



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MARINA CAPPARELLI CADIOLI

APLICAÇÃO DE *Paecilomyces lilacinus* SOBRE *Folsomia candida* E *Enchytraeus crypticus* E A INTERAÇÃO NO DESENVOLVIMENTO DE *Meloidogyne paranaensis*

Londrina
2010

MARINA CAPPARELLI CADIOLI

APLICAÇÃO DE *Paecilomyces lilacinus* SOBRE *Folsomia candida* E *Enchytraeus crypticus* E A INTERAÇÃO NO DESENVOLVIMENTO DE *Meloidogyne paranaensis*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Agronomia.

Orientadora: Profa. Dra. Débora Cristina Santiago
Co-Orientador: Prof. Dr. José Paulo Souza

Londrina
2010

MARINA CAPPARELLI CADIOLI

**APLICAÇÃO DE *Paecilomyces lilacinus* SOBRE *Folsomia candida* E
Enchytraeus crypticus E A INTERAÇÃO NO DESENVOLVIMENTO DE
*Meloidogyne paranaensis***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Agronomia.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Amarildo Pasini – UEL

Prof. Dr. Marco Antonio Nogueira – UEL

Pesquisadora Dra. Alaíde Aparecida Krzyzanowski
– IAPAR

Prof. Dr. Silvestre Bellettini – UENP/CLM

Prof. Dr. Pedro Manuel Oliveira Janeiro Neves –
UEL

Profa. Dra. Nair Mieko Takaki Bellettini –
UENP/CLM

Profa. Dra. Débora Cristina Santiago
Orientadora
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 16 de abril de 2010.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Ana e Roberto Cadioli pelo exemplo de amor, dedicação e pelos ensinamentos para viver com dignidade e sabedoria. À minha irmã Isabela e ao meu cunhado Fernando Weffort pela paciência, amor e conselhos que me ajudaram a superar este desafio com equilíbrio. Aos meus avós, Therezinha Capparelli e Agile Cadioli pelos ensinamentos de vida. Ao meu sobrinho Francisco Cadioli Weffort por me trazer alegria nos momentos mais difíceis e aos meus familiares e amigos que me incentivaram em mais esta etapa de minha vida.

Aos meus avós Marina Cadioli e Waldemar Capparelli “in memoriam”, com muita saudade e orgulho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, pois foi Nele que encontrei forças para continuar seguindo meu caminho.

À minha orientadora Professora Doutora Débora Cristina Santiago não só pela constante orientação, fundamental para o meu aprimoramento profissional, mas sobretudo pela sua amizade que foi e será muito importante para o meu crescimento pessoal.

Ao meu co-orientador Professor Doutor José Paulo Souza da Universidade de Coimbra pela enorme orientação, receptividade, pelos ensinamentos passados, pela confiança e pelo grande apoio no período de Doutorado Sanduíche.

À Professora Doutora Isabel Abrantes e à Professora Doutora Isabel Luci da Conceição da Universidade de Coimbra pela receptividade, pelo apoio e ensinamentos no período de Doutorado Sanduíche.

À Professora Doutora Elke Jurandy Bran Nogueira Cardoso, ao Professor Doutor Marco Antônio Nogueira e ao Pós Graduando Alexandre Martin Martinês pela enorme confiança e pela oportunidade de disponibilizarem o Doutorado Sanduíche.

Ao Professor Doutor Martin Homechin “in memorian”, ao Professor Seiji Igarashi pela presteza e dicas fundamentais para o aprimoramento deste trabalho. À professora doutora Inês Fonseca pela ajuda fundamental e dicas na estatística de todos os trabalhos desta tese.

À pesquisadora do Instituto Agrônômico do Paraná Alaíde Aparecida Krzyzanowski pela enorme ajuda e apoio durante o trabalho que contribuiu para que este trabalho pudesse ser concluído.

Aos Professores do Departamento de Agronomia da Universidade Estadual de Londrina pelo privilégio do convívio amigo e ensinamentos.

Ao representante da região Beira Litoral de Portugal da Bayer CropScience Mario Santiago.

Aos colegas de pós graduação Fernando Cesar Baida, Cristiane Gardiano, Silvia Hulse, Luciamara Koga, Patrícia Santoro, Ricardo Levy e Adriano Thibes Hoshino que me ajudaram e me incentivaram nesta etapa de minha vida.

Aos colegas pós graduandos da equipe do laboratório de solos e de nematologia da Universidade de Coimbra Antonella Petrucci, Catia Silva, Sonia Chelinho, Tiago Natal da Luz, Dalila Costa, Carla Martins “in memorian”, Maria Clara Vieira dos

Santos, Carla Maria Maleita e Luís Fonseca.

Aos graduandos em agronomia e amigos do Laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual de Londrina Camila Torres Stroze, Vanessa dos Santos Paes, Giovane de Oliveira Arieira, Roger Pereira e César Sbrussi pela ajuda e amizade.

Ao técnico do Laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual de Londrina, José Aparecido Rocha, pela amizade e ensinamentos passados nesta fase de minha vida.

Ao Professor Alberto Schiesari pela correção ortográfica desta tese e amizade nesta fase pré-tese.

Aos meus pais, Ana e Roberto Cadioli que me deram forças e me incentivaram sempre com muito amor e compreensão.

Aos meus avós Agile Cadioli e Therezinha Capparelli que mesmo com a distância me incentivaram em pensamento, pela garra e coragem para viver uma vida digna.

À minha irmã Isabela Cadioli Weffort e meu cunhado Fernando Weffort pelo carinho, dedicação e paciência em todos os momentos de mais esta estapa de minha vida.

Ao meu sobrinho Francisco Cadioli Weffort por me lembrar a alegria de criança e isto me ajudou a viver com mais tranquilidade e paz.

Ao meu namorado David Neto, pela enorme paciência, dedicação, incentivo, e, principalmente, apoio nos momentos mais difíceis sempre me confortando e fortalecendo.

Aos meus amigos e minhas amigas Thaíse Nagafuchi, Natália Cadioli, Ana Ligia Malagolli, Bruno Cadioli e André Torres, pela paciência, dedicação, compreensão, tolerância e carinho que me ajudaram a superar mais este desafio.

Às minhas amigas brasileiras residentes em Portugal à época da elaboração desta, Jucymara dos Santos, Alice Motta, Ana Pavla, Renata de Freitas, Simony Coelho, Fátima Cabral e Antonella Petrucci.

Aos meus familiares e amigos que me apoiaram e sempre me confortaram com palavras doces de incentivo para que eu atingisse a minha meta.

“Cada conquista, cada passo adiante, no conhecimento, é consequência da coragem, da dureza contra si mesmo, da honestidade para consigo...”

Friedrich Nietzsche

CADIOLI, Marina Capparelli. **Aplicação de *Paecilomyces lilacinus* sobre *Folsomia candida* e *Enchytraeus crypticus* e a interação no desenvolvimento de *Meloidogyne paranaensis***. 2010. 131 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

RESUMO

Os nematóides do gênero *Meloidogyne* (GOELDI, 1887) causam grandes prejuízos nas principais culturas no mundo. Com a sensibilização da população sobre os problemas causados pelos nematocidas químicos, uma nova alternativa de controle para os fitonematóides precisa ser encontrada para que se possa otimizar o manejo sustentável das lavouras. O controle biológico surgiu como uma alternativa potencial de controle e muitos estudos estão sendo desenvolvidos visando avaliar a aplicação do fungo *Paecilomyces lilacinus* (THOM., 1910) Samson, 1974, em campo para obter uma forma de controle ecologicamente correta. Porém, faltam trabalhos para entender como esta aplicação massal de conídios do fungo *P. lilacinus* afeta os organismos bioindicadores de qualidade do solo, que são organismos padronizados pelos testes do ISO e que respondem rapidamente aos estresses causados ao ambiente. Este trabalho objetivou avaliar os isolados do fungo *P. lilacinus* UELpae 18, UELpae 22 e UELpae Mix na formulação em pó molhável e suspensão concentrada em plantas de cafeeiro (*Coffea arabica* L. cv Iapar 59) em casa de vegetação no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Londrina, Londrina- Brasil. Foi avaliada a aplicação de diferentes concentrações de conídios do isolado UELpae 18 na formulação pó molhável em testes de reprodução com os organismos bioindicadores de qualidade de solo, um teste utilizando *Folsomia candida* (WILLEM, 1902) e outro utilizando *Enchytraeus crypticus* (WESTHEIDE; GRAEFE, 1992) em laboratório. Avaliou-se também o efeito desta aplicação deste fungo em microcosmos e as interações entre os organismos *Meloidogyne paranaensis*, *P. lilacinus*, *F. candida* e *E. crypticus* em plantas de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Easypeel) nas dependências do Instituto do Mar (IMAR), Universidade de Coimbra, Coimbra-Portugal. Os resultados indicaram que os isolados UELpae 18, UELpae 22 e UELpae Mix nas duas formulações foram eficazes na redução da população de nematóide *M. paranaensis* em plantas de cafeeiro. No efeito da aplicação de diferentes concentrações do fungo *P. lilacinus* na reprodução dos dois organismos bioindicadores *F. candida* e *E. crypticus*, verificou-se que o aumento da concentração dos conídios do fungo *P. lilacinus* diminuiu a reprodução dos colêmbolos, o fungo não influenciou na reprodução de enquitreídeos e houve indícios de que os dois organismos bioindicadores se alimentaram do fungo *P. lilacinus*. Em microcosmos foi verificado que o tratamento que continha apenas o fungo nematófago e os tratamentos que continham o fungo em conjunto com os dois bioindicadores juntos ou sozinhos, reduziram a população de *M. paranaensis* em raízes de tomateiro, inclusive na presença de *E. crypticus* e *F. candida*, ambos na ausência do fungo indicando que são organismos com potencial biocontrole de nematóides. Mais estudos devem ser feitos sobre medidas conjuntas de manejo sustentável permitindo um manejo associado ecologicamente correto e eficaz.

Palavras-chave: Nematóides formadores de galhas. Fungo nematófago. Biocontrole. Bioindicadores de qualidade do solo. Manejo sustentável.

CADIOLI, Marina Capparelli. **Application of *Paecilomyces lilacinus* on *Folsomia candida* and *Enchytraeus crypticus* and the interaction on the development of the *Meloidogyne paranaensis***. 2010. 131 p. Thesis (Doctorate in Agronomy) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

ABSTRACT

Nematodes of the genus *Meloidogyne* (GOELDI, 1887) cause losses in major crops grown worldwide. With the population's awareness about the problems caused by chemical nematicides, a new alternative for nematode control in order one can optimize the sustainable management of plantations. Biological control has emerged as a potential alternative control and many studies are being developed to evaluate the application of the fungus *Paecilomyces lilacinus* (THOM., 1910) Samson, 1974, in field and thus obtaining a form of environmentally friendly control. However, there are not enough studies to understand how this mass application of the fungus *P. lilacinus* affects bioindicators organisms of soil quality, which are standardized by ISO testing methodologies and instantly respond to the aggressions caused to the environment. This study aimed the evaluation of the isolates of the fungus *P. lilacinus* UELpae 18, UELpae 22 and UELpae Mix in wettable powder and concentrated suspension formulation in coffee plants (*Coffea arabica* L. cv Iapar 59) in greenhouse in the Center for Agricultural Sciences, State University of Londrina, Londrina-PR, Brazil. It was evaluated the application of different concentrations of conidia of isolate UELpae 18 wettable powder formulation in reproduction tests of bioindicators organisms of soil quality, a test using *Folsomia candida* (WILLEM, 1902) and *Enchytraeus crypticus* (WESTHEIDE; GRAEFE, 1992) in laboratory. It was also evaluated the effect of this application of the fungus in microcosms with all the interactions of organisms *Meloidogyne paranaensis*, *P. lilacinus*, *F. candida* and *E. crypticus* on tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Easypeel) on the premises of the Institute of Marine Research (IMAR), University of Coimbra, Coimbra, PT. The results indicated that the isolates UELpae 18, UELpae 22 and UELpae Mix the two formulations were effective in reducing the population of nematode *M. paranaensis* in coffee plants. When it was evaluated the effect of different concentrations of the fungus *P. lilacinus* on the reproduction of the two bioindicators organisms *F. candida* and *E. crypticus* it was observed that the concentration of conidia of the fungus *P. lilacinus* influences the reproduction of Collembola and there was evidence the two bioindicators organisms fed on the fungus *P. lilacinus*. And when the work was assessed in microcosms it was found that the treatment with only the nematophagous fungus and the treatments containing the fungus together with the two bioindicators alone or together reduced the population of *M. paranaensis* in tomato roots, even when containing *E. crypticus* and *F. candida* without the presence of the fungus, indicating that they are organisms for potencial biocontrol of nematodes. More studies to be made on joint measures for sustainable management in order to get a friendly and efficient associated management.

