raízes. Dallemole-Giaretta (2008), ao incorporar o inóculo fúngico em solo infestado com ovos 15 dias antes do transplântio, obteve maior nível de controle de *M. javanica* do que quando se incorporou 7 dias antes do transplântio.

3 – MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram conduzidos *in vitro* no Laboratório Controle Biológico de Fitonematoides (BIONEMA), no Instituto de Biotecnologia Aplicada a Agropecuária (BIOAGRO), e em vasos, em casas-de-vegetação do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa.

3.1. Procedimentos Gerais

3.1.1. Obtenção e preparo do inóculo de *M. javanica*

Como inóculo do nematoide, usaram-se ovos de *M. javanica*, coletados de raízes de tomateiro, previamente mantidos em casa-de-vegetação. Para a confirmação de população pura do nematoide, efetuaram-se estudos de padrões de isoenzimas em eletroforese.

Para obter ovos de *M. javanica*, adotou-se a técnica de extração de Hussey & Barker (1973), modificada por Boneti & Ferraz (1981). Raízes infectadas pelo nematoide foram lavadas cuidadosamente em água de torneira, cortadas em fragmentos de aproximadamente 2 cm de comprimento, e trituradas em liquidificador em baixa velocidade por 20 segundos em solução de hipoclorito de sódio a 0,5 %. A suspensão aquosa foi então passada por duas peneiras granulométricas sobrepostas, a superior com abertura de malha de 0,074 mm (200 mesh) e a inferior com abertura de 0,025 mm (500 mesh). Os ovos do nematoide retidos na última peneira foram lavados com água de torneira e, com o auxílio de uma pisseta, foram recolhidos em um béquer com capacidade de 250 mL. A suspensão aquosa contendo ovos do nematoide foi calibrada para 1000 ovos/mL com o auxílio da câmara de Peters, sob microscópio estereoscópio.

3.1.2. Preparo do solo

O solo utilizado nos experimentos é composto de terriço e areia, na proporção 1:1 (v:v), sem tratamento adicional (natural).

3.1.3. Preparo das mudas de tomate e alface

Para a montagem dos experimentos, utilizaram-se mudas de tomate cultivar Santa Clara, e mudas de alface, cultivar Babá de Verão. Ambas foram semeadas em bandejas de isopor com 128 células, contendo o substrato organo-mineral inerte (Plantmax[®]). As mudas de tomate foram transplantadas com 21 dias e as de alface com 15 dias de idade.

3.1.4. Obtenção do fungo

O isolado de *P. chlamydosporia* (Pc-10) utilizado nos experimentos pertence à coleção da micoteca do Laboratório de Controle Biológico de Fitonematoides, do Departamento de Fitopatologia e foi depositado na micoteca da UFV, sob coordenação do prof. Robert W. Barreto.

3.1.5. Obtenção do inóculo de *Pochonia chlamydosporia*

O inóculo de *P. chlamydosporia* utilizado nos experimentos foi produzido por meio da fermentação sólida em grãos de arroz. Em sacos de polipropileno, colocaram-se aproximadamente 400 g de arroz e 200 mL de água. Estes sacos foram fechados e autoclavados por 30 min a 120° C e, em câmara de fluxo laminar, plantaram-se cinco discos de micélio de colônia do fungo em BDA com 14 dias de idade. Os sacos foram fechados novamente e permaneceram no escuro a 25° C. Após 21 dias, retiraram-se os grãos colonizados dos sacos e, após a contagem e calibração do número de clamidósporos em hemacitômetro, o fungo foi utilizado nos experimentos.

3.1.6. Análise estatística

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, e as análises estatísticas dos dados obtidos foram realizadas com o auxílio do programa estatístico STATISTICA 7.0 (Statsoft, 2004).

3.2. Época de aplicação de *Pochonia chlamydosporia* para o controle de *M. javanica* em tomate.

Utilizaram-se vasos plásticos com 2 L de capacidade, contendo solo preparado como descrito em 3.1.2. Dois experimentos foram montados em dois anos consecutivos, sempre no período de verão, com o monitoramento da temperatura máxima e mínima da casa-de-vegetação diariamente, sendo que no primeiro experimento, as temperaturas foram mais brandas, com a média das máximas ficando em 30,2° C e a média das mínimas em 21,0° C. Já no segundo experimento, as temperaturas foram mais elevadas, com a média das máximas em 37,8° C e a média das mínimas em 19,1° C (Figura 1). Nos experimentos, utilizaram-se diferentes doses e tipos de inóculos de *P. chlamydosporia*, no primeiro, utilizaram-se 5 g do inóculo fúngico, composto apenas de micélio, por quilograma de solo, pois o fungo não produziu clamidósporos. No segundo experimento, aplicaram-se 3 g do inóculo, por quilograma de solo, o que equivale a $3,01 \times 10^4$ clamidósporos/g de solo. Em ambos os experimentos, o solo de cada vaso foi colocado em um saco plástico de 5 L de capacidade, juntamente com o respectivo inóculo do fungo e 4.000 ovos de *M. javanica*. Em seguida, agitou-se manualmente para a homogeneização dos inóculos do nematoide e do fungo, e colocou-se novamente em cada vaso. A partir de então, o solo foi mantido a 60% de umidade da capacidade de campo. Em cada vaso, de ambos os experimentos, transplantou-se uma muda de tomate cultivar Santa Clara com 21 dias de idade a 0, 5, 10, 15 ou 20 dias após a incorporação do fungo e do nematoide ao solo.

No tratamento testemunha, apenas ovos do nematoide foram incorporados ao solo, e as mudas foram transplantadas nas mesmas épocas dos tratamentos testados. O tratamento testemunha, com o retardo do plantio e a manutenção do solo úmido com os ovos do nematoide, assemelha-se ao método cultural de manejo de nematoides conhecido como pousio úmido, reconhecidamente um bom método de controle *Meloidogyne* spp. pela redução do inóculo inicial (Dutra & Campos, 2003; Dutra *et al.*, 2006). Os experimentos foram conduzidos em casas-de-vegetação, com nove repetições por tratamento, cada vaso constituindo uma unidade experimental. Ao início e ao final do experimento, coletou-se uma amostra composta por 3 g de solo por

vaso, de cada tratamento para determinar a população do fungo no solo. As unidades formadoras de colônias (UFCs) foram determinadas conforme o método descrito por Kerry (1991), em meio semi-seletivo (Gaspard *et al.*, 1990). Decorridos 50 dias do transplântio das mudas de tomateiro, avaliaram-se o peso da parte aérea, altura das plantas, peso das raízes, número de galhas e número de ovos por planta.

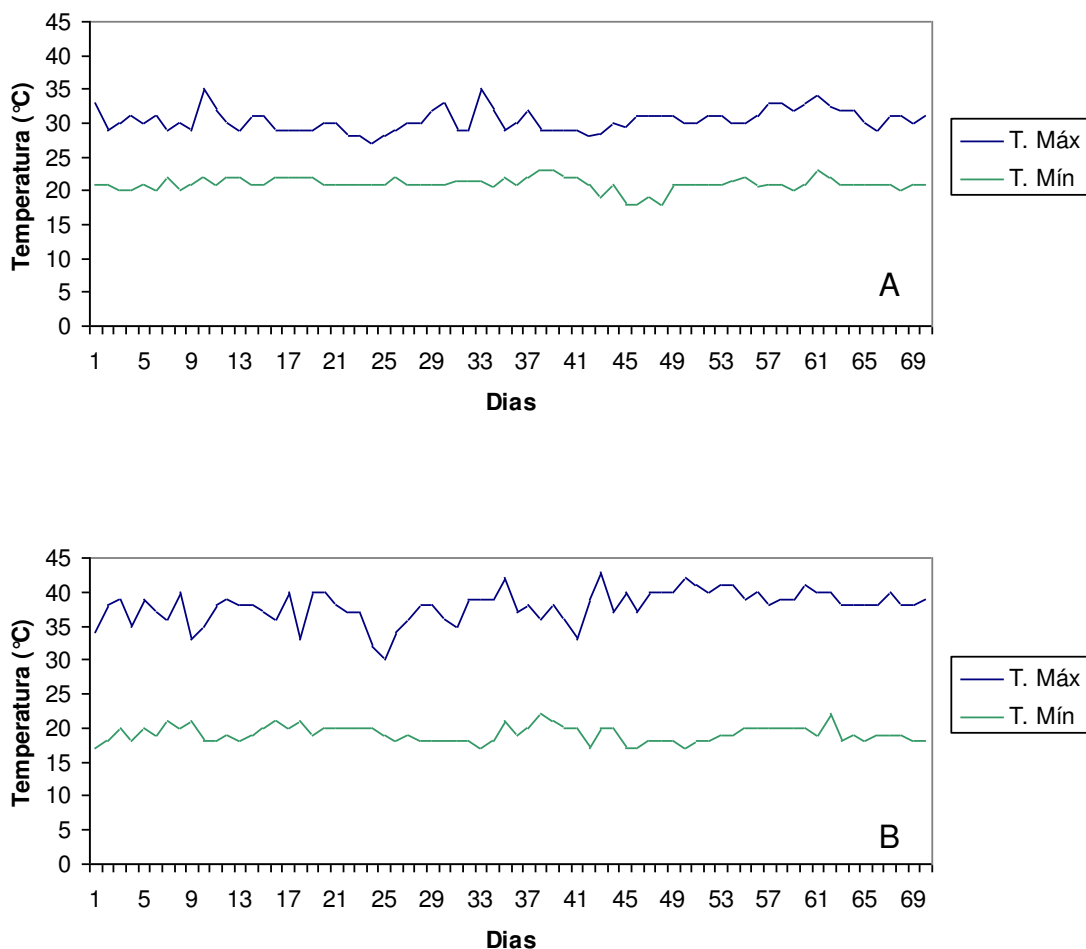


Figura 1 – Temperatura máxima e mínima em casa-de-vegetação durante o primeiro (A) e segundo experimentos (B).