Keywords: Root-knot nematodes. Nematophagous fungus. Biocontrol. Bioindicators of Soil Quality. Sustainable management.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 NEMATÓIDES FITOPARASITAS.....	14
2.1.1 Gênero <i>Meloidogyne</i> Goeldi, 1892.....	14
2.1.2 Perdas Causadas por <i>Meloidogyne</i> spp.....	16
2.1.3 Controle de Fitonematóides.....	17
2.2 <i>Paecilomyces lilacinus</i> (THOM.) SAMSON	19
2.2.1 Classificação e morfologia de <i>P. lilacinus</i>	19
2.2.2 Modo de infecção de <i>P. lilacinus</i>	19
2.2.3 Desenvolvimento de <i>P. lilacinus</i>	22
2.2.4 Potencial de biocontrole de <i>P. lilacinus</i>	24
2.3 ECOTOXICOLOGIA.....	30
2.3.1 Testes Ecotoxicológicos	31
2.3.2 Microcosmos	32
2.4 ORGANISMOS BIOINDICADORES DE QUALIDADE DO SOLO.....	33
2.4.1 <i>Folsomia candida</i> (WILLEM, 1902)	34
2.4.1.1 Biologia de <i>Folsomia cãndida</i>	34
2.4.1.2 Uso de <i>F. candida</i> na ecotoxicologia	35
2.4.1.3 Influência dos fatores ambientais em <i>F. cãndida</i>	36
2.4.2 <i>Enchytraeus crypticus</i> (WESTHEIDE; GRAEFE, 1992)	38
2.4.2.1 Biologia de <i>E. crypticus</i>	41
2.4.2.2 Uso de <i>E. crypticus</i> na ecotoxicologia.....	41
2.4.2.3 Influência dos fatores ambientais em <i>E. crypticus</i>	42
3 ARTIGO A – EFEITO DE FORMULAÇÕES DE <i>Paecilomyces lilacinus</i> PARA MANEJO DA POPULAÇÃO DE <i>Meloidogyne paranaensis</i> EM MUDAS DE CAFEIEIRO	45
3.1 RESUMO E ABSTRACT	45
3.2 INTRODUÇÃO	46
3.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	48

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
3.5 CONCLUSÕES	53
3.6 AGRADECIMENTOS	53
3.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

4 ARTIGO B – INFLUÊNCIA DA APLICAÇÃO DE *Paecilomyces lilacinus* EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES SOBRE A REPRODUÇÃO DE ORGANISMOS BIOINDICADORES *Folsomia candida* E *Enchytraeus crypticus*

4.1 RESUMO E ABSTRACT	59
4.2 INTRODUÇÃO	60
4.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	63
4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	65
4.5 CONCLUSÕES	68
4.6 AGRADECIMENTOS	68
4.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

5 ARTIGO C – INTERAÇÃO ENTRE *Folsomia candida*, *Enchytraeus crypticus* E *Meloidogyne paranaensis* EM RESPOSTA AO FUNGO *Paecilomyces lilacinus*

5.1 RESUMO E ABSTRACT	77
5.2 INTRODUÇÃO	78
5.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	81
5.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	83
5.5 CONCLUSÕES	91
5.6 AGRADECIMENTOS	91
5.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91

6 CONCLUSÕES GERAIS

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....

REFERÊNCIAS

1 INTRODUÇÃO

Os nematóides constituem o grupo mais abundante de animais multicelulares, estimado em um milhão de espécies (VIGLIERCHIO, 1991; BAXTER, 2003). Nematóides formadores de galhas (*Meloidogyne* spp.) estão entre os grupos de nematóides parasitas de plantas mais destrutivos economicamente causando danos e perdas nos campos na maioria das plantas cultivadas em todo mundo (SASSER; FRECKMAN, 1987; SIKORA; FERNANDEZ, 2005) e, segundo Topp et al (1998) e Whiteread (1998) causam mais de 10% de perda na colheita total da produção mundial.

Com o crescimento da sensibilização das limitações do uso de nematicidas no manejo de nematóides, cujo controle químico é caro, não sustentável e afeta o agroecossistema negativamente, os pesquisadores do mundo inteiro têm buscado por métodos de biomanejo dos nematóides formadores de galhas (AHMAD; KHAN, 2004), em que vários agentes de biocontrole têm sido avaliados.

Dentre as medidas de controle, os fungos têm mostrado resultados encorajadores no controle de nematóides formadores de galhas (LEIJ et al., 1993; KHAN; SAXENA, 1996, 1997; NAKAT et al., 1998; JONATHAN; RAJEDRAN, 2000; AHMAD; KHAN, 2004); além disso, o efeito do fungo oportunista na penetração, desenvolvimento e ciclo de vida dos nematóides tem grande importância na estratégia de manejo.

Paecilomyces lilacinus (Thom) Samson é um fungo de solo que tem mostrado resultados promissores como eficaz agente de biocontrole (MORGAN-JONES et al., 1984; JATALA, 1986; DUBE; SMART, 1987; KHAN et al., 2006). É um fungo nematófago oportunista que infecta, coloniza e consome estruturas reprodutivas de nematóides formadores de galhas e cistos nas diferentes fases de seu ciclo de vida sedentário (CANNAYANE; SIVAKUMAR, 2001). Embora diversos trabalhos relatem a eficácia do controle biológico de *P. lilacinus* contra os nematóides formadores de galhas, Cannayane e Sivalkumar (2001) citaram alguns resultados irregulares quando este fungo foi usado em condições de estufa e em campo (KERRY; EVANS, 1996).

Há alguns produtos formulados à base do fungo *P. lilacinus* presentes no mercado, como é o caso do Bioact[®]WG que é composto de seus conídios; foi inicialmente comercializado como 'Biocon' nas Filipinas, mais tarde foi fabricado pela Profyta Ltda. na Alemanha e é atualmente registrado como MeloCon nos EUA (EPA, 2005) e em vários países (ATKINS et al., 2005; KIEWNICK, 2004). O formulado à base de glicose é formado

por grânulos dispersíveis em água, contendo 10^{10} conídios $\times g^{-1}$ e apresenta resultados promissores para o controle de nematóides formadores de galhas em laboratório e em experimentos em casa de vegetação (GIANNAKOU et al., 2004, 2007).

Portanto, além do biocontrole de nematóides, estudos mais aprofundados sobre a microbiota do solo precisam ser feitos para avaliar o impacto da aplicação dos conídios do fungo *P. lilacinus* em outros organismos que vivem no solo em equilíbrio com os nematóides, sobretudo os conhecidos bioindicadores de qualidade do solo por responderem rapidamente às ações antropogênicas e aos fatores de estresse que ocorrem no solo. Testes ecotoxicológicos padronizados têm sido realizados com invertebrados em solo padrão artificial (OECD, 1984), onde os produtos químicos são adicionados a estes substratos em várias concentrações e seus efeitos aos organismos (minhocas, enquitreídeos, colêmbolos e ácaros predadores) são avaliados. Neste trabalho foram utilizados os organismos padrões dos testes ISO com enquitreídeos e colêmbolos, cientificamente nomeados de *Enchytraeus crypticus* e *Folsomia candida*, respectivamente.

Os enquitreídeos pertencem à ordem dos Oligochaeta, ao filo dos Annelida e são os parentes mais próximos das minhocas (ERSÉUS; KÄLLERSJÖ, 2004). Fazem parte da mesofauna saprofítica na camada decompositora do solo, com habilidade de escavação limitada comparada à maioria das minhocas. Podem melhorar, em pequena escala, o manejo da água e do ar do solo, especialmente quando a população é alta, onde são fundamentais em processos como a decomposição da matéria orgânica e a ciclagem de nutrientes (LAAKSO; SETÄLÄ, 1999), sendo considerados os engenheiros do ecossistema (LAVELLE et al., 1997). E os colêmbolos pertencem a ordem dos Collembola, ao filo dos Arthropoda, e são os insetos terrestres mais numerosos, extensamente distribuídos em todo mundo. São microartrópodes bastante estudados do solo (CROMMENTUIJN, 1994; SMITH, 1997). Têm papel muito importante como reguladores da decomposição pela da predação da microfauna. Podem também contribuir com a decomposição da matéria orgânica nos solos ácidos, onde as minhocas e os diplópodes estão ausentes (WILES; KROGH, 1998).

Porém, além dos estudos sobre a patogenicidade do fungo *Paecilomyces lilacinus* sobre a população de nematóides e sua diversidade, também é necessário saber o efeito da aplicação massal deste fungo que será utilizado no controle biológico em áreas infestadas por nematóides formadores de galhas sobre os organismos bioindicadores da qualidade do solo como colêmbolos (*Folsomia candida*) e enquitreídeos (*Enchytraeus crypticus*).

Os objetivos deste trabalho foram: I) estudar o efeito de duas formulações do fungo *Paecilomyces lilacinus* no controle de *Meloidogyne paranaensis* em casa de vegetação em plantas de cafeeiro. II) Avaliar o efeito da aplicação no solo de diferentes concentrações de conídios do isolado de *P. lilacinus* na reprodução dos organismos bioindicadores de qualidade do solo *Folsomia candida* e *Enchytraeus crypticus*. III) Avaliar em microcosmos com plantas de tomateiro o efeito de conídios de *Paecilomyces lilacinus* sobre a reprodução de *Meloidogyne paranaensis*, *Folsomia candida* e *Enchytraeus crypticus* e na sobrevivência do fungo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 NEMATÓIDES FITOPARASITAS

Os nematóides são organismos microscópicos e translúcidos que constituem o grupo mais abundante de animais multicelulares, estimado em um milhão de espécies (VIGLIERCHIO, 1991; BAXTER, 2003).

Aproximadamente 10% dos nematóides são considerados patógenos de plantas e apresentam diversas maneiras de obter os nutrientes necessários para se desenvolver e reproduzir. Estes parasitas biotróficos, dependendo da espécie, se alimentam do citoplasma sem modificar as células vegetais, ou são capazes de modificar as células das raízes das plantas para se alimentar (HUSSEY; GRUNDLER, 1998).

Os nematóides fitoparasitas usam o estilete para penetrar a parede da célula vegetal, injetam secreções glandulares dentro da célula e retiram os nutrientes do citoplasma. Os nematóides removem o citoplasma da célula hospedeira, frequentemente causando a morte celular e depois movem-se para outra célula para repetir o processo. Porém, evolutivamente, algumas espécies de nematóides tornaram-se sedentárias e alimentam-se de uma única célula ou um grupo de células por um prolongado período. Para esta alimentação, os parasitas sedentários modificam as células das raízes dos hospedeiros suscetíveis em células de alimentação elaborada, incluindo uma modificação complexa com mudanças na expressão gênica, fisiologia, morfologia e função das células das plantas (BIRD, 1996; GHEYSEN; FENOLL, 2002).

2.1.1 Gênero *Meloidogyne* Goeldi, 1892

O primeiro registro da existência de nematóides formadores de galhas no Brasil foi descrito por Jobert em 1878 em visita ao país, com o objetivo de identificar a causa do declínio dos cafezais da então chamada Província do Rio de Janeiro. Na ocasião ele associou o problema dos cafezais com a presença de numerosos engrossamentos nas raízes das plantas examinadas, alguns com tamanho de uma pequena ervilha. Também observou a

presença de ovos e minúsculos vermes associados a essas malformações. Este registro foi concluído por Göeldi, um naturalista suíço, que trabalhava no Museu Nacional do Rio de Janeiro, nos “primeiros dias de novembro de 1887”, embora os resultados só tenham sido publicados em novembro de 1892. Göeldi descreveu a causa da moléstia que devastou a cafeicultura do Brasil como sendo um nematóide microscópico e parasito de raízes, e o denominou de *Meloidogyne exigua*. Assim, estava criado o “gênero” o qual ainda hoje, em todo o mundo, é tido como o mais prejudicial e importante para as plantas cultivadas (KRZYZANOWSKI, 2006).

Pertencente à família Heteroderidae, o gênero *Meloidogyne* Göeldi, 1892 é compreendido pelas espécies designadas como “formadoras de galhas” ou “root-knot nematodes”. Até 1988, o gênero incluía mais de 60 espécies (EISENBACK; TRIANTAPHYLLOU, 1991).

No Brasil, várias espécies têm sido constatadas, dentre elas *M. incognita* (KOFOID & WHITE) Chitwood, *M. javanica* (TREUB) Chitwood, *M. exigua* Göeldi, *M. arenaria* (NEAL) Chitwood, *M. hapla* Chitwood, *M. coffeicola* Lordello & Zamith, *M. thamesi* Chitwood, *M. lordelloi* da Ponte, *M. bauruensis* Lordello, *M. elegans* da Ponte, e *M. inomata* Lordello, sendo as três primeiras, até então, as mais disseminadas (FERRAZ, 1985).

M. incognita, *M. exigua* e *M. coffeicola* têm sido relatadas já há vários anos em plantações de café nos Estados do Paraná, São Paulo e Minas Gerais, em populações puras ou misturadas, com variações da espécie dominante (CAMPOS et al., 1990; LORDELLO et al., 1974). Um levantamento realizado no estado do Paraná mostra um aumento na distribuição da população de *M. incognita* e uma diminuição da população de *M. coffeicola* (CARNEIRO; CARNEIRO, 1982), e com este fato acredita-se que *M. coffeicola* tenha sido erradicado pelas muitas substituições das plantações após terem estas sido dizimadas no inverno rigoroso de 1975 (CAMPOS et al., 1990).

Em áreas infestadas com as espécies do gênero *Meloidogyne*, o crescimento, translocação de água e nutrientes e a produção do cafeeiro é seriamente comprometida (ARRUDA, 1960). Uma resposta do cafeeiro à presença de *Meloidogyne* sp. na raiz é a formação de galhas no sistema radicular, resultado da hipertrofia de células do cilindro central ao redor do corpo do nematóide que ali se desenvolve, comprimindo os vasos do xilema e reduzindo a absorção e transporte de água e nutrientes. Em consequência deste parasitismo, a parte aérea de cafeeiro exhibe sintomas de deficiências nutricionais, queda de folhas, ocorrência do bicho mineiro e cercosporiose com altas infestações. O sistema radicular é reduzido e observa-se uma queda na produção, e conseqüentemente, quanto maior o estresse

que a planta estiver sofrendo, menor a população de fitonematóides necessária para causar mais danos.

Carneiro (1993) relatou uma variação em *M. incognita* em cafeeiro denominando-o “biótipo IAPAR” e relatou também que populações deste nematóide foram encontradas associadas ao cafeeiro no Estado do Paraná com ocorrência em aproximadamente 52% das áreas infestadas pelos nematóides de galhas. Este nematóide pode ter estado presente nas plantações de café brasileiras por muitos anos e tem sido relatado como “populações não identificadas de *Meloidogyne* spp. no café” (ESBENSHADE; TRIANTAPHYLLOU, 1985). Tendo como base diferenças morfológicas e biológicas e comparado a outras espécies de *Meloidogyne* spp., anteriormente descrito como uma nova raça de *M. incognita*, ele foi descrito, ilustrado e designado como *M. paranaensis* n. sp. por Carneiro et al. (1996).

2.1.2 Perdas Causadas por *Meloidogyne* spp.

Em culturas de importância econômica como algodão, fumo, batata, tomate, cenoura, soja, cana-de-açúcar, café, frutíferas e muitas outras os nematóides de galhas chegam a ser fator limitante (LORDELLO, 1984; FERRAZ, 1985). De acordo com Sasser (1979), cerca de 12,3% da produção agrícola mundial são perdidas anualmente em decorrência do ataque dos nematóides, equivalendo a prejuízos de mais de 100 bilhões de dólares e segundo Agrios (1997) são estimadas em aproximadamente 80 bilhões de dólares por ano. Dados mostram que os nematóides fitoparasitas causam danos (8 a 20%) e perdas (87 bilhões de dólares) por ano nos campos das principais plantas cultivadas em todo o mundo (SASSER; FRECKMAN, 1987).

Na agricultura americana, essas perdas são estimadas em 8 bilhões de dólares por ano, o que corresponde a 10% em relação à agricultura mundial (BARKER et al., 1994). No Brasil, a quantificação de perdas não é precisa, devido principalmente às interações com danos provocados por pragas e outras doenças, condições climáticas, presença de plantas invasoras e inadequação de tratamentos culturais. Em vista do desconhecimento da importância econômica dos nematóides, esses organismos têm sido freqüentemente negligenciados nos agroecossistemas, somente assumindo “status” de patógeno quando sua população se encontra muito elevada, com prejuízos acentuados (RITZINGER; FANCELLI, 2006).

2.1.3 Controle de Fitonematóides

Com o aumento da conscientização dos efeitos nocivos dos pesticidas químicos e a mudança da atitude do público em relação à poluição ambiental, os nematicidas químicos perderam sua popularidade entre os agricultores para proteger as suas plantações de infestações de nematóides (PANDEY et al., 2000). As preocupações ambientais e a segurança alimentar têm criado pressões sociais e legislativas para eliminar muitos defensivos agrícolas do mercado (NOLING; DICKSON, 1992; MCKENRY et al., 1994, CALVERT et al., 1998) e com a retirada destes produtos, por exemplo, do brometo de metila, uma nova estratégia ambiental compatível com o controle de pragas terá que ser desenvolvida em um espaço de tempo relativamente curto, para evitar perdas significativas de produtividade nas culturas (NOLLING; BECKER, 1994).

As principais medidas de controle dos fitonematóides mais recomendadas são o uso do controle químico, rotação de culturas (SASSER; JR. UZZELL, 1991; JOHNSON et al., 1997; REYNOLDS et al., 2000; PLOEG, 2002; KRATOCHVIL et al., 2004), cultivares resistentes quando disponíveis (WIDMER; ABAWI, 2000), cultura de cobertura, adubação verde, solarização, pousio e controle biológico (BARKER; KOENNING, 1998). No entanto, todo método de controle tem sucesso limitado, e a maioria que se aproxima de um método sustentável de controle de nematóide integra diversas estratégias para o manejo das pragas em um sistema agrícola sustentável (AKHTAR, 1997).

O desenvolvimento viável de estratégias de manejo aponta cada vez mais para uma abordagem integrada do uso de agentes de controle biológico com práticas culturais adequadas, como a resistência da planta hospedeira, plantas nematicidas ou antagônicas e quando necessário o uso criterioso de nematicidas químicos para reduzir populações de nematóides para que fiquem abaixo do limiar de dano econômico (GOWEN et al., 1998; BOURNE; KERRY, 1999; DESAEGER; RAO, 2000).

O controle químico através de nematicidas utilizados como medida preventiva ou para evitar perdas, além de ser muito caro, não sustentável e afetar negativamente o agroecossistema (AHMAD; KHAN, 2004), tem sua utilização por vezes comprometida devido aos efeitos adversos que causam ao meio ambiente (THOMASON, 1987; NOLING; BECKER, 1994) e à comunidade microbiana (STIRLING et al., 1992). Outro fator negativo da sua utilização é a ocorrência de reinfestações periódicas pelo

nematóide, situação normalmente observada após o período residual do produto (JATALA, 1986).

Entretanto, atualmente o controle biológico vem sendo considerado como uma das alternativas dentro de uma abordagem integrada, onde se busca assegurar o desenvolvimento sustentável da agricultura. O uso de inimigos naturais é promissor e torna-se um fascinante campo de investigação, potencialmente útil dentro das medidas duráveis (STIRLING; WEST, 1991), pode atuar no sentido de reduzir as populações de fitonematóides para limiares abaixo do nível de dano econômico (DUNCAN, 1991). Desta forma, os fungos oportunistas têm mostrado resultados encorajadores no controle de nematóides formadores de galhas (LEIJ et al., 1993; KHAN; SAXENA, 1996, 1997; NAKAT et al., 1998; JONATHAN; RAJEDRAN, 2000; AHMAD; KHAN, 2004).

Pela eficiência em relação ao controle dos nematóides de galhas, os fungos têm se destacado como os agentes de controle biológico mais estudados, especialmente os fungos parasitas de ovos. A habilidade dos fungos nematófagos em colonizar a rizosfera tem sido apontada como uma característica importante de um agente de biocontrole (MAIA et al., 2001) pois, para os fungos que parasitam os ovos dos nematóides no solo através do crescimento das hifas, quanto maior o seu desenvolvimento, maior o parasitismo. Sharon et al. (2001) relataram que tratamentos de solo com *Trichoderma harzianum* reduziram galhas nas raízes de tomate causadas por *M. javanica*. Meyer (1999) demonstrou o potencial de biocontrole de dois formulados comerciais de isolados *Verticillium lecanii* contra *M. incognita*. Kerry e Hidalgo-Diaz (2004) desenvolveram um sistema de manejo para controle de nematóides formadores de galhas baseado no fungo nematófago *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* (sinônimo: *Verticillium chlamydosporium*). Além disso, Jaffee (2000) demonstrou que fungos nematófagos como *Hirsutella rhossiliensis* e *Arrobotrys haptotyla* parasitaram efetivamente *Heterodera schachtii* e juvenis de *M. javanica*, respectivamente. O fungo endoparasita de ovos de nematóides *Paecilomyces lilacinus* é o agente de controle biológico mais testado para o manejo de nematóides fitoparasitas (ATKINS et al., 2005).

2.2 *Paecilomyces lilacinus* (THOM.) SAMSON

2.2.1 Classificação e Morfologia de *P. lilacinus*

Paecilomyces lilacinus é um fungo filamentosos, pertencente à classe dos Deuteromicetos, ordem Moniliales (Hyphomycetes). Originalmente foi classificado no gênero *Penicillium* como *P. lilacinus* Thom. (1910), porém Sansom (1974) o reclassificou como *Paecilomyces* Bain, em razão dos conídios originarem em fiálides, e da semelhança que apresentam com *Paecilomyces marquandii* (Masse) S. Hughes. Estas características fizeram com que as duas espécies fossem consideradas intermediárias entre os dois gêneros.

Este fungo obteve diferentes denominações devido à sua ampla distribuição e a pequenas variações micológicas, citando: *Graphium cicadicola* Speg (1911); *Spicaria violacea* Petch (1932); *S. rubidopurpurea* Aoki (1941), que Samson (1974) considerou como sendo sinônimos e o descreveu considerando suas hifas vegetativas como hialinas com diâmetro variável entre 2,5 a 4,0 μm . Também observou que as colônias crescidas em meio ágar-malte atingiam diâmetro entre 5 a 7 cm em quatorze dias na temperatura de 25 °C, as quais consistiam de um feltro basal de micélio floconoso, inicialmente branco, e que durante a esporulação apresentava coloração violácea (Citado por CADIOLI, 2007).

2.2.2 Modo de Infecção de *P. lilacinus*

As interações entre fungos patogênicos e seus hospedeiros têm sido estudadas e a maioria dos patógenos infectam um número limitado de hospedeiros, onde o evento de reconhecimento precisa acontecer primeiro. Isto envolve a combinação de mediadores químicos e características físicas da superfície a ser infectada (SPIEGEL; COHN, 1982; ALLEN et al., 1991). Seguindo o reconhecimento, a adesão é considerada um pré-requisito necessário para a infecção do fungo. Depois da adesão, os fungos formam o apressório, que é a estrutura especializada em aderir na superfície do hospedeiro e alcançar a penetração (EMMETT; PARBERY, 1975). Enzimas podem ser secretadas para degradar a linha abaixo do substrato, e a pressão exercida permite a penetração na superfície do

hospedeiro. Alguns fungos podem exercer uma pressão considerável durante a penetração, como demonstrado por Howard et al. (1991). Depois de ter acesso ao hospedeiro, a hifa cresce e produz conídios dentro e fora do tecido do hospedeiro.

O fungo *P. lilacinus* se caracteriza por atacar massas de ovos de nematóides exercendo uma forte pressão na capacidade reprodutiva, antes do início do ciclo reprodutivo de nematóide (DUNN et al., 1982). Fêmeas do gênero *Meloidogyne* produzem em média 400 a 500 ovos sob condições favoráveis, ao longo de um período variável de quatro a seis semanas. Os ovos ficam aglomerados em massas junto ao corpo das fêmeas, interna ou externamente às raízes, protegidos em meio à substância gelatinosa produzida pelas fêmeas e secretada por células glandulares retais. Além da proteção relativa que oferece frente aos inimigos naturais, tal material atua como “sinalizador” de eventuais condições externas desfavoráveis. Assim, quando ocorre condição de seca mais prolongada e déficit hídrico no solo, a “geléia” fica fortemente desidratada, observando-se interrupção ou suspensão temporária ao desenvolvimento embrionário no interior dos ovos (FERRAZ, 2001). Porém, segundo Morgan-Jones e Rodriguez-Kábana (1985), sua imobilidade o torna mais vulnerável ao ataque pelo micélio dos fungos do solo que os estádios móveis.

No entanto, muitos isolados diferentes de *P. lilacinus* têm sido isolados nos solos, em escleródios fúngicos, em nematóides e em insetos de todo o mundo. Desde que os isolados de *P. lilacinus* são tão numerosos e podem ser encontrados em diferentes hospedeiros, é improvável que todos infectem hospedeiros com a mesma taxa ou com as mesmas enzimas específicas, embora o processo de infecção permaneça essencialmente o mesmo.

Dunn et al. (1982) examinaram a colonização de ovos de *Meloidogyne arenaria* por quatro isolados de *P. lilacinus* sob microscopia eletrônica e relataram que três dos isolados colonizaram os ovos e infectaram por penetração simples, embora ocasionalmente, a infecção foi associada a uma estrutura especializada, possivelmente um apressório. A hifa emergente deu forma a um conidióforo ou continuou a crescer vegetativamente. Holland et al. (1999) relataram que antes de infectar um ovo de nematóide, o isolado 251 de *P. lilacinus* achatou a superfície e pressionou o ovo. Produziu um apressório simples no contato com a parede do ovo do nematóide e depois umas poucas hifas cresceram sobre a superfície, ou formaram uma rede de hifas sobre o ovo. A presença do apressório indicou que os ovos estavam para serem ou já haviam sido infectados.