3.3. Época de aplicação de *Pochonia chlamydosporia* para o controle de *Meloidogyne javanica* em alface.

Também se executaram dois experimentos, seguindo-se a mesma metodologia do ensaio anterior. Porém, os experimentos transcorreram no verão e outono, respectivamente, com o monitoramento da temperatura

máxima e mínima da casa-de-vegetação diariamente, sendo que no primeiro experimento, as temperaturas foram mais altas, com a máxima ficando em média a 37,8° C e a mínima a 19,1° C. Já no segundo experimento, as temperaturas foram mais brandas, com temperaturas elevadas somente próximo ao meio dia, sendo as médias da máxima 33,1° C e da mínima a 19,2° C (Figura 2). Cada vaso contendo dois quilogramas de solo, foi infestado com 3.500 ovos de *M. javanica*, em seguida, para cada quilograma de solo, aplicaram-se 5 g do inóculo fúngico, contendo $5,10 \times 10^4$ e $5,35 \times 10^4$ clamidósporos/g de solo no primeiro e segundo experimento respectivamente. Utilizaram-se mudas de alface cultivar Babá de Verão com 15 dias de idade, transplantadas também nos períodos de 0, 5, 10, 15 ou 20 dias após a incorporação ao solo do inóculo do fungo e do nematoide.

No tratamento testemunha, apenas ovos do nematoide foram incorporados ao solo, e as mudas foram transplantadas nas mesmas épocas dos tratamentos. Os experimentos foram conduzidos em casas-de-vegetação, e cada tratamento consistiu de oito repetições no primeiro experimento, e sete no segundo, cada vaso constituindo uma unidade experimental. Ao início e ao final do experimento, coletou-se uma amostra composta por 3 g de solo por vaso, de cada tratamento para determinar a população do fungo no solo. As unidades formadoras de colônias (UFCs) foram determinadas conforme o método descrito por Kerry (1991), em meio semi-seletivo (Gaspard *et al.*, 1990). Aos 50 dias, determinaram-se a população do fungo no solo, o peso das cabeças de alface, número de galhas e número de ovos por planta de alface.

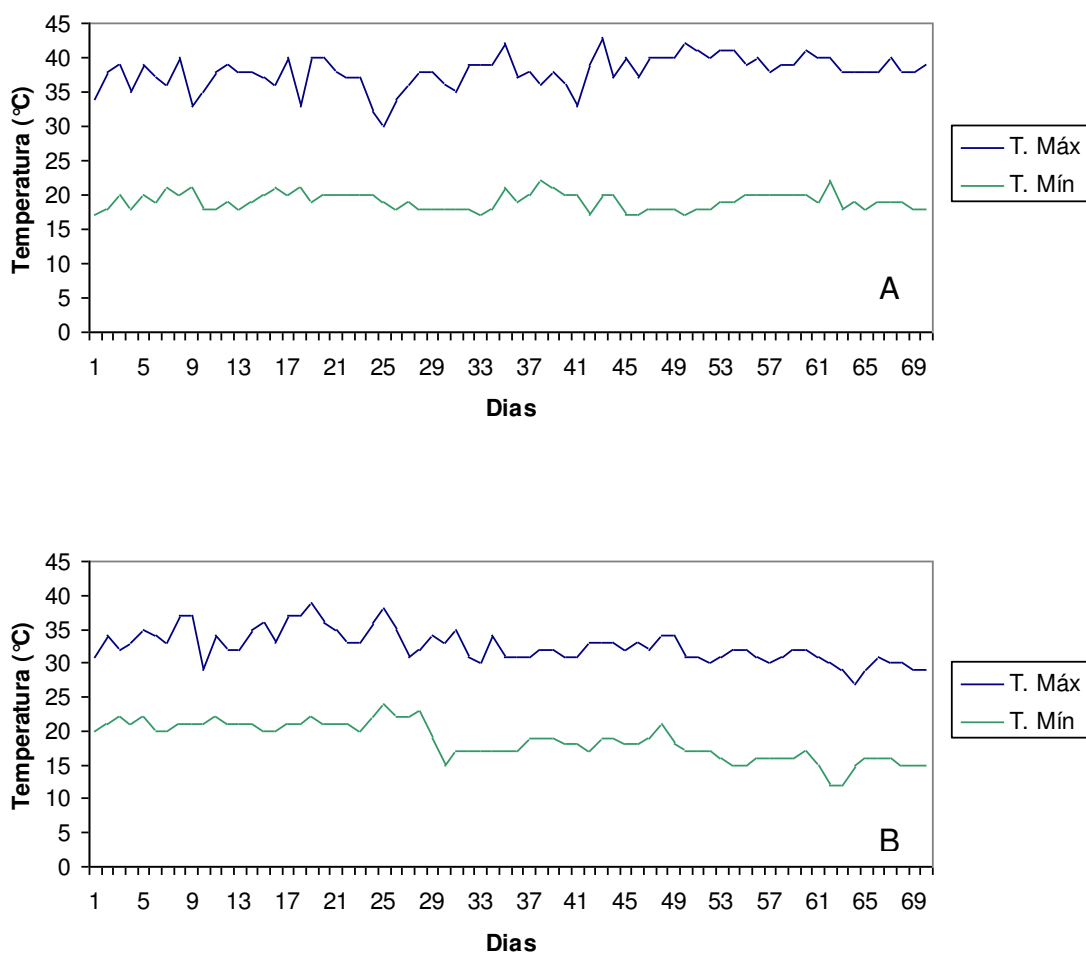


Figura 2 – Temperatura máxima e mínima em casa-de-vegetação durante o primeiro (A) e segundo experimentos (B).

4 – RESULTADOS

4.1. Época de aplicação de *Pochonia chlamydosporia* para o controle de *M. javanica* em tomate e alface.

4.1.1. Experimentos com tomate:

Com a incorporação de *P. chlamydosporia* ao solo, houve redução do número de galhas em relação ao tratamento testemunha, em todas as épocas testadas, tanto no primeiro, quanto no segundo experimento. A maior diferença ocorreu quando o solo foi infestado pelo fungo 20 dias antes do transplântio das mudas de tomate, com 68 e 41 % de redução em relação ao tratamento testemunha, no primeiro e segundo experimento respectivamente.

Além disso, observa-se que a tendência de redução do número de galhas seguiu o modelo quadrático no primeiro e linear no segundo experimento, em relação à época de incorporação do fungo ao solo antes do transplântio das mudas. Para a testemunha, sem a aplicação de *P. chlamydosporia*, a tendência de redução foi linear, com inclinação muito semelhante, no primeiro e segundo experimento (Figura 3).