Segundo Holland et al. (1999), o isolado 251 de *P. lilacinus* infectou ovos que continham juvenis bem formados, bem como ovos imaturos, e foi comparado com os

resultados de Morgan-Jones et al. (1984) que não encontraram diferenças no nível de parasitismo em ovos de *M. arenaria* separados em 3 estágios de desenvolvimento e infectados com um isolado do Alabama de *P. lilacinus*. O isolado 251 de *P. lilacinus* infectou outros estágios sedentários de vida de *M. javanica*. Em contraste, Jatala (1986) descobriu que um isolado do Peru podia infectar somente ovos imaturos.

É vantagem para um agente microbiano de controle biológico infectar ovos de qualquer idade, pois são alvos potenciais por um longo período. Os ovos podem permanecer no solo por muito tempo e geralmente eclodem sob condições ótimas de temperatura e umidade do solo (DE GUIRAN; RITTER, 1979). É provável que haja um período em que os juvenis não eclodidos não são estimulados eclodir, mas o fungo pode continuar crescendo, aumentando as chances de infectar mais ovos. Em juvenis infectados, as hifas permanecem dentro da cutícula da larva e são raramente distinguidas pela luz microscópica, assim é provável que o fungo possa digerir e utilizar a parede do corpo do juvenil de modo que não seja discernido (HOLLAND et al., 1999).

P. lilacinus foi capaz de infectar outras fases da vida sedentária de *M. javanica*, mas isto pode não ser significativo no campo, nos estágios de vida dentro do tecido da planta, onde estão protegidos do fungo. Apressórios não foram vistos em fêmeas, mas isto pode ser devido ao fato de que o apressório ainda não tinha forma ou por causa de diferenças no substrato. A parede do corpo da fêmea, embora mais espessa que a parede do ovo (cerca de 2,0 μm comparados com cerca de 0,6 μm , respectivamente) não tem a dura camada de quitina encontrada na parede do ovo e pode ser mais fácil de penetrar, exigindo assim apressórios menos proeminentes. A infecção ocorreu através da parede do corpo sem nenhuma indicação de que as hifas cresceram por aberturas naturais e os conidióforos cresceram através da parede do corpo antes de produzir os conídios (HOLLAND et al., 1999). Segundo este mesmo autor, o fungo em questão é capaz de crescer e produzir alguns conídios quando apenas alguns poucos nutrientes estão disponíveis. Podem crescer e esporular nos ovos sem imediatamente infectá-los, e isto aumenta a possibilidade de produzir conídios na rizosfera onde os nematóides alvo ocorrem. Uma vez que um ovo está infectado, os nutrientes disponíveis para o fungo podem estimular a proliferação das hifas nos ovos, permitindo o crescimento em ovos adjacentes.

Os filtrados deste fungo possuem efeito tóxico neurotrópico sobre adultos de *Meloidogyne* spp. (DEVRAJAN; SEENIVASAN, 2002). O rompimento enzimático de elementos estruturais e fisiológicos, distúrbios metabólicos conduzidos a partir da biossíntese e transferência de substâncias tóxicas difusíveis pelo fungo são as atividades principais que

afetam deletoriamente a fase reprodutiva do ciclo do nematóide (MORGAN-JONES; RODRÍGUEZ-KÁBANA, 1985). A parede dos ovos dos nematóides é constituída de três camadas, a primeira mais interna chamada de membrana vitelínica, uma membrana quitinosa e uma membrana protéica terciária, devido provavelmente a um enfraquecimento enzimático da camada delgada de natureza protéica e da camada intermediária, o que expõe a camada de quitina que é degradada pelo fungo. Devido aos vacúolos formados entre a camada quitinosa e a lipídica, ocorre entumescimento do ovo e a camada lipídica, que seria a mais interna, quase que desaparece completamente. Dessa forma, o fungo utiliza todo o material nutritivo de um possível juvenil que esteja embrionado, dando continuidade ao seu desenvolvimento vegetativo ou, ainda, formando estruturas reprodutivas (MORGAN-JONES; RODRIGUEZ-KÁBANA, 1985).

2.2.3 Desenvolvimento de *P. lilacinus*

Encontrado em diferentes regiões do mundo, o fungo *P. lilacinus* tem sido observado com maior frequência em regiões quentes. Sua presença tem sido detectada em diferentes tipos de solo, cultivados ou não, sendo mais comuns em profundidades variáveis de 0 - 40 cm (CARNEIRO, 1986). É um parasita facultativo de ovos de nematóides que pode crescer rapidamente “*in vitro*” e a sua sobrevivência no solo não depende da presença dos nematóides (CARNEIRO, 1992).

Independente da origem geográfica dos isolados, o fungo *P. lilacinus* se desenvolve em ampla faixa de temperatura (8 a 38 °C) segundo Duncan (1991). Fioretto e Villacorta (1981), estudando as exigências térmicas para o desenvolvimento de *P. lilacinus*, observaram que as temperaturas 5 e 35 °C foram biostáticas, e consideraram as temperaturas entre 24 e 25 °C como ótimas. Segundo Cadioli et al. (2007), o crescimento micelial dos isolados de *P. lilacinus* teve grande dependência da temperatura de incubação a que foram submetidos, sendo mais rápido na temperatura de 22,5 °C e os isolados de *P. lilacinus* revelaram habilidade para infectar os ovos de *M. paranaensis* “*in vitro*”, principalmente na temperatura de 25 °C. De acordo com Al-Hazmi et al. (1982) alguns autores já haviam observado que o parasitismo de alguns fungos sobre populações de *Meloidogyne* ssp. foi maior em temperaturas variando de 23 a 25° C do que 18 a 32° C.

Em comparação com as bactérias e actinobactérias, os fungos dessa espécie suportam bem as condições de acidez do solo. Segundo Domsch e Gams (1980), toleram um pH entre 2 e 10, com o ótimo de 6,5. Talvez isso seja um indício de sua ampla distribuição nas regiões do mundo.

Foi observado em alguns estudos que concentrações elevadas de NaCl e MgSO₄ levam a modificações morfológicas (MERT; DIZBAY, 1977; PITT, 1973). A melhor esporulação foi observada em meio contendo 1% de NaCl, com ótimo crescimento sem produção de conídios em 3% (MERT; DIZBAY, 1977), com esporulação reduzida a partir de 5 a 10% de NaCl (TRESNER; HAYES, 1971). Seu crescimento é limitado a um potencial osmótico de -270 bars em meio de NaCl (TRESNER; HAYES, 1971).

Utiliza fontes de carbono e energia a partir de um grande número de compostos carbônicos, principalmente monossacarídeos (hexoses e pentoses) e dissacarídeos. A absorção de açúcares é estimulada pela presença do ácido nicotínico, o qual acelera o seu crescimento e a acumulação de carboidratos e lipídeos (PHILIPS; WALKER, 1958).

Possui capacidade de utilizar a maioria das formas minerais e orgânicas de nitrogênio (NO₃, NH₄, extrato de levedura e peptona), sendo a concentração desses elementos no meio mais importante do que a forma como eles são utilizados (DUNCAN, 1991). Tavares et al. (2008) ao estudar o desenvolvimento de colônias do fungo *P. lilacinus* em diferentes meios de cultura, verificaram que os isolados de *P. lilacinus* isolados de solo com cultivo de cafeeiros da região de Londrina-PR conseguiram sintetizar moléculas orgânicas tais como vitaminas, aminoácidos, dentre outros, essenciais para sua sobrevivência, não necessitando sua presença no meio de cultura.

Não apresenta atividade celulolítica e pectinolítica (CARNEIRO, 1986), com moderada atividade hemicelulolítica e quitinolítica (NORDBRING-HERTZ, 1968; OKAFOR, 1967); porém apresenta boa capacidade lignolítica. Apresenta-se fortemente amilolítico e proteolítico (NORDBING-HERTZ, 1968; ANDREEVA et al., 1972).

É citado como possuidor de efeito antibiótico (MARCHISIO; COLLA, 1972) e fungistático (BRIAN; HEMMING, 1947) a partir do filtrado de culturas de onde são extraídos dois antibióticos: a lilacinina, com maior atividade contra os fungos do que contra as bactérias Gram + (YAMANO, 1971) e a leucostatina, poderoso bactericida (Gram +) e fungicida (ARAI et al., 1973).

Substâncias produzidas “*in vitro*” por fungos e bactérias têm sido reportadas inibindo eclosão, afetando mobilidade e causando mortalidade em fitonematóides (COSTA et al., 2000). Carneiro (1986) constatou no filtrado de cultura de *P. lilacinus* uma substância

tóxica letal a ovos de *Meloidogyne arenaria*. Fitters et al. (1993) estudaram a ação de filtrados desse fungo sobre a embriogênese de ovos de *M. hapla*, durante três semanas; em condições estéreis verificaram que em ovos tratados com os filtrados, o desenvolvimento do embrião foi paralisado depois de dois dias, com conseqüente morte em cerca de 88% dos embriões. Costa et al. (2000) observaram que o filtrado de *P. lilacinus* submetido a testes toxicológicos “*in vitro*” e “*in vivo*” era ativo contra a produção de ovos de *M. incognita*, o qual apresentou eficácia similar ao nematicida Aldicarbe. Efeitos adversos do filtrado de culturas de vários fungos na eclosão e na sobrevivência dos nematóides fitoparasitas também foram reportados por Mankau (1969) e Alam et al., (1973). Anver et al. (2001) relataram que o filtrado de cultura de *P. lilacinus* também mostrou ação nematicida. O fungo é conhecido por produzir certos metabólitos tóxicos e/ou enzimas, como β (1-3) glucanase, quitinase, leucostatina, lilacina (MITCHELL; ALLEXANDER, 1963; OKAFOR, 1967; ARAI et al., 1973, DOMSCH et al., 1980). Assim, esta presença no filtrado fúngico pode ser responsável pelo efeito deletério nos nematóides.

Com grande frequência, sua presença tem sido constatada mesmo em solos submetidos ao tratamento com fungicidas, como captan, quintozene, thiran e benomyl (WAINWRIGHT; PUGH, 1974). Porém a germinação dos conídios é inibida por fatores micostáticos presentes no solo (DIX, 1972). A ação dos agrotóxicos sobre os entomopatógenos pode variar em função da espécie e linhagem do patógeno, da natureza química dos produtos e das dosagens utilizadas (ALVES, 1998). Esses produtos podem causar inibição do crescimento vegetativo, da conidiogênese ou esporulação, além da viabilidade, patogenicidade e virulência do conídio (CAVALCANTI et al., 2002).

Portanto, a eficiência e a adaptabilidade de *P. lilacinus* no controle de nematóides em diferentes condições climáticas e ambientais do solo, ainda necessitam ser exploradas.

2.2.4 Potencial de Biocontrole de *P. lilacinus*

A existência de patógenos obrigatórios como fungos na presença dos cistos e ovos de nematóides fitoparasitas é conhecida há mais de cinquenta anos (KORAB, 1929; RADEMACHER; SCHMIDT, 1933; ROZYSPAL, 1934; VAN DER LAAN, 1956). Como

agente de controle biológico de fitonematóides, *P. lilacinus* ganhou evidência nos últimos anos em campos infestados por *M. incognita* na Malásia, Panamá, Peru, Filipinas, Porto Rico, Estados Unidos e outros países (CANDANEDO et al., 1983).

Na Califórnia, Stirling e Mankau (1978; 1979) descreveram o fungo *P. lilacinus* como sendo *Dactylella oviparasitica*, ativo e específico em parasitar massas de ovos de *Meloidogyne* spp.. Foi reportado pela primeira vez como parasita em 1976 por Jatala, quando observou a sua presença infectando fêmeas e ovos de *M. incognita* (KOFOID & WHITE, 1919) CHITWOOD, 1949, e *Globodera pallida* (STONE) BEHRENS, sobre raízes de batatas (*Solanum tuberosum* L.) no Peru, chegando a destruir 80 a 90% dos ovos da primeira geração, após 10 a 12 semanas de incubação (JATALA, 1986). Franco et al. (1981) estudaram em laboratório o biocontrole de *G. pallida* por *P. lilacinus* e observaram redução na eclosão de juvenis, a qual foi estimulada pela exposição a exsudatos radiculares de batata.

A amplitude de hospedeiros do fungo *P. lilacinus* é grande quando comparada à de outros fungos parasitas de ovos, pois frequentemente têm sido isolado de cistos de *Heterodera glycines* Ichinohe, 1952 em raízes de soja (GODOY et al., 1982), de ovos de *M. arenaria* (GODOY et al., 1983; MORGAN-JONES et al., 1984), de fêmeas de *M. javanica* e *M. incognita* (SOUZA; FERRARI, 1989) e do solo (CADIOLI et al., 2007). Estudos preliminares em condições de casa de vegetação indicam que *P. lilacinus* foram eficientes em reduzir infestações de *M. arenaria* em abóbora (*Curcubita maxima*, Duch). Foi registrada ainda a redução de 54% do número de galhas por grama de raiz em solos com aplicação de *P. lilacinus*, em comparação à testemunha, sendo que o fungo foi recuperado do solo ao qual havia sido adicionado, no final do experimento, indicando sua capacidade de colonização e sobrevivência (GODOY et al., 1983).

Danos causados por espécies de *Meloidogyne* em uma série de culturas foram reduzidos após tratamentos com 0,4 t de grãos de arroz colonizados/ha usados como substrato (JATALA et al., 1980; GODOY et al., 1983; LAY et al., 1982; NOE; SASSER, 1984) e em todos os casos o fungo foi efetivo na redução do número de galhas nas raízes.

No Brasil, os primeiros relatos foram feitos por Freire e Bridge (1985), os quais avaliaram o parasitismo de ovos, de fêmeas e de juvenis de *M. incognita* por *P. lilacinus* e *V. chlamydosporium*. Carneiro (1987) observou o efeito de filtrado de cultura de *P. lilacinus* na eclosão de juvenis de *M. arenaria*. Posteriormente, estudos mais detalhados foram realizados com *P. lilacinus* (CARNEIRO; CAYROL, 1991; CARNEIRO; GOMES, 1993; CARNEIRO; KULCZYNSKI, 1993). Silva et al. (1992) encontraram *P. lilacinus* parasitando ovos de *M. incognita* em amora, na região noroeste do Estado do Paraná.

Freitas et al. (1995), comparando 19 isolados de *P. lilacinus* de diferentes procedências quanto à patogenicidade com ovos de *M. javanica*, obtiveram 100% de parasitismo pelos isolados procedentes da Itália e do Peru e 70% pelo isolado originário da França. Já os isolados brasileiros tiveram variação de 2 a 69% de ovos parasitados. Posteriormente, Freitas et al. (1999) misturaram grãos de arroz colonizados por *P. lilacinus* ao substrato usado na produção de mudas de tomateiro, visando a protegê-las contra o parasitismo de *M. javanica* e observaram que o fungo reduziu significativamente o número de galhas causadas pelo nematóide nas raízes das plantas, em condições de casa de vegetação.

De acordo com Alves e Campos (2003) o fungo *P. lilacinus* reduziu significativamente o número de ovos de *M. incognita* raça 3 em casa de vegetação, quando comparados aos demais ambientes. Além disso, o número de galhas causadas de *M. javanica* e *M. incognita* raça 3 foi menor em casa de vegetação em relação ao ambiente com solo aquecido, o que pode ser explicado pelo fato de a temperatura do solo entre 29 e 31 °C ser mais propícia à rápida eclosão de J₂ (KAUR; MAHAJAN, 1992), não permitindo que o fungo tivesse tempo de parasitar os nematóides.

Lara et al. (1996) demonstraram que *P. lilacinus* reduziu a população de *M. incognita* no solo e na raiz, e aumentou o rendimento dos frutos em tomateiros. Também para a mesma cultura, houve redução da infecção de *M. javanica* por consequência da aplicação deste fungo (SIDDIQUI; MAHMOOD, 1996).

Segundo Jonathan e Rajendran (2000) o fungo *P. lilacinus* apresenta potencial como agente de controle biológico do nematóide da galha *M. incognita* em banana. Este fungo também foi eficiente no controle de *Radopholus similis* (DEVRAJAN; RAJENDRAN, 2001).

Ribeiro et al. (1999) avaliaram a capacidade predatória de 59 isolados de *Monacrosporium* spp. contra *M. javanica* e *H. glycines*. Esses autores observaram que a predação de juvenis de *M. javanica* variou de 71 a 100% para 27 isolados, enquanto, para *H. glycines*, 26 isolados não exerceram qualquer predação. Os outros 33 isolados exibiram máxima predação de apenas 1,2% de juvenis desse nematóide.

Os resultados indicaram que o fungo *P. lilacinus* eficazmente controla a população de *M. incognita* por parasitar fêmeas, massas de ovos e ovos, afetando assim a multiplicação da geração posterior do nematóide em plantas de pimenta (AHMAD; KHAN, 2004). Relatos mostram que na presença da hifa fúngica a eclosão de juvenis é comprometida indicando um primário, difuso efeito tóxico tornando-os posteriormente vulneráveis à colonização (MORGAN-JONES et al., 1984).

Santiago et al. (2006) observaram que em 37 isolados de *P. lilacinus* de amostras oriundas de 19 municípios distribuídos nos Estados do MA, MS, MT, PA, PR, RS e SP contra *M. paranaensis* em tomateiro promoveram a redução da população de *M. paranaensis* nas raízes de tomateiro, quando comparados com a testemunha não tratada em casa de vegetação e apresentaram uma elevada taxa de sobrevivência no solo, características desejáveis para um agente de biocontrole. A alta incidência desta espécie nos solos brasileiros também foi observada por Tigano-Milani et al. (1993) ao encontrarem vinte e nove isolados de *P. lilacinus* em amostras de solo abrangendo um total de 22 municípios nos estados da BA, GO, MA, MG, MS, MT, RS, SP e TO.

Em um trabalho realizado por Costa e Campos (1997), foi observado que o fungo *P. lilacinus* infectou 45 a 55% dos ovos no interior de fêmeas de *Heterodera glycines* e em trabalho realizado por Coimbra et al. (1999), o fungo *P. lilacinus* foi isolado de fêmeas de *Meloidogyne* spp. e demonstrou alta capacidade de parasitismo em fêmeas de *M. javanica* “*in vitro*”.

Isolados de áreas de cafeeiro da região de Londrina - PR testados por Cadioli et al. (2009) reduziram a população de *M. paranaensis* em raízes de cafeeiro em casa de vegetação.

A seleção de isolados, quanto à patogenicidade, é importante na busca de microrganismos antagônicos e adaptados a diferentes regiões. Novaretti et al. (1986) na cultura de cana-de-açúcar, Hewlett et al. (1988) em tabaco e Carneiro e Cayrol (1991) em tomateiro, contestaram a eficiência desse fungo em condições de campo, provavelmente devido à inadequação dos métodos de aplicação e avaliação dos ensaios (KERRY, 1990); não adaptação do isolado a diferentes condições e tipos de solo (CARNEIRO, 1992); e inadequação dos métodos de produção de conídios do fungo (KERRY, 1990).

Nem todas as linhagens de *P. lilacinus* apresentam eficiência idêntica para controle. Dunn et al. (1982) observaram que uma linhagem proveniente do México, isolada juntamente com *Sclerotinia minor* Jagger, foi incapaz de colonizar ovos de *M. incognita*. Por outro lado, Rodriguez-Kábana et al. (1984) observaram que um isolado obtido de ovos de *M. arenaria* foi mais eficiente no controle desse nematóide quando comparado a outro obtido de um inseto no Equador e mais eficaz que uma linhagem isolada de *H. glycines*, este último, entretanto, mais freqüente no solo. Stirling e West (1991) observaram que isolados de *V. chlamydosporium* e de *P. lilacinus* diferiram quanto à virulência, e que essa situação é mais acentuada em *P. lilacinus*.

Mizobutsi et al. (2000) citaram que em ovos de *M. javanica* o fungo *P. lilacinus* apresentou 77% de parasitismo “*in vitro*”, mas a maioria dos isolados fúngicos testados mostrou-se pouco eficiente em parasitar ovos.

Dentro de uma espécie fúngica existem variações quanto à capacidade de colonizar os ovos de nematóides. Rodríguez-Kábana et al. (1984) e Stirling e West (1991) observaram que isolados de *V. chlamydosporium* GODDARD e de *P. lilacinus* apresentavam variabilidade na patogenicidade, sendo esta mais acentuada para *P. lilacinus*.

O biocontrole do nematóide de galha ainda não chega a ser um tratamento para ser aplicado sozinho (GIANNAKOU et al., 2004). Chama-se cada vez mais para uma gestão de um sistema de abordagem integrada com o uso de agentes de controle biológico em conjunto com práticas culturais adequadas como, resistência da planta hospedeira, plantas antagônicas e quando necessário, uso criterioso de nematicidas químicos para reduzir populações de nematóides de tal ordem que fiquem abaixo do limiar de dano econômico (GOWEN et al., 1998; BOURNE; KERRY, 1999; DESAEGER; RAO, 2000).

Jatala et al. (1980, 1981) observaram o controle de *M. incognita* pelo fungo em batata em condições de campo, junto com a adição de matéria orgânica (10 ton/ha), tratadas com diversos nematicidas (50 kg/ha de Namacur 5G; 5 kg/ha de Furadan 5G; 2,5 kg/ha de Temik 10G), juntamente com *P. lilacinus*, onde 86% das massas de ovos se apresentaram infectadas, com destruição de 50% dos ovos e redução significativa no índice de galhas quando comparado aos demais tratamentos. Este foi o primeiro relato da aplicação bem sucedida de *P. lilacinus* no biocontrole em condições de campo.

Comparando o efeito do controle químico de nematóides com a utilização de carbofuran (40 g/planta) e o controle biológico com a utilização do fungo *P. lilacinus*, Devrajan e Rajendran (2001) verificaram que o controle químico efetivo foi obtido 150 dias após a aplicação (129 nematóides/5g de raiz). Nesse estágio a efetividade de *P. lilacinus* (30 g/kg de solo aos 60 dias após o plantio) foi comparável ao carbofuran 143 nematóides/ 5 g de raiz.

A aplicação combinada de micoinseticidas e agrotóxicos pode ser uma associação positiva, visto que o fungo e o nematicida químico podem atuar sinergicamente permitindo o uso de concentrações menores de agrotóxicos e a redução na possibilidade de evolução de resistência das pragas (BOMAN, 1980). As combinações podem ser vantajosas em alguns casos, como quando a ação isolada do microrganismo não é totalmente satisfatória (BENZ, 1971). A interação entre agrotóxicos e entomopatógenos deve ser considerada antes da recomendação do agente químico e representa uma importante ferramenta nos programas

de MIP (BATISTA FILHO et al., 2001). Vários autores vêm realizando trabalhos sobre a compatibilidade de agrotóxicos e entomopatógenos em laboratório (CAVALCANTI et al., 2002; LOUREIRO et al., 2002; TAMAI et al., 2002; BATISTA FILHO et al., 2003; DURAN et al., 2004; CINTRA, 2004; ER; GÖKÇE, 2004).

Gaspard e Mankau (1985) trataram com *P. lilacinus* e *Veticillium chlamydosporium* parcelas cultivadas com tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill. Cv. Tropic) altamente infestadas com *M. javanica*. Observaram que após o tratamento, a população de ovos foi reduzida em cerca de 80% com aplicação simultânea dos dois fungos.

A habilidade de *P. lilacinus* de controlar nematóides aumentou quando foi integrada com a matéria orgânica. Supõe-se que a decomposição da matéria orgânica tem princípio(s) nematicida(s) e a matéria orgânica residual aumenta a atividade e persistência do fungo (ALAM et al., 1979; KERRY, 1984). Estes resultados estão em conformidade com os resultados encontrados por Reddy et al. (1991), Rao e Reddy (1994) e Khan e Saxena (1997), os quais relataram o manejo de nematóides com *P. lilacinus* em conjunto com matéria orgânica.

Estas observações sugerem a existência de diferentes biótipos de *P. lilacinus*, seja quanto à amplitude e estabilidade no solo, bem como quanto à sua capacidade para o controle de espécies de *Meloidogyne* e, indica ainda a sua importância na escolha de isolados para a determinação da eficiência relativa de uma linhagem.

Cannayane e Sivakumar (2001) revisaram a eficácia do biocontrole de *P. lilacinus* e discutiram trabalhos de investigação em que os nematóides formadores de galhas foram controlados com sucesso. No entanto, a eficácia do biocontrole em casa de vegetação e em condições de campo muitas vezes foi inconsistente (KERRY; EVANS, 1996). No passado, *P. lilacinus* foi aplicado no solo através de vários materiais orgânicos, como bagaços, resíduos de folhas, farelo de trigo e sementes de grama como portador (SIDDIQUI; MAHMOOD, 1996; CANNAYANE; SIVAKUMAR, 2001). No entanto, os efeitos foram pouco reproduzíveis, porque as diferenças nos substratos usados para a produção dos propágulos fúngicos podem afetar significativamente a eficácia no biocontrole (JENKINS et al., 1998). Em adição, as quantidades de produtos necessários para conseguir controle suficiente variaram entre várias centenas de quilos e 1-3 toneladas de volumoso por hectare (GOMES CARNEIRO; CAYROL, 1991; SIDDIQUI; MAHMOOD, 1996). Avanços recentes na tecnologia de produção e formulação de fungos filamentosos permitiram a preparação altamente concentrada do agente de biocontrole com custo efetivo de utilização em larga escala a campo apresentado resultados consistentes (KIEWNICK, 2001, 2004)

Nas Filipinas o produto comercial chamado “BIOCON” cujo princípio ativo é o fungo *P. lilacinus*, vem sendo empregado em larga escala para controle do nematóide de galhas e também no controle de *Radopholus similis* Cobb, 1913. Segundo Davide (1988), essa forma de controle proporcionou aumentos na produtividade de batata, tomate, quiabo e abacaxi entre 40 e 80%. Esse mesmo autor cita, ainda, que a eficácia no controle por este fungo foi superior à dos nematicidas Nema-cur (fenamifos), Triumph (isazofós) e Furadan (carbofuran). Kiewnick e Sikora (2003 e 2004) e Sikora e Fernandez (2005) citaram que *P. lilacinus* isolado 251, o qual é um produto registrado como nematicida biológico pela Environment Protection Agency como Melocon[®] (EPA, 2005), reduziu significativamente os danos de *Meloidogyne* spp. em tomate quando aplicado como tratamento de pré-plantio no solo. Da mesma forma, Schenk (2004) demonstrou o potencial no controle de nematóides de galhas quando o isolado 251 foi aplicado em pré-plantio em combinação com a aplicação no substrato das mudas e uma segunda aplicação 6 semanas após o plantio em tomate e pepino e notou um aumento a produção de frutos em condições de campo.