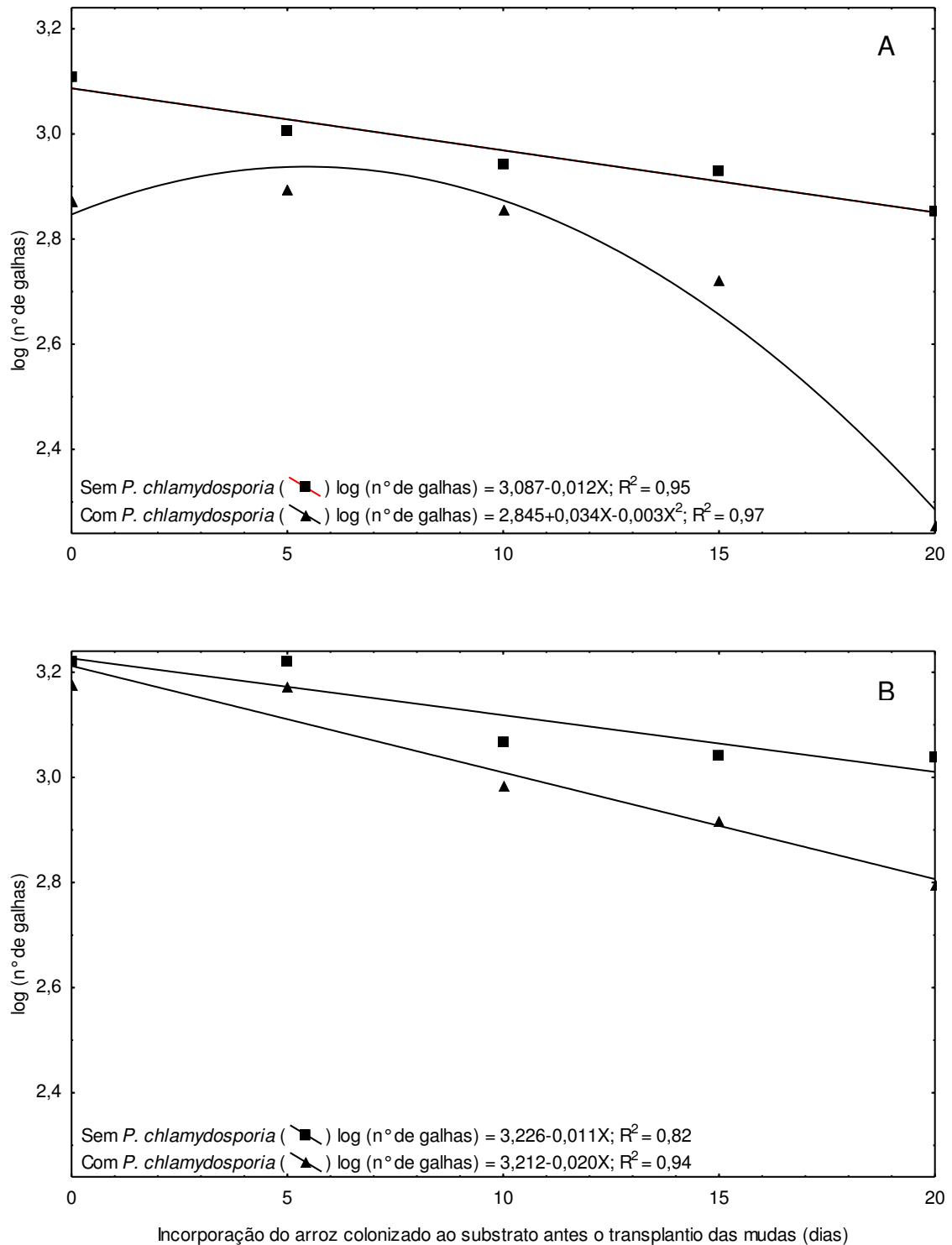


Figura 3 – Número de galhas em raiz de tomateiros, em solo infestado em diferentes épocas (X) por *P. chlamydosporia* e 4.000 ovos de *M. javanica*. Avaliação aos 50 dias após o transplântio das mudas. Para análises, transformaram-se os valores de número de galhas em log. A – 1º experimento, com adição de 6 g de arroz colonizado por *P. chlamydosporia*; B – 2º experimento, com adição de 10 g de arroz colonizado.

Quanto ao número de ovos, também houve redução da multiplicação do nematoide em todos os tratamentos. Quando o solo foi infestado pelo fungo 20 dias antes do transplante das mudas de tomate, a redução foi de 82 e 48 % em relação ao tratamento testemunha, no primeiro e segundo experimento respectivamente.

Neste caso, também se observa que a tendência de redução do número de ovos seguiu o modelo quadrático no primeiro e linear no segundo experimento, em relação à época de incorporação do fungo ao solo antes do transplante das mudas. Para a testemunha, sem a aplicação de *P. chlamydosporia*, a tendência de redução foi linear, com maior inclinação no primeiro que no segundo experimento (Figura 4).

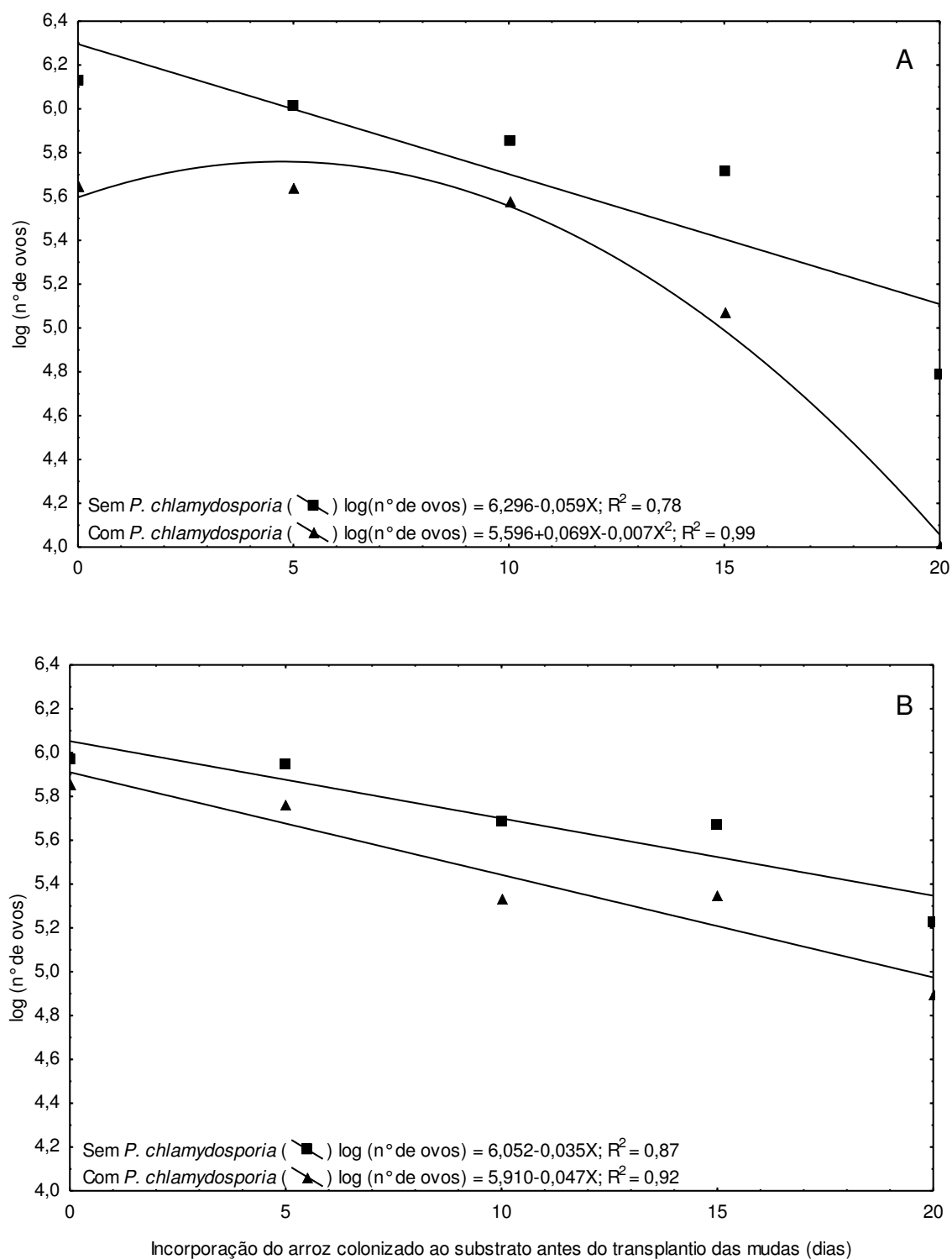


Figura 4 – Número de ovos em raiz de tomateiros, em solo infestado em diferentes épocas (X) por *P. chlamydosporia* e 4.000 ovos de *M. javanica*. Avaliação aos 50 dias após o transplântio das mudas. Para análises, transformaram-se os valores de número de ovos em log. A – 1º experimento, com adição de 6 g de arroz colonizado por *P. chlamydosporia*; B – 2º experimento, com adição de 10 g de arroz colonizado.

Em ambos os experimentos, a população de *P. chlamydosporia* no solo, sem a presença das plantas cresceu, atingindo o seu máximo aos 10 dias após a sua incorporação, quando passou a decrescer, mas se manteve maior que no momento do transplântio das mudas de tomate nas avaliações aos 15 e 20 dias. Após a retirada das plantas, a população fúngica no solo permaneceu alta, e foi maior que a população inicial quando se incorporou o arroz colonizado ao solo no momento do transplântio das mudas e aos cinco dias no primeiro experimento. Já no segundo experimento, a população final foi maior que a inicial apenas no momento do transplântio das mudas. Para os demais tratamentos, em ambos os experimentos, a população de *P. chlamydosporia* na retirada das plantas foi um pouco menor que no momento do transplântio (Tabela 1).

Tabela 1 - População de *Pochonia chlamydosporia* isolado Pc-10 no solo após a incorporação de arroz colonizado, em pré-plantio de tomate em solo natural infestado com 4.000 ovos de *Meloidogyne javanica*. Médias de três repetições.

Experimento	Quantidade de inóculo de <i>P. chlamydosporia</i>	Infestação do solo (dias antes do transplântio)	UFC/g de solo	
			Momento do transplântio das mudas	50 dias após o transplântio das mudas
1	5 g/kg de solo (micélio e conídios)	0	6,66x10 ²	3,26x10 ⁴
		5	8,86x10 ⁴	9,80x10 ⁴
		10	2,36x10 ⁵	8,66x10 ⁴
		15	- *	1,40x10 ⁴
		20	1,44x10 ⁵	1,00x10 ⁴
2	3 g/kg de solo (micélio, conídios e 3,01x10 ⁴ clamidósporos/g de solo)	0	1,66x10 ⁴	2,16x10 ⁴
		5	1,28x10 ⁵	5,16x10 ⁴
		10	2,90x10 ⁵	6,50x10 ⁴
		15	1,90x10 ⁵	5,00x10 ⁴
		20	1,75x10 ⁵	1,50x10 ⁴

* Parcelas perdidas.

Em relação ao peso da parte aérea das plantas de tomate, observou-se apenas no segundo experimento, crescimento linear, à medida que aumenta o

tempo decorrido do preparo do solo até o transplante das mudas, independente da aplicação ou não de *P. chlamydosporia* (Figura 5). Já a altura das plantas e o peso do sistema radicular não diferiram dos seus respectivos tratamentos testemunhas, sem a aplicação do fungo ao solo (dados não apresentados).