No entanto, para que um agente de controle biológico seja efetivo, precisa apresentar alta virulência, rápida colonização do solo, persistência, baixo custo e facilidade de produção, aplicação e armazenamento (JATALA, 1986). Segundo Gomes e Carneiro (1997), a formulação peletizada com *P. lilacinus* foi mais estável do que grãos de arroz colonizados e suspensão de conídios de *P. lilacinus*.

Para que seja efetivo e também tenha a confiança dos produtores em aplicar este fungo no solo por suas propriedades para controle de nematóides, mais estudos precisam ser feitos. A influência dos conídios do fungo *P. lilacinus* em aplicação massal no solo e as respostas nos organismos bioindicadores da qualidade do solo precisa ser estudada.

2.3 ECOTOXICOLOGIA

A situação ideal em que todos os testes adequados possam ser efetuados antes que os produtos químicos sejam aplicados no ambiente é praticamente impossível. O campo da ecotoxicologia estuda os efeitos dos produtos químicos nos organismos (WALKER et al., 2001). Um compromisso tem sido alcançado por meio de espécies representativas, chamados bioindicadores, que são usadas como ferramentas de seleção com o alvo nas substâncias tóxicas. Na prática, os bioindicadores são utilizados como um "termômetro" para

deduzir rapidamente sobre as condições atuais e futuras do meio ambiente, sem a necessidade de grandes investimentos e consumo de tempo como ocorre em protocolos de monitoramento ambiental baseados puramente em análises físico-químicas.

A exploração agropecuária depende de várias práticas, muitas das quais podem causar perturbações no agroecossistema e também limitar a sustentabilidade do agronegócio ao longo dos anos, como por exemplo, o desmatamento, queimada, uso excessivo de pesticidas, os quais modificam as comunidades de invertebrados que vivem no solo, com efeitos sobre a composição de espécies e abundância de indivíduos, podendo levar à perda da biodiversidade e a distúrbios no ecossistema, ou também ocasionar efeitos positivos e desejáveis ao meio ambiente, a exemplo de práticas conservacionistas como o plantio direto, a policultura e o manejo integrado de pragas e doenças. Assim, o uso de bioindicadores pode auxiliar na definição das práticas ou tecnologias que devem ser recomendadas aos produtores para que se possa caminhar na direção da sustentabilidade da produção agropecuária e da preservação do meio ambiente.

2.3.1 Testes Ecotoxicológicos

Com a crescente demanda de tecnologias e produtos ecologicamente corretos, têm sido desenvolvidas várias estratégias de medição da qualidade ambiental e da sustentabilidade da exploração agropecuária. Por cerca de 20 anos, testes ecotoxicológicos padronizados do solo têm sido realizados. Na maioria destes métodos, usam-se invertebrados em solo artificial como substrato para os testes (OECD, 1984). O bioindicador pode ser indicadores ambientais que respondem às perturbações ou mudanças ambientais; indicadores ecológicos que demonstram efeitos das mudanças ambientais como alterações de habitats, fragmentação, mudanças climáticas, poluição e outros fatores que geram impacto na biota; e por último indicadores de biodiversidade, que refletem índices de diversidade (MCGEOCH, 1998). As substâncias de interesse são adicionadas e avaliadas nestes substratos em várias concentrações e seus efeitos aos organismos (minhocas, enquitreídeos, colêmbolos e ácaros predadores) são medidos.

Atualmente, com o crescente interesse por práticas conservacionistas, muita ênfase tem sido dada ao estudo da estrutura da comunidade invertebrada do solo, objetivando

identificar as opções de manejo que possam otimizar suas atividades para o funcionamento do ecossistema (BRUSSAARD et al., 1997; MERCANTE et al., 2008).

A mesofauna edáfica é composta basicamente por ácaros (Acari) e colêmbolos (Collembola), além de coleópteros, alguns grupos de miriápodes, aracnídeos, diversas outras ordens de insetos, alguns oligoquetos e crustáceos. Os mais numerosos são os Oribatei (Acari: Cryptostigmata) e os Collembola (Insecta), sendo que, juntos, eles constituem de 72% a 97%, em números de indivíduos da fauna total de artrópodes do solo (SINGH; PILLAI, 1975). Contudo, um número muito grande de organismos interage com o solo: as plantas, a microbiota (bactérias, actinobactérias, fungos, protozoários, algas) e a fauna do solo (nematóides, moluscos, anelídeos: minhocas e enquitreídeos; e artrópodes: crustáceos, miriápodes, ácaros, insetos como colêmbolos, coleópteros, formigas e cupins, entre outros) (MIKLÓS, 1998).

2.3.2 Microcosmos

Confrontado com o ecossistema do solo e suas complexas interações das comunidades de espécies e seus processos biológicos, químicos e físicos associados, simplificados sistemas de laboratório foram construídos por pesquisadores do solo para preencher uma lacuna com a complicada situação do campo. Coletivamente, estes sistemas de laboratório são chamados de “microcosmos” e apesar das discussões sobre a confiabilidade desses sistemas (TAYLOR; PARKINSON, 1988), houve poucas tentativas de se chegar a alguma padronização (VAN STRAALLEN; VAN GESTEL, 1993). No entanto, pode-se perguntar se é possível, ou até mesmo desejável, lutar por uma metodologia de microcosmo universal. A concepção da unidade experimental depende muito de quais os componentes de um ecossistema se quer estudar, como os componentes estruturais ou funcionais.

O desequilíbrio do habitat é conhecido por afetar muitas comunidades e processos nas populações como a dispersão, predação, dinâmica populacional, estabilidade e regulação das populações, evolução, diversidade das espécies, extinção e organização da cadeia alimentar (HUFFAKER, 1958; MENGE; SUTHERLAND, 1976; HORNE; SCHNEIDER, 1995) e por aumentar a biodiversidade (SIMBERLOFF; WILSON, 1969; LEVIN, 1977; LEVINS, 1979). Estudos recentes da heterogeneidade e desequilíbrios têm aumentado consideravelmente o entendimento do assunto, mas as conexões entre

heterogeneidade e função do ecossistema são ainda mal entendidas.

Quando vários materiais orgânicos são misturados, é esperado reduzir a diversidade da fauna do ambiente porque um ambiente mais homogêneo é criado, mas aumenta a taxa de decomposição porque diferentes substratos, alguns ricos em energia e outros ricos e nutrientes particulares, entram em contato uns com os outros (SEASTEDT, 1984). O papel da fauna do solo pode ser mais importante em um ambiente desigual, já que uma comunidade mais diversificada poderia utilizar os recursos mais eficazmente do que uma comunidade menos diversificada. Isso ocorre com suas habilidades de se mover em diferentes nichos, os animais também podem coletar sua energia e nutrientes de micro-habitats separadamente, “fertilizar” materiais pobres em nutrientes com seus excrementos e transportar propágulos microbianos em substratos frescos (LUSSENHOP, 1992).

Dutilleul e Legendre (1993) e Li e Reynolds (1995) concluíram que apesar de várias dificuldades metodológicas, é tempo de expandir a pesquisa e modelar a heterogeneidade da população e níveis de comunidade para melhor compreender o funcionamento dos ecossistemas.

2.4 ORGANISMOS BIOINDICADORES DE QUALIDADE DO SOLO

As minhocas (*Eisenia* sp.), os enquitreídeos (*Enchytraeus* sp.), e os colêmbolos (*Folsomia* sp.) têm sido os grupos mais utilizados em testes ecotoxicológicos pela facilidade de manter a cultura em laboratório e pelo tempo de geração curto em temperatura ambiente (ACHAZI et al., 1997; RONDAY; HOUX, 1996). Estes organismos desempenham funções relevantes para o funcionamento dos ecossistemas como fragmentadores de matéria orgânica e/ou dispersores de microrganismos, são muito sensíveis e respondem rapidamente às mudanças ambientais. Além disso, deve-se ressaltar a facilidade de coleta e mensuração das informações, as quais consistem em respostas integradas da qualidade do meio ambiente.

Vários trabalhos têm destacado a hipótese de que a diversidade e abundância da macrofauna invertebrada do solo, assim como a presença de determinados grupos em um sistema, podem ser usados como indicadores da qualidade dos solos (STORK; EGGLETON, 1992; CHAUSSOD, 1996; MUYS; GRANVAL, 1997; SOCARRAS, 1998; TAPIA-CORAL et al., 1999; PAOLETTI, 1999; BARROS et al., 2002), pois são muito sensíveis às modificações do manejo do solo (LAVELLE et al., 1992). Estudos recentes têm

demonstrado a sua importância na recuperação de áreas degradadas (TAPIA-CORAL et al., 1999; BARROS et al., 2002; BARROS et al., 2004).

2.4.1 *Folsomia Candida* (WILLEM, 1902)

Os colêmbolos são os insetos terrestres mais numerosos e extensamente distribuídos. A densidade populacional chega geralmente a $10^5/m^2$ em camadas superficiais do solo. Apesar de seu tamanho pequeno (adultos: 0,5 a 5 mm de comprimento) e baixa contribuição para a biomassa e a respiração totais, têm um papel muito importante como reguladores de processos da decomposição através da predação da microfauna (JÄNSCH et al., 2005). Podem também contribuir na decomposição da matéria orgânica nos solos ácidos, onde as minhocas e os diplópodes estão ausentes (WILES; KROGH, 1998).

São microartrópodes bem estudados do solo (CROMMENTUIJN, 1994; SMITH, 1997). A espécie usada regularmente em investigações ecotoxicológicas é a *Folsomia candida* (PHILLIPS et al., 2002), mas diversas outras espécies foram testadas, como *Hypogastrura assimilis* (FOLKER-HANSEN ET al., 1996), *Isotoma viridis* ou *Orchesella cincta*. Os métodos aperfeiçoados foram publicados para *Isotoma tigrina* (KISS; BAKONYI, 1992) e *Folsomia fimetaria* (LØKKE, 1995; WILES; KROGH, 1998). Achazi et al. (2000) descreveram testes de toxicidade com o uso de *Folsomia candida* no solo.

A diversidade de colêmbolos tem sido usada como bioindicador de intervenções antrópicas, bem como da qualidade do solo (SAUTTER; SANTOS, 1991; CULIK et al., 2002; CHAUVAT et al., 2003; PONGE et al., 2003; CUTZ-POOL et al., 2007).

2.4.1.1 Biologia de *Folsomia candida*

Os colêmbolos são pequenos artrópodes, ápteros, encontrados em todo o mundo (BELLINGER et al., 2007). Estão entre os invertebrados mais abundantes no solo, podendo sobreviver na matéria orgânica em decomposição, árvores, litoral e na água doce (BELLINGER et al., 2007). Embora estudos com diversidade de colêmbolos no solo tenham aumentado muito no Brasil e no mundo nas últimas décadas (SAUTTER; SANTOS, 1991;

SAUTTER et al., 1998; CULIK; ZEPPELINI FILHO, 2003; PONGE et al., 2003; SOUSA et al., 2004; ZEPPELINI FILHO; BELLINI, 2004; CUTZ-POOL et al., 2007), considerando o crescente interesse na compreensão dos processos ecológicos dos quais esses organismos participam nos ecossistemas, observam-se diversas limitações, tais como a falta de taxonomistas disponíveis e de métodos adequados para capturar tais organismos (ZEPPELINI FILHO; BELLINI, 2004).

F. candida Willem 1902 (Collembola: Isotomidae) é um organismo cego, sem pigmento e se reproduz partenogenicamente. Quando alcançam 20 dias de idade (a 20 °C no laboratório), os indivíduos têm aproximadamente 2 milímetros de comprimento e são sexualmente maduros. Possui uma furca aperfeiçoada (órgão de impulso) e um movimento de corrida ativo. Geralmente, a espécie é classificada como microsaprófago, mas pode igualmente se alimentar de nematóide (HOPKIN, 1997). A sua população é mais abundante em locais ricos em matéria orgânica (WILES; KROGH, 1998).

2.4.1.2 Uso de *F. candida* na ecotoxicologia

F. candida é amplamente usada em estudos ecotoxicológicos (ISO, 1999a) e seu tempo de geração relativamente curto e a reprodução partenogênica fazem esses animais apropriados para estudar indivíduos diferentes e parâmetros de populações em um experimento único (CROMMENTUIJN et al., 1993).