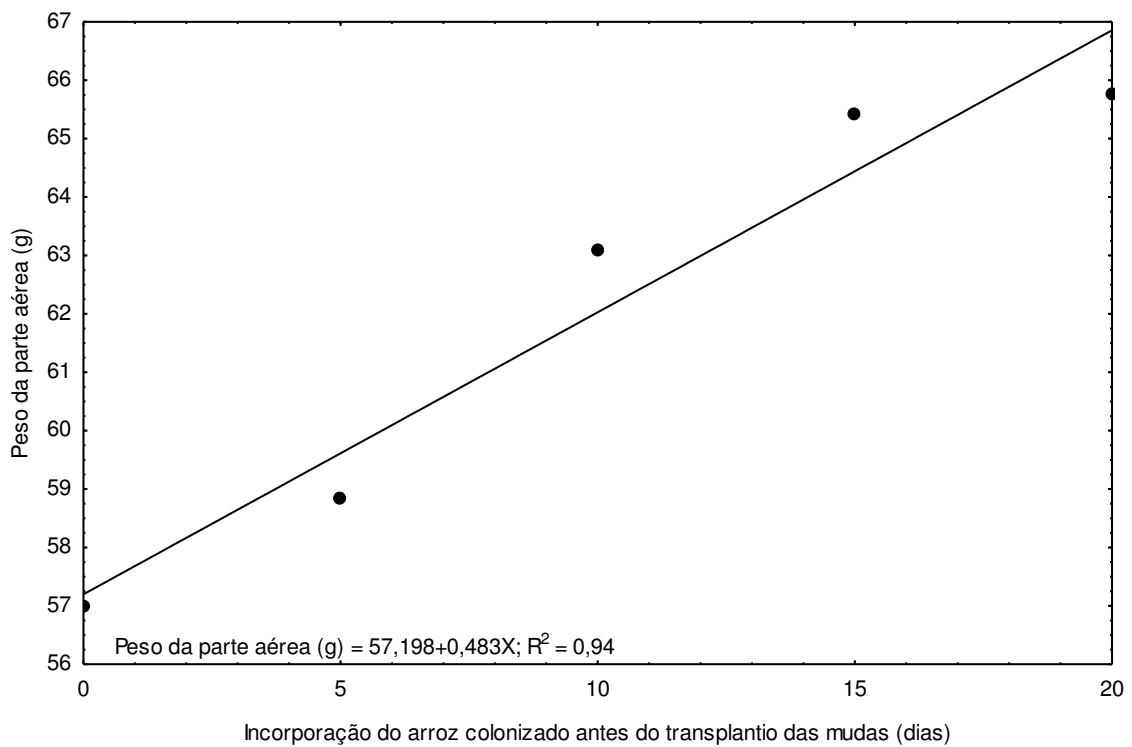


Figura 5 – Peso da parte aérea fresca de tomateiros cultivados em solo infestado com 4.000 ovos de *Meloidogyne javanica* com ou sem adição do fungo *Pochonia chlamydosporia* em 10 g de arroz colonizado, em diferentes épocas antes do transplante das mudas. Avaliação aos 50 dias após o transplante das mudas.

4.1.2. Experimentos com alface:

Com a incorporação de *P. chlamydosporia* ao solo, houve redução do número de galhas/g de raiz em relação à testemunha sem o fungo em ambos os experimentos, com aumento do percentual de redução à medida que se aumenta o período de infestação do solo pelo fungo antes do transplântio das mudas de alface. A redução do número de galhas/g de raiz chegou a 55 e 69% no primeiro e segundo experimento respectivamente quando a infestação do solo ocorreu aos 20 dias antes do transplântio das mudas.

Além disso, observa-se que a tendência de redução do número de galhas/g de raiz seguiu o modelo linear no primeiro e quadrático no segundo experimento, em relação à época de infestação do solo antes do transplântio das mudas, tanto na presença, quanto na ausência de *P. chlamydosporia* (Figura 6).

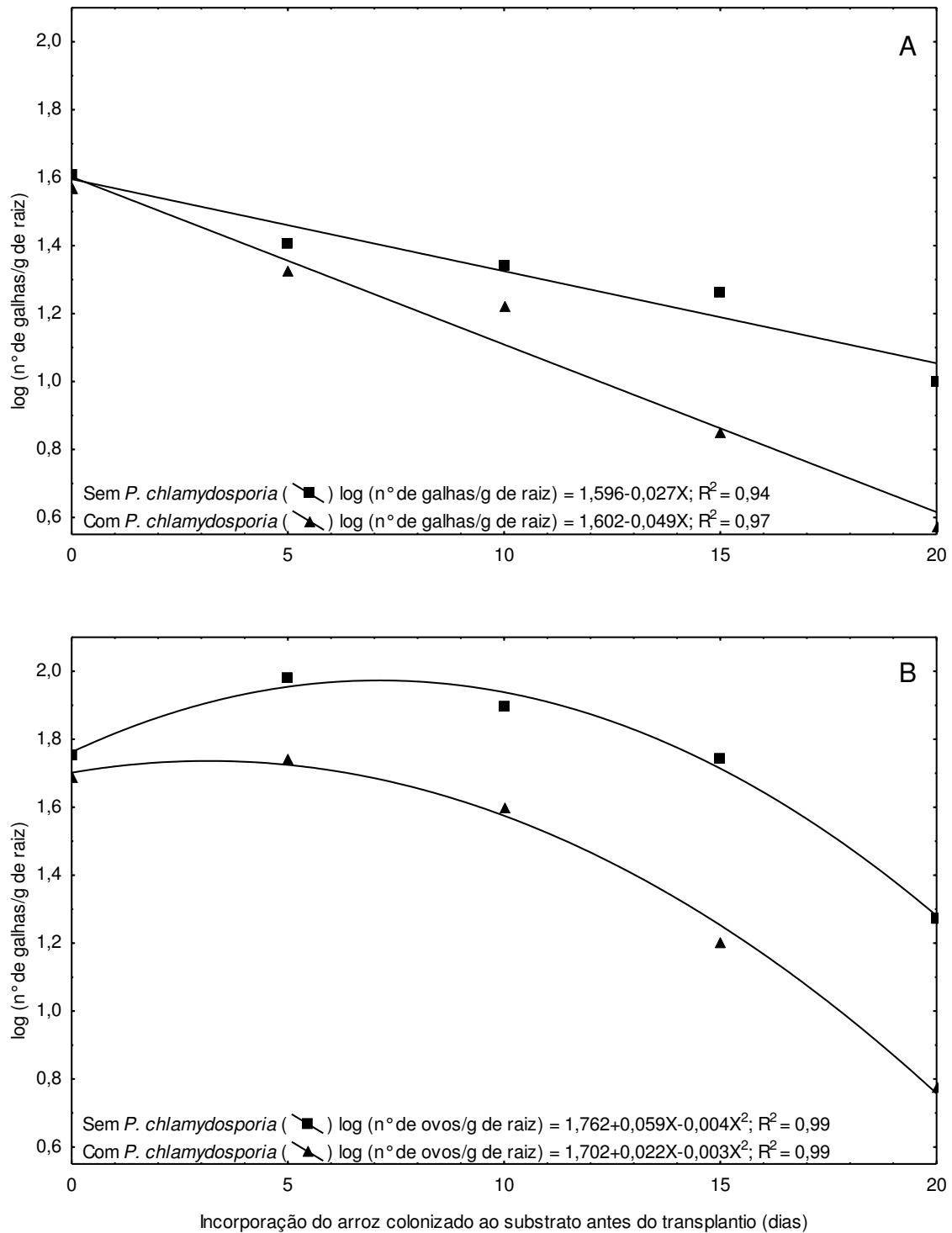


Figura 6 – Número de galhas em raiz de alface, em solo infestado em diferentes épocas (X) por 10 g de arroz colonizado por *P. chlamydosporia* e 3.500 ovos de *M. javanica*. Avaliação aos 50 dias após o transplântio das mudas. Para análises, transformaram-se os valores de número de galhas em log. A – 1° experimento, B – 2° experimento.

O número de ovos/g de raiz de *M. javanica*, na presença de *P. chlamydosporia* foi menor que no tratamento testemunha em todas as épocas de infestação do solo. Pela inclinação das retas (figura 7), observa-se tendência de aumento no percentual de controle à medida que se aumenta o período de infestação do solo antes do transplântio das mudas de alface. Entretanto, no primeiro experimento, maior percentual de redução foi obtido aos 15 dias, com 78%. Já no segundo experimento, a maior redução foi de 85% no número de ovos/g de raiz para a infestação do solo 20 dias antes do transplântio das mudas.

Além disso, a tendência de redução do número de ovos/g de raiz seguiu o modelo linear para ambos os experimentos, com ou sem *P. chlamydosporia*, com inclinação maior na presença do fungo antagonista e maior taxa de controle no segundo experimento (Figura 7).

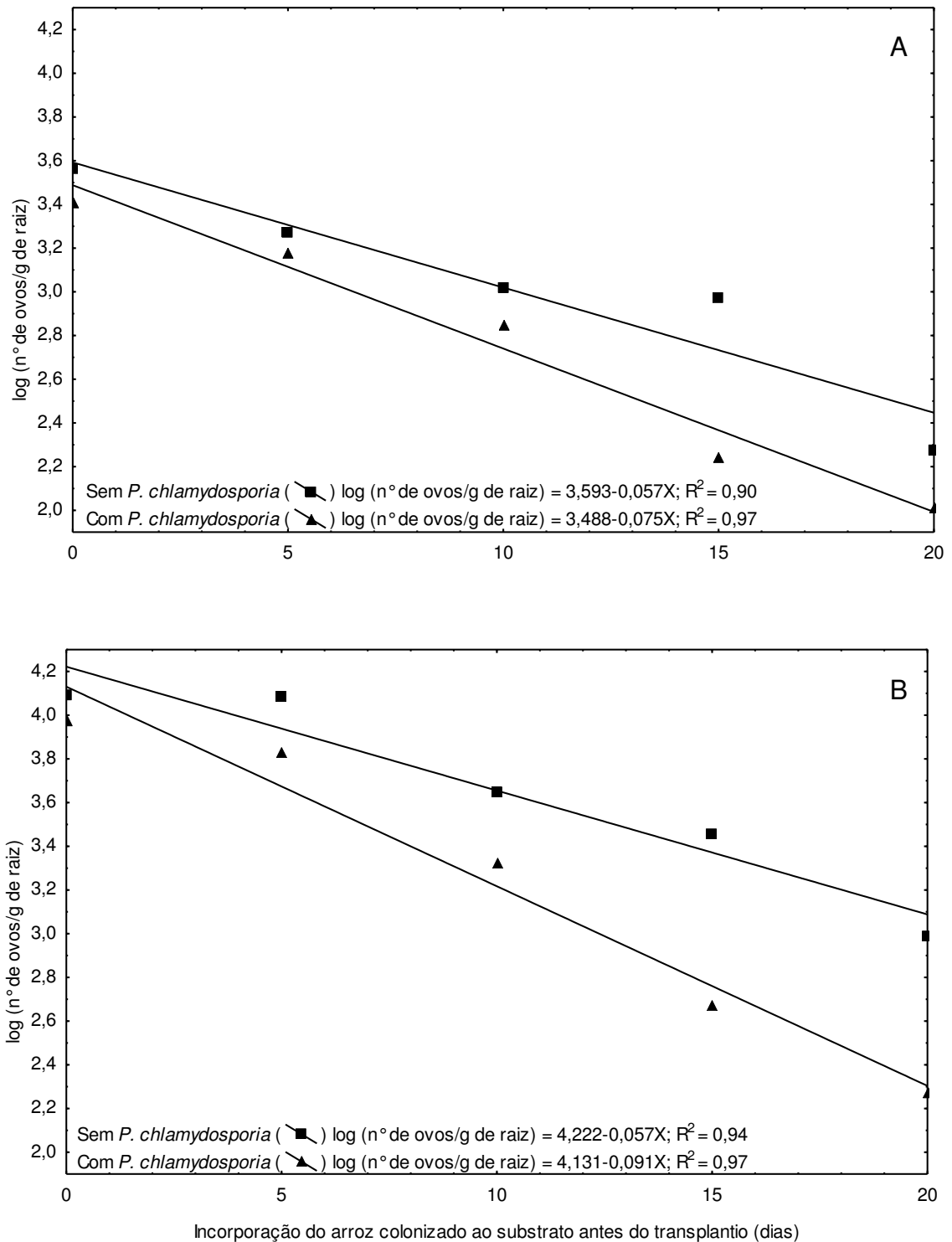


Figura 7 – Número de ovos em raiz de alface, em solo infestado em diferentes épocas (X) por 10 g de arroz colonizado por *P. chlamydosporia* e 3.500 ovos de *M. javanica*. Avaliação aos 50 dias após o transplântio das mudas. Para análises, transformaram-se os valores de número de ovos em log. A – 1° experimento, B – 2° experimento.

Em ambos os experimentos, a população de *Pochonia chlamydosporia* no solo, sem a presença das plantas cresceu, atingindo o seu máximo aos 10 dias após a sua incorporação no solo, quando passou a decrescer, mas se manteve maior que no momento da infestação do solo nas duas avaliações subsequentes aos 15 e 20 dias. Após a retirada das plantas, observou-se que a população fúngica no solo permaneceu alta, sendo, inclusive, maior que a população inicial, quando se incorporou o solo no momento do transplântio das mudas no primeiro experimento. Já no segundo experimento, a população final foi maior que a inicial apenas no momento do transplântio das mudas. Para os demais tratamentos, em ambos os experimentos, a população de *P. chlamydosporia* na retirada das plantas foi pouco menor que no momento do transplântio (Tabela 2).

Tabela 2 - População de *Pochonia chlamydosporia* isolado Pc-10 no solo após a incorporação de arroz colonizado, em pré-plantio de alface em solo natural infestado com 3.500 ovos de *Meloidogyne javanica*. Média de três repetições.

Experimento	Quantidade de inóculo de <i>P. chlamydosporia</i>	Infestação do solo (dias antes do transplântio)	UFC/g de Solo	
			Momento do transplântio das mudas	50 dias após transplântio das mudas
1	5 g/kg de solo	0	$9,83 \times 10^4$	$1,06 \times 10^5$
	(micélio, conídios e	5	$1,56 \times 10^5$	$1,51 \times 10^5$
	$5,10 \times 10^4$	10	$2,56 \times 10^5$	$8,83 \times 10^4$
	clamidósporos/g de	15	$2,08 \times 10^5$	$4,00 \times 10^4$
	solo)	20	$1,85 \times 10^5$	$2,33 \times 10^4$
2	5 g/kg de solo	0	$3,00 \times 10^5$	$3,07 \times 10^5$
	(micélio, conídios e	5	$2,88 \times 10^5$	$2,03 \times 10^5$
	$5,35 \times 10^4$	10	$9,11 \times 10^5$	$1,28 \times 10^5$
	clamidósporos/g de	15	$5,20 \times 10^5$	$9,83 \times 10^4$
	solo)	20	$3,98 \times 10^5$	$1,03 \times 10^5$

Em relação ao peso da parte aérea das plantas de alface, observou-se apenas no segundo experimento, uma tendência de crescimento linear, à medida que aumenta o tempo decorrido do preparo do solo até o transplântio das mudas, independente da aplicação ou não de *P. chlamydosporia* (Figura 8). Já o peso do sistema radicular não diferiu estatisticamente dos seus respectivos tratamentos testemunhas, sem a aplicação do fungo ao solo (dados não apresentados).

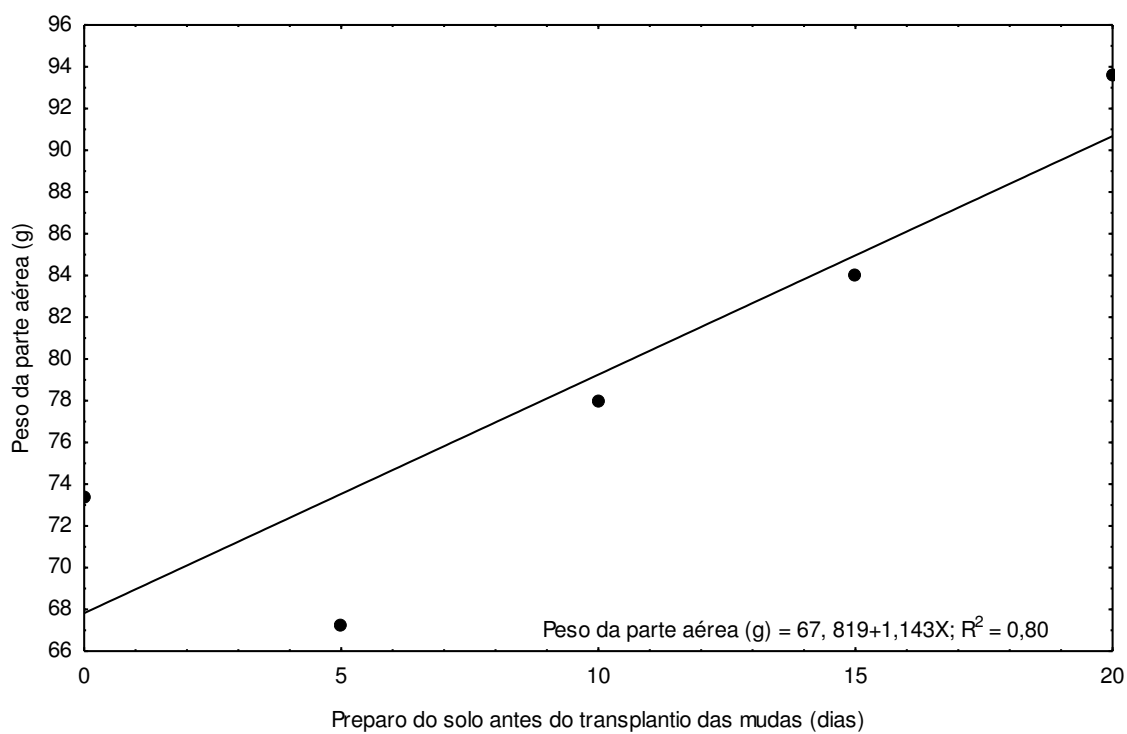


Figura 8 – Peso da parte aérea fresca de alface cultivada em solo infestado com 3.500 ovos de *Meloidogyne javanica*, com ou sem adição do fungo *Pochonia chlamydosporia* em 10 g de arroz colonizado, em diferentes épocas antes do transplantio das mudas. Avaliação aos 50 dias após o transplantio das mudas.