Os efeitos dos produtos químicos em *F. candida* não foram revistos em detalhe recentemente, mas uma vista geral é dada por Hopkin (1997). Thompson e Gore (1972) investigaram o efeito de 29 inseticidas em *F. candida*. Os efeitos de vários pesticidas (CROMMENTUIJN et al., 1995; WILES; FRAMPTON, 1996) ou metais (LOCK; JANSSEN, 2002; SMIT; VAN GESTEL, 1998; VAN GESTEL; VAN DIEPEN, 1997; VIJVER et al., 2001) foram bem examinados. Além disso, a influência de condições ambientais como a seca (HOLMSTRUP, 1997) foi investigada.

2.4.1.3 Influência de fatores ambientais em *F. candida*

Sandifer e Hopkin (1996) testaram *F. candida* em solos artificiais com o pH variando de 6,0 (valor requerido pelo teste ISO), 5,0 e 4,5 e embora não se tenha observado uma relação clara entre a sobrevivência dos adultos ou a produção de juvenis e o pH do solo, houve uma diminuição da reprodução sob pH 5,0 e 4,5 em comparação com o pH 6,0. Em comparação similar com uma escala mais ampla de valores de pH, Greenslade e Vaughan (2003) encontraram solos com valores de pH entre 5.4 e 6.6 como sendo ótimos para a produção de juvenis. Em valores de pH mais baixos (abaixo a 3.5), o número de juvenis diminuiu aproximadamente 50% e quando em valores de pH mais elevados (7.7 e 8.0) houve uma grande diminuição, chegando a zero. Em seguida, testando diferentes temperaturas, os resultados sugerem que seja possível conduzir o teste em temperaturas entre 10 e 20 °C. Entretanto, a duração do teste tem que ser ajustada à temperatura. Durações de 12, 8, e 4 semanas são recomendadas para temperaturas de 10, 15, e 20 °C, respectivamente (WILES; KROGH 1998). Estas recomendações foram confirmadas por estudos feitos por Sandifer e Hopkin (1997) em que três temperaturas diferentes foram testadas, 15, 20, e 25 °C, sendo que em 25 °C a produção juvenil foi muito baixa, a 15 °C a duração do teste foi aumentada para 6 semanas e observou-se que o nível de produção de juvenil foi mais baixo do que a 20 °C. Também, os valores EC50 sugerem que em 15 °C, a reprodução de *F. candida* foi geralmente mais sensível a todos os quatro metais (Cd, Cu, Pb, Zn) do que em 20 °C. Em 1973, Snider e Butcher indicaram que a temperatura de 26 °C se aproxima possivelmente o limite de tolerância superior da *F. candida*. Alguns trabalhos (HUTSON, 1978; MARSHALL; KEVAN, 1962; SNIDER; BUTCHER, 1973) indicam vantagens, tais como, a fecundidade e a longevidade aumentadas que ocorrem na temperatura de 15 °C, porém, não é recomendado que o teste seja executado nesta temperatura relativamente baixa e também, os resultados ganhos nesta temperatura não diferem significativamente daqueles a 20 °C, mas um aumento do período experimental em 2 semanas é exigido (SANDIFER; HOPKIN,1997).

Em um estudo desenvolvido por Martikainen e Rantalainen (1999), *F. candida* foi exposta ao dimetoato a 13, 16, e 19 °C. A temperatura de incubação influenciou o crescimento e a reprodução dos colêmbolos, mas não a sobrevivência dos adultos. A temperatura reduzida afetou positivamente o crescimento dos adultos (os adultos cresceram mais rapidamente em mais baixas temperaturas) e negativamente na reprodução (os adultos atrasaram sua reprodução em temperaturas mais baixas) o que sugere uma redistribuição de

recursos de energia ao crescimento. Os resultados da reprodução e da toxicidade após 2 semanas a 19 °C foram diretamente comparáveis aos resultados após 4 semanas a 13 °C, permitindo comparações dos resultados dos testes de toxicidade conduzidos em temperaturas diferentes dentro destes limites. No teste padrão, 20 °C ± 2 é a temperatura de exposição (ISO 1999a).

Os colêmbolos podem excretar substâncias tóxicas de seus corpos pela muda e por renovação do intestino, principalmente em altas temperaturas (JOOSSE; BUKER, 1979). Parece que *F. candida* pode compensar o aumento da atividade e aumentar o contato com um produto químico aumentando a excreção. Em baixas temperaturas, a muda e a renovação do intestino é lenta. Assim, os efeitos de um produto químico demoram mais tempo para serem percebidos em baixas temperaturas por causa da baixa atividade dos animais (MARTIKAINEN; RANTALAINEN, 1999).

Baseando-se na literatura (BURSELL, 1970; EDNEY, 1977), não faz sentido testar solos muito secos por causa da susceptibilidade dos insetos à seca. Nas normas ISO, o índice de umidade deve ser 40 a 60% da capacidade máxima de retenção de água. Van Gestel e Van Diepen (1997) estudaram o efeito de diferentes índices de umidade do solo (25, 35, 45, e 55% da massa seca, correspondendo a 28, a 40, a 51, e a 63% de capacidade máxima de retenção de água) na toxicidade do cádmio à *F. candida*. Nenhuma grande influência na nos colêmbolos pela toxicidade do cádmio ocorreu. Os pesos dos corpos nos controles não foram afetados pelo índice de umidade do solo. No que diz respeito à reprodução, aparentemente os colêmbolos produziram mais ovos nos índices de mais baixa umidade, que emergiram mais tarde do que a níveis de umidade elevada. Em um experimento de reprodução executado com *F. candida* sob uma ampla escala de propriedades do solo usando solos naturais (AMORIM et al., 2005c), houve relação negativa significativa entre números juvenis e capacidade máxima de retenção de água.

É assumido que na natureza, *F. candida* se alimenta de fungos (KLIRONOMOS et al., 1992), embora este organismo também se alimenta de nematóides (LEE; WIDDEN, 1996). Também sabe-se que os animais alimentados de pólen foram menos produtivos do que aqueles alimentados com fermento (SMIT et al., 1998; STAM et al., 1996). De acordo com a diretriz ISO para *Folsomia candida*, o alimento *Saccharomyces cerevisiae* é adicionado em pequenas quantidades (2 mg) no início do teste e depois de 14 dias.

A influência das propriedades do solo na mortalidade e na reprodução de *F. candida* raramente foram investigadas. Entretanto, estes valores-limite foram estudados recentemente em 11 solos naturais (mais o solo artificial do OECD e o solo LUFA 2.2 padrão

como controles), cobrindo uma larga escala de propriedades do solo (AMORIM et al., 2005c). Com a exceção de uma correlação negativa entre a sobrevivência de adultos e o valor de capacidade de troca catiônica, o colêmbolo foi minimamente influenciado pelas propriedades do solo na sobrevivência e a reprodução.

Esta observação foi confirmada por resultados de outro estudo atualmente feito na Alemanha. O número médio de juvenis produzidos pelos adultos variou de 500 a 1000 por recipiente do teste (10 adultos por recipiente do teste colocados inicialmente), assim o critério da validação de 100 juvenis por recipiente do teste com solo artificial não tratado para a reprodução dos colêmbolos (ISO 1999a) foi excedido em todos os solos testados (RÖMBKE et al., 2005).

2.4.2 *Enchytraeus crypticus* (WESTHEIDE; GRAEFE, 1992)

Os enquitreídeos pertencem, como os lumbricídeos, à classe dos Clitellata, ordem dos Oligochaeta e assim ao filo dos Annelida. Entre os anelidas, são os parentes mais próximos das minhocas (ERSÉUS; KÄLLERSJÖ, 2004). Atualmente, há cerca de 950 espécies descritas no mundo. Na Europa Central em 1959, 112 espécies e 16 gêneros tinham sido descritos (NIELSEN; CHRISTENSEN, 1959). Novas espécies ainda estão sendo descobertas, e entre 200 e 300 espécies são esperadas só para a Europa Central (RÖMBKE et al., 1997) com cerca de 50 a 100 espécies classificadas como comum (DIDDEN et al., 1997). Esses animais foram ignorados na biologia do solo até o fim dos anos 50. Assim, sua taxonomia bem como muitos aspectos da sua biologia se tornaram objetos de estudo somente nos anos mais recentes.

Os enquitreídeos pertencem à mesofauna saprofítica da camada decompositora superficial do solo. Através da alimentação dos enquitreídeos, o solo assume uma estrutura de grânulos com estabilidade mais elevada do que a maioria dos demais agregados. Acredita-se que o complexo argila-húmus também emerge do processo de digestão, mas isto requer mais pesquisas para o esclarecimento (DIDDEN, 1993; ZACHARIAE, 1965).

Algumas espécies como *Cognettia sphagnetorum* em florestas de coníferas ácidas da Europa Central e Norte, são peças-chave no processo como a decomposição da matéria orgânica e o ciclo de nutrientes (LAAKSO; SETÄLÄ, 1999). Devido a sua elevada

biomassa e ausência de lumbricídeos nestes locais, eles são considerados os engenheiros do ecossistema (LAVELLE et al., 1997).

As comunidades da macrofauna invertebrada, na qual se encontram os enquitreídeos, desempenham papel-chave nos processos de ciclagem de nutrientes e na estrutura do solo (BLANCHART et al., 1992). Estes organismos, além da fragmentação do material orgânico, regulam a população microbiana responsável pelos processos de mineralização e humificação, influenciando na ciclagem de matéria orgânica e na liberação de nutrientes assimiláveis para as plantas (HUHTA et al., 1991; BEARE et al., 1994; WARDLE; LAVELLE, 1997). Podem ser também vetores de microrganismos simbióticos das plantas, como fixadores de nitrogênio e fungos micorrízicos, bem como digerem de maneira seletiva, microrganismos patógenos (BROWN, 1995).

Os enquitreídeos habitam uma variedade de substratos (solos, sedimentos, restos orgânicos) e foram sugeridos como objeto modelo para o teste orgânico químico (RÖMBKE, 1991; WESTHEIDE; BETHGE-BEILFUSS, 1991, RÖMBKE et al., 1998).

As atividades desses organismos consistem na escavação e/ou ingestão e transporte de material mineral e orgânico no solo, levando à criação de estruturas biogênicas (galerias, ninhos, câmaras e bolotas fecais), que influenciam na agregação, propriedades hidráulicas, dinâmica da matéria orgânica e na composição, abundância e diversidade de outros organismos do solo (LAVELLE; SPAIN, 2001).

Os enquitreídeos são abundantes em diferentes solos, com 1 a 30 espécies diferentes por local no mundo inteiro. Nos ecossistemas terrestres da Europa Central, sua abundância anual média está entre 20.000 e 60.000 indivíduos/m² (PETERSEN; LUXTON, 1982), podendo variar de alguns milhares até 100.000 indivíduos /m². Fora das regiões temperadas a abundância média de enquitreídeos varia amplamente. Nos solos árticos, particularmente solos ácidos, a abundância dos enquitreídeos é da mesma magnitude (MACLEAN et al., 1977). Contudo, em solos tropicais, a abundância é considerada menor (menos de 10.000 indivíduos/m² (RÖMBKE; MELLER, 1999).

Enquitreídeos são geralmente hermafroditas anfimíticos obrigatórios, mas algumas espécies são de reprodução por partenogênese ou fertilização própria. Outra estratégia de reprodução é a fragmentação, onde um indivíduo se separa em diversas partes e cada parte se regenera em um indivíduo completo. Contudo, a maioria das espécies se reproduz sexualmente, por meio da produção de ovos e espermatozóide, fertilização cruzada e deposição de casulos (JÄNSCH et al., 2005)

São consumidores de material orgânico morto e microbiologicamente colonizado (O'CONNOR, 1967; BROCKMEYER, et al., 1990; DIDDEN, 1993), mas um número de trabalhos reporta que alguns enquitreídeos se alimentam de fungos (DASH; CRAGG, 1972; STANDEN; LATTE, 1977; DASH et al., 1980; HEDLUND; AUGUSTSSON, 1995) e de bactérias (KRIŠTŮFEK et al., 1995). Enquanto as minhocas, que também são Oligochaetas, consomem fungos colonizadores de tecidos das plantas (MOODY et al., 1995) e fazem supressão de certos fungos indutores de apodrecimento de raiz (STEPHENS; DAVOREN, 1996), o efeito dos enquitreídeos em fungos agentes de controle biológico ou patógenos de plantas não tem sido estudados.

Jaffe et al. (1997) suspeitaram que *Enchytraeus crypticus* Westheide & Graefe 1992 afetou diretamente o fungo, e concluíram que os enquitreídeos podem interferir no controle biológico de nematóides fitoparasitas. Também verificaram que o número de *E. crypticus* aumentou rapidamente quando foram adicionados os peletes com hifas fúngicas ao solo, indicando que os enquitreídeos não somente ingeriram como também digeriram o fungo.