5 – DISCUSSÃO

O maior tempo de contato entre os ovos do nematoide e o fungo *Pochonia chlamydosporia* no solo propiciou maior controle de *Meloidogyne javanica*, quando comparado com o pousio úmido, tanto em tomate como em alface. O fungo tem comportamento saprofítico, se desenvolve em matéria orgânica e, mesmo antes de parasitar os ovos dos nematoides, pode atuar sobre estes pela ação de enzimas e toxinas. Ao entrar em contato com os ovos, o fungo corrompe as camadas vitelínica, de quitina e lipídios, levando os juvenis à morte (Morgan-Jones *et al.*, 1983). Além disso, a eclosão dos juvenis de segundo estágio (J₂) é afetada pela presença do fungo (Stirling, 1991; Mukhtar & Pervaz, 2003). Por isto, o controle tende a aumentar com maior período de contato do fungo antagonista com o nematoide antes do transplântio das mudas.

A temperatura foi mais elevada no segundo que no primeiro experimento de tomate, e no primeiro que no segundo experimento de alface, o que provavelmente prejudicou o parasitismo dos ovos de *M. javanica* e resultou em menor eficiência de controle. Aparentemente, *P. chlamydosporia* desenvolve-se melhor em temperaturas mais brandas. Kerry *et al.* (1986), trabalhando com cinco isolados do fungo, observaram que o crescimento ótimo de três deles ocorria a 18° C e, de dois isolados, de 20 a 25° C. A colonização de massas de ovos é mais expressiva a 20° C que a 25 e 30° C e o maior controle, com redução da infectividade e multiplicação de nematoides ocorre a 25° C (De Leij, 1992). Como a temperatura de predação não é superior à de desenvolvimento de *P. chlamydosporia*, altas temperaturas podem reduzir a eficiência do fungo no solo. O maior desenvolvimento embrionário, multiplicação celular e eclosão dos J₂ de *M. javanica* ocorre a 28° C, estes processos tornam-se mais lentos com a redução da temperatura (Campos *et al.*, 2008). Desta forma, havendo rápida taxa de eclosão, os juvenis podem escapar da ação do fungo, ao passo que em temperaturas mais baixas, a eclosão é retardada, o que possibilita maior exposição dos ovos ao fungo.

A maior eficiência de controle no primeiro que no segundo experimento de tomate pode, também, estar relacionado à maior densidade de inóculo

fúngico. Anteriormente, verificou-se que, em tomateiro, a aplicação de 10.000 clamidósporos/g de solo resultou em 41% a mais de controle do que 5.000 clamidósporos/g de solo infestado com *M. javanica* (Podestá *et al.*, 2009). Bourne & Kerry (1999) aplicaram 5.000, 10.000, ou 50.000 clamidósporos/g de solo, e observaram maior colonização da rizosfera de várias espécies de plantas, com maior concentração de inóculo, e maior controle de nematoides com o aumento do inóculo fúngico em plantas de couve e feijão. Entretanto, para plantas de tomate e sorgo, não houve correlação da dose de inóculo, e controle de nematoides. Assim, a eficiência de controle pode estar condicionada a outros fatores, como a espécie vegetal hospedeira do fungo e do nematoide. A colonização das raízes pelo fungo é um fator muito importante, haja vista que o controle varia de acordo com características da planta hospedeira que permitam a colonização do fungo (Bourne *et al.*, 1996; Bourne & Kerry, 1999; Mauchline *et al.*, 2004). Esse aspecto demanda avaliação em experimentos futuros.

A diferença nas tendências de redução do número de galhas e de ovos de *M. javanica* com aplicação de *P. chlamydosporia*, no primeiro e segundo experimento de tomate, quadrática e linear respectivamente, pode ser relacionada ao tipo de inóculo, pois, no primeiro experimento, aplicou-se apenas micélio fúngico sem formação de clamidósporos. Assim, o fungo pode ter colonizado mais rapidamente os ovos que estavam próximos a ele no solo, mas demorou para colonizar todo o solo e alcançar os ovos mais distantes. Como no segundo experimento, em que o inóculo fúngico constituía-se principalmente de clamidósporos, facilmente dispersos no solo, estes tiveram que germinar, para colonizar o solo e os ovos do nematoide, e o efeito inicial não foi tão rápido quanto no primeiro experimento. Vale ressaltar que nem todos os clamidósporos germinam: a 25 ° C ocorre cerca de 80 a 93% de germinação (Flores-Camacho *et al.*, 2008). Logo, em temperaturas elevadas, a taxa de germinação provavelmente é menor, como acontece com o desenvolvimento do fungo (Kerry *et al.*, 1986; De Leij, 1992). Os clamidósporos são mais utilizados como fonte de inóculo, por favorecerem o estabelecimento e a sobrevivência do fungo por longos períodos no solo (Kerry, 2001). Entretanto, o uso de micélio de *P. chlamydosporia* como fonte de inóculo também é eficiente no controle do nematoide das galhas (Mukhtar & Pervaz,

2003; Khan *et al.* 2001). Confirmou-se esse fato no presente trabalho, pois a aplicação de arroz colonizado pelo fungo, sem clamidósporos, reduziu eficientemente o número de galhas e ovos de *M. javanica* em raízes de tomateiro. Entretanto, em grandes áreas no campo, a aplicação da formulação em grãos de arroz é inviável economicamente e por motivos práticos de aplicação. Dessa forma, deve-se preferir a aplicação de formulações a base de clamidósporos puros. Não se conhece a eficiência do fungo quando é aplicado apenas como conídios, pois este tipo de inóculo é frágil e depende de alto teor de matéria orgânica no solo para dar suporte ao crescimento de hifas até que estas encontrem os ovos de nematoides.

A temperatura mais baixa no segundo experimento de alface, provavelmente reduziu a taxa de multiplicação celular e desenvolvimento embrionário dos ovos de *M. javanica*. Campos *et al.* (2008) observaram que temperaturas mais baixas retardam estes processos, assim, poucos J₂ eclodiram nos primeiros dias, o que explica a tendência quadrática, com baixo número de galhas/g de raiz no primeiro tratamento (zero dia de pousio úmido) com ou sem *P. chlamydosporia*. No segundo experimento, com o atraso na eclosão dos J₂, esses, ao eclodirem, encontraram raízes das plantas de alface, já desenvolvidas, e penetraram nela, o que explica o maior número de galhas e ovos/g de raiz que no primeiro experimento, em que os J₂ eclodiram mais rapidamente, antes mesmo de haver desenvolvimento do sistema radicular. Como se sabe, com a perda de 50 a 60% da reserva de lipídios os J₂ são incapazes de infectar a planta hospedeira (Van Gundy *et al.*, 1967). Desta forma, muitos dos J₂ eclodidos perderam infectividade na busca pela planta hospedeira.

A aplicação do fungo ao solo muito antes da presença das raízes pode dificultar seu estabelecimento a ponto de reduzir a eficiência de controle do nematoide. Entretanto, nesse estudo, como se aplicou o fungo com uma base alimentar, o arroz, a população no solo aumentou nos primeiros 10 dias (Tabelas 1 e 2) e, após exaurir a base alimentar, a concentração do fungo no solo diminuiu e ele passou a colonizar os ovos em busca de nutrientes. Tal hipótese é corroborada pela observação de maior redução de galhas e ovos com o aumento do tempo da infestação do solo antes do transplântio da mudas. A aplicação, no solo, de 5.000 clamidósporos em arroz colonizado, ou

como clamidósporos puros, resultou na mesma quantidade de UFCs seis meses após, apesar de após dois meses haver quantidade muito maior de UFCs no tratamento com incorporação de *P. chlamydosporia* em arroz colonizado (Peteira *et al.* 2005). Desta forma, observa-se que, com a infestação do solo pelo fungo em arroz colonizado, a colonização do solo é mais rápida.

A permanência de *P. chlamydosporia* no solo em concentrações relativamente altas é importante quando se pensa em ciclos subsequentes da cultura no campo, para assegurar uma ação mais prolongada. Atkins *et al.* (2003) observaram que *P. chlamydosporia* permanece no solo em densidades maiores do que no momento da sua aplicação por pelo menos 5 meses em temperaturas inferiores a 20° C. Peteira *et al.* (2005) acompanharam a população de *P. chlamydosporia* var. *catenulata* no campo após aplicação em arroz colonizado ou como clamidósporos, durante dois plantios consecutivos de tomate (seis meses), e observaram que o fungo permaneceu viável no solo em ambos os casos, em níveis suficientes para controlar as populações subsequentes do nematoide das galhas. Já se observou população de *P. chlamydosporia* no solo e colonização de ovos de *M. javanica* nove meses após a aplicação do fungo no solo em cultivos subsequentes de tomate e alface (Verdejo-Lucas *et al.* 2003). Portanto, o fungo tem potencial de permanecer viável no solo, o que é aspecto relevante no biocontrole de nematoides.

Com o aumento do tempo de pousio úmido, houve tendência de aumento no peso das plantas de tomate e alface, tanto na presença como na ausência de *P. chlamydosporia*, em consequência da redução da infectividade e multiplicação dos nematoides no sistema radicular das plantas (Dutra & Campos, 2003; Dutra *et al.* 2003; Dutra *et al.* 2006). Neste trabalho, apresentaram-se apenas dados do segundo experimento com tomate e com alface, pois não se obteve significância no primeiro experimento com ambas as culturas.

Com a redução natural na infectividade e multiplicação dos nematoides nas plantas de tomate e alface, principalmente aos 15 e 20 dias de pousio úmido, espera-se que esse pousio, além de ser eficiente, pode ser associado à aplicação de *P. chlamydosporia* no solo. Após a eclosão, em condições favoráveis de temperatura e umidade no solo, os J₂ têm alta mobilidade, com

consequente alto gasto energético em pouco tempo (Goodell & Ferris, 1989). Os J₂ de *M. javanica* tem 30% do peso corporal na forma de lipídios, que constituem a primeira fonte energética na falta de alimento (Lee & Atkinson, 1977). Havendo perda de 50 a 60% da reserva de lipídios, os J₂ ficam incapazes de infectar a planta hospedeira (Van Gundy *et al.*, 1967). Esse fato pode explicar o baixo número de galhas e, conseqüentemente, de ovos de *M. javanica*, nos tratamentos com maior número de dias entre infestação do solo e transplântio das mudas. O pousio úmido por 14 dias, não reduziu o número de J₂ de *M. incognita* no solo em relação ao alqueive (pousio seco), mas reduziu a infectividade do nematoide em bioteste com plantas de tomate em solo de campo em casa-de-vegetação (Dutra & Campos, 2003; Dutra *et al.* 2006). Dutra *et al.* (2003) também observaram que, com 14 dias de pousio úmido no pré-plantio, houve redução da multiplicação de *M. javanica* em plantas de alface. Apesar de o pousio úmido isoladamente ser efetivo no controle de *Meloidogyne* spp., sua integração à aplicação de *P. chlamydosporia*, aumenta significativamente a taxa de controle, sem contar o fato de o fungo permanecer viável no solo, em quantidades suficientes para atuar no inóculo inicial do nematoide nos ciclos subseqüentes das culturas.

Esse é o primeiro relato no mundo, sobre a importância da época de aplicação de *P. chlamydosporia* no controle de nematoides das galhas, e gera um avanço para as pesquisas com este organismo.

5 – CONCLUSÃO

Com este trabalho observou-se que em relação à época de aplicação de *P. chlamydosporia* em formulação de arroz, até 20 dias, quanto maior o tempo antes do transplântio das mudas for realizado a incorporação do inóculo fúngico ao solo, maior o potencial de controle deste sobre *M. javanica*.

6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ATKINS, S.D.; HIDALGO-DIAZ, L.; KALISZ, H.; MAUCLINE, T.H.; HIRSCH, P.R. & KERRY, B.R. 2003. Development of a new management strategy for the control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) in organic vegetable production. *Pest Management Science*, 59: 183-189.
- BONETI, J.I.S. & FERRAZ, S. 1981. Modificação do método de Hussey e Barker para a extração de ovos de *Meloidogyne exigua* em raízes de cafeeiro. *Fitopatologia Brasileira*, 6: 553 (Suplemento).
- BORDALLO, J.J.; LOPEZ-LLORCA, L.V.; JANSSON, H-B.; SALINAS, J.; PERSMARK, L. & ASENSIO, L. 2001. Colonization of plant roots by egg-parasitic and nematode-trapping fungi. *New Phytologist*, 154: 491-499.
- BOURNE, J.M. & KERRY, B.R. 1999. Effect of the plant on the efficacy of *Verticillium chlamydosporium* as a biological control agent of root-knot nematodes at different nematode densities and fungal application rates. *Soil Biology and Biochemistry*, 31: 75-84.
- BOURNE, J.M. & KERRY, B.R. 2000. Observations on the survival and competitive ability of the nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium* in soil. *International Journal of Nematology*, 10: 9-18.
- BOURNE, J.M.; KERRY, B.R. & DE LEIJ, F.A.A.M. 1994. Methods for the study of *Verticillium chlamydosporium* in the rhizosphere. *Journal of Nematology*, 26: 587-591.
- BOURNE, J.M.; KERRY, B.R. & DE LEIJ, F.A.A.M. 1996. The importance of the host plant on the interaction between root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) and the nematophagous fungus, *Verticillium chlamydosporium* Goddard. *Biocontrol Science and Technology*, 6: 539-548.

- CAMPOS V.P. 1985. Doenças causadas por nematoides. Informe Agropecuário 11: 21-28.
- CAMPOS, H.D. & CAMPOS, V.P. 1997. Efeito da época e forma de aplicação dos fungos *Arthrobotrys conoides*, *Arthrobotrys musiformis*, *Paecilomyces lilacinus* e *Verticillium chlamydosporium* no controle de *Meloidogyne exigua* do cafeeiro. Fitopatologia Brasileira, 22: 361-365.
- CAMPOS, H.D.; CAMPOS, V.P. & POZZA, E.A. 2008. Efeito da temperatura na multiplicação celular, no desenvolvimento embrionário e na eclosão de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne javanica*. Summa Phytopathologica, 34: 29-33.
- CHARCHAR, J.M. & ARAGÃO, F.A.S. 2003. Sequência de cultivos no controle de *Meloidogyne javanica* em campo. Nematologia Brasileira, 27: 81-86.
- CHARCHAR, J.M. & MOITA, A.W. 1996. Reação de cultivares de alface à infecção por misturas populacionais de *Meloidogyne incognita* raça 1 e *Meloidogyne javanica* em condições de campo. Horticultura Brasileira 14: 185-189.
- DALLEMOLE-GIARETTA, R. 2008. Isolamento, identificação e avaliação de *Pochonia chlamydosporia* no controle de *Meloidogyne javanica* e na promoção de crescimento de tomateiro. (Tese de Doutorado). Universidade Federal de Viçosa – Departamento de Fitopatologia, Viçosa - MG, 83 p.
- DALLEMOLE-GIARETTA, R., ZOOCA, R.J.F.; FREITAS, L.G.; NEVES, W.S.; FERRAZ, S. & FABRY, C.F.S. 2006. *Pochonia chlamydosporia* como promotor de crescimento de plântulas de tomateiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, XXXIX, Salvador. Resumos, p. 191.

- DE LEIJ, F.A.A.M. & KERRY, B.R. 1991. The nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium* as a potential biological control agent for *Meloidogyne arenaria*. *Revue de Nématologie*, 14: 157-164.
- DE LEIJ, F.A.A.M.; KERRY, B.R. & DENNEHY J.A. 1992. The effect of fungal application rate and nematode density on the effectiveness of *Verticillium chlamydosporium* as a biological control agent for *Meloidogyne incognita*. *Nematologica*, 38: 112-122.
- DUTRA, M.R. & CAMPOS, V.P. 2003. Manejo do solo e da irrigação como nova tática de controle de *Meloidogyne incognita* em feijoeiro. *Fitopatologia Brasileira*, 28: 608-614.
- DUTRA, M.R.; CAMPOS, V.P. & TOYOTA, M. 2003. Manejo do solo e da irrigação para o controle de *M. javanica* em alface. *Nematologia Brasileira*, 27: 29-34.
- DUTRA, M.R.; CAMPOS, V.P.; ROCHA, F.S.; SILVA, J.R.C. & POZZA, E.A. 2006. Manejo do solo e da irrigação no controle de *Meloidogyne incognita* em cultivo protegido. *Fitopatologia Brasileira*, 31: 405-407.
- EBADI, M.; FATERNI, S. & RIAHI, H. 2009. Evaluation of *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* as a control agent of *Meloidogyne javanica* on pistachio. *Biocontrol Science and Technology*, 19: 689-700.
- FAO. Statistical Databases. Crops Primary. Disponível em: <http://www.fao.org>. Acesso em: 10 de Outubro de 2009.
- FERRAZ, S.; DIAS, C.R. & FREITAS, L.G. 2001. Controle de nematoides com práticas culturais. In: ZAMBOLIM, L. (Ed). Manejo Integrado-Fitossanidade: Cultivo protegido, pivô central e plantio direto. Editora UFV, Viçosa, pp. 1-52.

- FERRAZ, S. & SANTOS, M.A. 1995. Controle biológico de fitonematoides pelo uso de fungos. *Revisão Anual de Proteção de Plantas* 3: 283-314.
- FLORES-CAMACHO, R; ATKINS, S.D.; MANZANILLA-LÓPEZ, R.H.; PRADO-VERA, I.C. & MARTÍNEZ-GARZA, Á. 2008. Caracterización de aislamientos mexicanos de *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* (Goddard) Zare y Gams para el control biológico de *Nacobbus aberrans* (Thorne) Thorne y Allen. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 26: 93-104.
- FREIRE, F.C.O. & BRIDGE, J. 1985. Parasitism of eggs, females and juveniles of *Meloidogyne incognita* by *Paecilomyces lilacinus* and *Verticillium chlamydosporium*. *Fitopatologia Brasileira*, 10: 577-596.
- FREITAS, L.G., DALEMOLLE-GIARETTA, R.; ZOOCA, R.J.F.; PODESTÁ, G.S. & FERRAZ, S. 2009. Controle biológico de nematoides: estudo de casos. In: ZAMBOLIM, L. & M.C. PICANÇO. (Eds). *Controle biológico pragas e doenças exemplos práticos*. Editora UFV, Viçosa, pp. 41-82.
- FREITAS, L.G.; NEVES, W.S.; CARMO, D.N. & SILVA, G.S. 2000. First case of induction of soil suppressiveness to root-knot nematode by *Pasteuria penetrans* in large areas in the field in Brazil. In: XXII CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, Uberlândia. Resumos, p. 129.
- GASPARD, J.T.; JAFFEE, B.A. & FERRIS, H. 1990. Association of *Verticillium chlamydosporium* and *Paecilomyces lilacinus* with root-knot nematode infested soil. *Journal of Nematology*, 22: 207-213.
- GODOY, G.; RODRIGUEZ-KÁBANA, R. & MORGAN-JONES, G. 1983. Fungal parasites of *Meloidogyne arenaria* eggs in an Alabama soil. A mycological survey and greenhouse studies. *Nematropica*, 13: 201-213.

- GOODELL, P.B. & FERRIS, H. 1989. Influence of environmental factors on the hatch and survival of *Meloidogyne incognita*. *Journal of Nematology*, 21: 328-334.
- HIDALGO-DÍAZ, L.; BOURNE, J.M.; KERRY, B.R. & RODRÍGUEZ, M.G. 2000. Nematophagous *Verticillium* spp. in soils infested with *Meloidogyne* spp. in Cuba: isolation and screening. *International Journal of Pest Management*, 46: 277-284.
- HUSSEY, R.S. & BARKER, K.R. 1973. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. *Plant Disease Reporter*, 57: 1025-1028.
- JACOBS, H.; GRAY, S.N. & CRUMP, D.H. 2003. Interactions between nematophagous fungi and consequences for their potential as biological agents for the control of potato cyst nematodes. *Mycological Research*, 107: 47-56.
- JATALA, P. 1986. Biological control of plant-parasitic nematodes. *Annual Review of Phytopathology*, 24: 453-489.
- KERRY, B.R. 1975. Fungi and the decrease of cereal cyst-nematode populations in cereal monoculture. *EPPO Bulletin*, 5: 353-361.
- KERRY, B.R. 1990. An assessment of progress toward microbial control of plant parasitic nematodes. *Journal of Nematology*, 22: 621-631.
- KERRY, B.R. 1991. Methods for studying the growth and survival of the nematophagous fungus, *Verticillium chlamydosporium* Goddard, in soil. *Bulletin SROP*, 14: 34-38.
- KERRY, B.R. 2001. Exploitation of nematophagous fungal *Verticillium chlamydosporium* Goddard for the biological control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). In: BUTT, T.M.; JACKSON, C. &

MAGAN, N. (Eds). Fungi as biocontrol agents: Progress, problems and potential. CAB International, Wallingford, 380 p.

KERRY, B.R. & BOURNE, J.M. 1996. The importance of rhizosphere interactions in the biological control of plant parasitic nematodes – a case study using *Verticillium chlamyosporium*. Pesticide Science, 47: 69-75.

KERRY, B.R.; CRUMP, D.H. & MULLEN, L.A. 1982. Studies of the cereal cyst nematode, *Heterodera avenae* under continuous cereals 1975 – 1978. II. Fungal parasitism of nematode eggs and females. Annals of Applied Biology, 100: 489-499.

KERRY, B.R.; IRVING, F. & HORNSEY, J.C. 1986. Variation between strains of the nematophagous fungus, *Verticillium chlamyosporium* Goddard. I. Factors affecting growth *in vitro*. Nematologica, 32: 461-473.

KHAN, H.; AHMED, R. & KHAN, S.M. 2001. Evaluation of culture filtrates of different fungi on the hatching of *Meloidogyne incognita*. Pakistan Journal of Phytopathology, 13: 58-60.

LEE, D.L. & ATKINSON, H.J. 1977. Physiology of nematodes. New York. Columbia University Press, 215 p.

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

LOPEZ-LLORCA, L.V.; BORDALLO, J.J.; SALINAS, J.; MONFORT, E. & LÓPEZ-SERNA, M.L. 2002. Use of light and scanning electron microscopy to examine colonization of barley rhizosphere by the nematophagous *Verticillium chlamyosporium*. Micron, 33: 61-67.

- LORDELLO L.G.E. & MARINI P.R. 1974. Alguns nematoides parasitos de plantas no Rio Grande do Sul. *Revista de Agricultura*, 49: 15-18.
- MARCIÁ-VICENTE, J.G.; ROSSO, L.C.; CIANCIO, A.; JANSON, H.B. & LOPEZ-LLORCA, L.V. 2009. Colonization of roots by endophytic *Fusarium equiseti* and *Pochonia chlamydosporia*: Effects on plant growth and disease. *Annals of Applied Biology*, 155: 391-401.
- MAUHLIN, T.H.; KERRY, B.R. & HIRSCH, P.R. 2004. The biocontrol fungus *Pochonia chlamydosporia* shows nematode host preference at the infraspecific level. *Mycological Research*, 108: 161-169.
- MENDES W.P. 1998. Hospedabilidade e resistência de cultivares de alface (*Lactuca sativa* L.) aos nematoides das galhas *Meloidogyne incognita* (raças 1, 3 e 4) e *Meloidogyne javanica*. (Tese mestrado). Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG, 43 p.
- MONFORT, E.; LOPEZ-LLORCA, L.V.; JANSSON, H-B.; SALINAS, J.; PARK, J.O. & SIVASITHAMPARAM, K. 2005. Colonization of seminal roots of wheat and barley by egg-parasitic nematophagous fungi and their effects on *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* and development of root rot. *Soil Biology & Biochemistry*, 37: 1229-1235.
- MORGAN-JONES, G.; GODOY, G. & RODRÍGUEZ-KÁBANA, R. 1981. *Verticillium chlamydosporium* fungal parasite of *Meloidogyne arenaria* females. *Nematropica*, 11: 115-120.
- MORGAN-JONES, G.; WHITE, J.F. & RODRÍGUEZ-KÁBANA, R. 1983. Phytonematode pathology: Ultrastructural studies. I. Parasitism of *Meloidogyne arenaria* eggs by *Verticillium chlamydosporium*. *Nematropica*, 13: 245-260.
- MUKHTAR, T. & PERVAZ, I. 2003. In vitro evaluation of ovicidal and larvicidal effects of culture filtrate of *Verticillium chlamydosporium* against

Meloidogyne javanica. International Journal of Agriculture and Biology, 5: 576-579.

PETEIRA, B.; PUERTAS, A.; HIDALGO-DIAS, L.; HIRSCH, P.; KERRY, B. & ATKINS, S. 2005. Real-time PCR to monitor and assess the efficacy of two types of inoculum of the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* against root-knot nematode populations in the field. Biotecnología Aplicada, 22: 261-260.

PODESTÁ, G.S.; DALLEMOLE-GIARETTA, R.; FREITAS, L.G.; LOPES, E.A.; FERRAZ, S. & ZOOCA, R.J.F. 2009. Atividade nematófaga de *Pochonia chlamydosporia* em solo natural ou autoclavado sobre *Meloidogyne javanica*. Nematologia Brasileira, 33: 191-193.

RIBEIRO, R.C.F. & CAMPOS, V.P. 1993. Isolamento, identificação e efeito da temperatura no crescimento *in vitro* de fungos parasitas de ovos de *Meloidogyne* spp. do sul de Minas Gerais. Nematologia Brasileira, 17: 132-139.

SASSER, J.N. & FRECKMAN, D.W. 1987. A world perspective on nematology: The role of the society. Pp. 7-14. In: VEECH, J. & DICKSON, D. W. (Eds). Vistas on Nematology: A commemoration of the twenty-fifth anniversary of the society of nematologists. Hyatsville, Maryland.

SIDDIQUI, I.A.; ATKINS, S.D. & KERRY, B.R. 2009. Relationship between saprotrophic growth in soil of different biotypes of *Pochonia chlamydosporia* and the infection of nematode eggs. Annals of Applied Biology, 155: 131-141.

SIDDIQUI, Z.A. & AKHTAR, M.S. 2009. Effect of plant growth promoting rhizobacteria, nematode parasitic fungi and root-nodule bacterium on root-knot nematodes *Meloidogyne javanica* and growth of chickpea. Biocontrol Science and Technology, 19: 511-521.

- STATSOFT, Inc. 2004. Statistica for Windows (computer program manual). Tulsa, OK: Statsoft Inc. (<http://www.statsoft.com>).
- STIRLING, G.R. 1991. Biological control of plant-parasitic nematodes: Progress, problems, and prospects. Wallingford, U.K: CAB International, 282 p.
- SUN, M.H.; GAO, L.; SHI, Y.X.; LI, B.J. & LIU, X.Z. 2006. Fungi and actinomycetes associated with *Meloidogyne* spp. eggs and females in China and their biocontrol potential. *Journal of Invertebrate Pathology*, 93: 22-28.
- TIHOHOD, D. 1993. *Nematologia agrícola aplicada*. Jaboticabal: FUNEP, 372 p.
- VAN GUNDY, S.D.; BIRD, A.F. & WALLACE, H.R. 1967. Aging and starvation in juvenile or *Meloidogyne javanica* and *Tylenchulus semipenetrans*. *Phytopathology*, 57: 559-571.
- VERDEJO-LUCAS, S.; SORRIBAS, F.J.; ORNAT, C. & GALEANO, M. 2003. Evaluating *Pochonia chlamydosporia* in a double-cropping system of lettuce and tomato in plastic houses infested with *Meloidogyne javanica*. *Plant Pathology*, 52: 521-528.
- WANG, K.; RIGGS, R.D.; & CRIPPEN, D. 2005. Isolation, selection and efficacy of *Pochonia chlamydosporia* for control of *Rotylenchulus reniformis* on cotton. *Phytopathology*, 95: 890-893.
- WILLCOX, J. & TRIBE, H.T. 1974. Fungal parasitism in cysts of *Heterodera*. I Preliminary investigations. *Transactions of the British Mycological Society*, 62: 585-594.