McInnis e Jaffee (1989) mencionaram que como são relativamente grandes e se movem, os enquitreídeos podem danificar mecanicamente fungos. Assim, provavelmente removeram os conídios de *Hirsutella rhossiliensis* das filíades, reduzindo a adesão dos conídios nos nematóides. Também há a discussão de que podem reduzir os nematóides nas raízes (O'CONNOR, 1967). *Enchytraeus crypticus* não reduziu o número de nematóides no trabalho de Jaffee et al. (1997), ao contrário, houve algumas indicações de aumento da penetração dos nematóides nas raízes quando um número pequeno de enquitreídeos foi adicionado. Se este efeito é real, pode ser devido ao fato de que os enquitreídeos alteram a porosidade do solo (DIDDEN, 1990), o que aumenta o movimento do nematóide. Igualmente com número de nematóides, as raízes foram atrofiadas quando enquitreídeos interferiram no controle biológico dos nematóides formadores de galhas.

Uma vista geral da ecologia dos enquitreídeos terrestres é dada por Didden (1993). No presente há ainda pouco conhecimento das preferências ecológicas de uma única espécie de enquitreídeos a respeito de certas propriedades do solo. Contudo, esforços para identificar os requerimentos ecológicos de algumas espécies de enquitreídeos da Europa Central têm sido feitos por investigadores (GRAEFE; SCHMELZ, 1999; HEALY, 1980) e avaliados os dados disponíveis na literatura (JÄNSCH; RÖMBKE, 2003). Destas investigações, o gênero *Enchytraeus* (com exceção de *E. norvegicus*) pode ser considerado geralmente neutrofilico com baixa tolerância a condições ácidas. Dados da literatura são

também disponíveis para *E. albidus* e *E. crypticus*, desde que estas espécies são usadas frequentemente em testes ecotoxicológicos (RÖMBKE, 2003).

2.4.2.1 Biologia de *E. crypticus*

A origem de *Enchytraeus crypticus* é desconhecida, desde que a sua descrição é baseada em indivíduos de um adubo feito de uma planta alemã (RÖMBKE, 2003). *E. crypticus* tem tamanho médio de cerca de 7 mm (WESTHEIDE; MÜLLER, 1996). Se reproduz muito rapidamente tendo um tempo de geração menor que 20 dias em 20 ± 2 °C (ACHAZI et al., 1999). Em 21 °C em placas de ágar, *E. crypticus* tem uma média de desenvolvimento embriológico de 9,1 dias. A média do tempo da deposição até a maturidade é de 8,3 dias e a média do tempo total de vida é de 85 dias. A produção de casulos é de 0,62 por dia e a média de número de ovos por casulo é de 7,6 com uma escala de 1 a 35. Assim, o número médio de ovos produzidos por dia é de 4,6 (WESTHEIDE; GRAEFE, 1992). No solo artificial padrão LUFA 2.2, Achazi (1997) reportou a taxa de reprodução de 104 indivíduos por quatro semanas. O desenvolvimento de *E. crypticus* é claramente mais rápido em comparação com *E. albidus*, particularmente em altas temperaturas (DIRVEN-VAN BREEMEN et al., 1994; ISO, 2003a).

2.4.2.2 Uso de *E. crypticus* na ecotoxicologia

Apesar do seu papel importante em muitos ecossistemas, os enchytraídeos foram negligenciados como organismos testes até cerca de 15 anos atrás (RÖMBKE, 2003). Em cima da descoberta de sua sensibilidade ao estresse antropogênico, testes de reprodução a campo e em laboratório que avaliam os efeitos de produtos químicos na qualidade do solo utilizando solo artificial, foram desenvolvidos usando *E. albidus* (RÖMBKE; MOSER 1999, 2002). Este teste foi realizado internacionalmente e está sendo padronizado atualmente por ASTM (2004), ISO (2003a), e OECD (2003). Nos termos de projeto, este teste é similar ao

teste de reprodução de minhoca e de colêmbolo (ISO 1998, 1999a) que foram desenvolvidos ao mesmo tempo.

Durante a fase de padronização o teste de reprodução de enquitreídeos foi modificado com sucesso quanto ao tamanho dos recipientes do teste, quantidade de substrato, alimento e critério de validação para avaliação da qualidade do solo (Juvonen et al., 2000). Nota-se que o mesmo teste pode ser executado com diversas espécies do gênero *Enchytraeus*, tal como *E. luxuriosus* (COLLADO et al., 1999). Mais notável é a pequena espécie *E. crypticus*, a qual devido ao seu rápido desenvolvimento tem se tornado a espécie de escolha dos testes em anos recentes (ACHAZI et al., 1997; HUND-RINKE et al., 2002a, KUPERMAN et al., 2003b). Também, um teste de comportamento está sendo desenvolvido atualmente com a finalidade de seleção usando *E. crypticus* (ACHAZI et al., 1999) ou *E. albidus* (AMORIM et al., 2005a) e um teste de bioacumulação usando *E. albidus* e *E. luxuriosus* (BRUNS et al., 2001).

2.4.2.3 Influência dos fatores ambientais em *E. crypticus*

E. crypticus evita somente os solos fortemente ácidos (pH abaixo de 4.0). Números elevados de juvenis foram encontrados em valores de pH de 4.8 a 6.5, mas a situação ótima está provavelmente entre 5.9 e 6.5. Números inferiores foram encontrados nos solos com valores de pH menores de 4.8 e abaixo de 4.0 quase nenhum foi encontrado. Alguns valores de pH mais elevados do solo (7.7) tiveram somente efeitos rápidos (ACHAZI et al., 1996; ACHAZI, 1997). Brüggel (1994) relatou um pH ótimo do solo para *E. crypticus* de 6.0. Graefe e Schmelz (1999) caracterizam o *E. albidus* e *E. crypticus* como indicadores de ligeiras condições de acidez e ligeiras condições alcalinas, por nunca serem encontrados em solos fortemente ácidos. Nos testes do ISO 2003a é usado um pH de 6.0 ± 0.5 .

Tem preferência por temperatura entre 25 a 30 °C. Achazi et al., (1997) cultivaram o *E. crypticus* em 20 a 23 °C e Brüggel (1994) encontrou aumento da população do *E. crypticus* em temperaturas entre 15 e 21 °C. Este aumento foi atribuído a um desenvolvimento mais rápido do embrião e do juvenil. O número de casulos e de ovos por casulo pareceu não ser afetado dentro desta escala da temperatura. *E. crypticus* são testados geralmente a 20 ± 2 °C (ISO 2003a).

E. crypticus preferem menos umidade do solo que *E. albidus* (35 a 55% de massa seca comparada com 55 a 65%). Contudo, ambas espécies se reproduzem no solo com alta umidade como 90%. Nos testes padrões, 40 a 60% de capacidade de retenção máxima de água são requeridas (EC, 2004). Com o solo natural, uma umidade de 60% da capacidade de retenção máxima de água é geralmente suficiente para *E. albidus*, enquanto *E. crypticus* parece não ter problemas com níveis mais elevados. Por exemplo, nos testes de toxicidade com *E. crypticus* um solo arenoso com capacidade de retenção máxima de água de 18% Kuperman et al., (2003b; 2004) usaram com sucesso uma umidade de 100% de capacidade de retenção máxima de água. Em 15% de umidade, ambas as espécies falharam na reprodução (DIRVEN-VAN BREEMEN et al., 1994).

No solo artificial a correlação entre o número de juvenis produzidos e o índice de matéria orgânica (pelo menos entre 5 e 20%) é fraca (DIRVEN-VAN BREEMEN et al., 1994). No solo de LUFA 2.2, com um índice de matéria orgânica de 4.64%, números elevados de juvenis aparecem. Com solos naturais não contaminados, a reprodução é inibida quando o índice da matéria orgânica está abaixo de 3% (AMORIM et al., 2005b).

Contudo, se o solo tem alto índice de areia, baixo índice de matéria orgânica e um pH relativamente baixo (4,8 a 5,6) ou, no caso, alto pH (7,4), a taxa de reprodução de *E. albidus* é baixa. Este efeito foi também observado no caso do solo da LUFA 2.1 e 2.3 (RÖMBKE, 1991). Culturas de laboratório de *E. albidus* e *E. crypticus* são geralmente mantidas em solo artificial, LUFA 2.2 solo padrão, ou solo de jardim (ou uma mistura destes solos), porém, as espécies tardias podem também ser mantidas com sucesso em ágar (ACHAZI et al. 1997; 1999; BRÜGGL 1994; RÖMBKE 1991). Em alguns casos, o baixo índice de matéria orgânica de 0,3% não afetou negativamente *E. crypticus* (ACHAZI et al. 1997).

E. crypticus em culturas de laboratório são alimentados geralmente de grãos de aveia triturados (ACHAZI et al., 1997; BRÜGGL 1994; ISO 2003a). Brüggel (1994) encontrou uma correlação entre a quantidade de alimento e as densidades de população de *E. crypticus*. No ambiente sabe-se que o enquitreídeo *Enchytraeus crypticus* destruiu colônias das hifas peletizadas dos fungos nematófagos e reduziu o controle biológico de nematóides formadores de galhas *M. javanica*. Também reduziu a densidade da população do fungo formador de armadilha *Monacrosporium gephyropagum*, *Arthrobotrys thaumasia* e *A. haptotyla* pela ingestão e consumo do fungo (JAFFE et al., 1997).

Os dados da literatura confirmam que *E. crypticus* foi usados primeiramente em ensaios químicos únicos com solo artificial ou solo padrão LUFA 2.2. Entretanto, foram

usados igualmente com sucesso para a avaliação da qualidade do solo. Devido às suas exigências ecológicas, o substrato apropriado para os enquitreídeos é relativamente úmido, arenoso, ligeiramente ácido e índice de matéria orgânica de mais de 3%. *Enchytraeus crypticus* se adapta a maiores amplitudes do que o *E. albidus* nos termos do índice da matéria orgânica ou da temperatura. Entretanto, há solos com combinações destes fatores que não são apropriados para *E. crypticus*. Outras espécies de testes que habitam tipicamente solos com baixos valores de pH (abaixo de 4.5) são necessárias. Estudos adicionais são necessários para definir melhor a escala preferida de propriedades do solo para as espécies de enquitreídeos (JÄNSCH et al., 2005).

3. ARTIGO A: EFEITO DE FORMULAÇÕES DE *Paecilomyces lilacinus* NO MANEJO DA POPULAÇÃO DE *Meloidogyne paranaensis* EM MUDAS DE CAFEIEIRO.

3.1 Resumo

Nematóides do gênero *Meloidogyne* (Goeldi, 1887) são responsáveis por grande parte da perda na produção agrícola cafeeira. *Paecilomyces lilacinus* (Thom., 1910) Samson, 1974 é um fungo efetivo no biocontrole de espécies de *Meloidogyne*. O estudo de isolados (UELpae 18, UELpae 22, UELpae Mix) de *P. lilacinus* em duas formulações (pó molhável e suspensão concentrada) foi desenvolvido para viabilizar a aplicação deste produto biológico em áreas de produção cafeeira que são atacadas pelos nematóides. O experimento foi desenvolvido em casa de vegetação com o delineamento experimental de blocos casualizados contendo 9 tratamentos (UELpae 18 pó molhável e suspensão concentrada, UELpae 22 pó molhável e suspensão concentrada, UELpae Mix pó molhável e suspensão concentrada, Nemaplus[®], testemunha inoculada e testemunha não inoculada) cada um com 10 repetições em mudas de cafeeiro (*Coffea arabica* L. cv Iapar 59). Foi transplantada uma muda de por saco de polietileno contendo substrato de solo e areia autoclavado (1:2). O inóculo de *M. paranaensis* foi multiplicado em tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Santa Cruz); foi feita a extração dos ovos e foram inoculados 5.000 ovos por planta. Passados 5 dias foram aplicados 2 gramas ou mL diluídos em 10 mL de água destilada de cada produto por planta. Após 60 dias foram avaliadas características de desenvolvimento das plantas e efeito dos isolados e suas formulações sobre o nematóide. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e ao teste de Tukey a 5%. O fungo apresentou resultado variável nas características de desenvolvimento das plantas, e as duas formulações não afetaram diâmetro, massa fresca da parte aérea e raízes do cafeeiro. Os tratamentos UELpae 22, UELpae Mix suspensão concentrada, UELpae 18 pó molhável e suspensão concentrada e o bionemático presente no mercado Nemaplus[®] reduziram o número de ovos nas raízes apresentando-se como um agente de biocontrole potencial sobre nematóides formadores de galhas.

Termos para indexação: *Coffea arábica*. Nematóide-de-galha. Controle biológico. Fungo endoparasita.

Abstract

Nematodes of the genus *Meloidogyne* (Goeldi, 1887) are responsible for much of the loss in agricultural production of coffee. *Paecilomyces lilacinus* (Thom., 1910) Samson, 1974 is a fungal effective in biocontrol of *Meloidogyne* spp. The study of *P. lilacinus* isolates (UELpae 18, UELpae 22, UELpae Mix) in two formulations (wettable powder or concentrated suspension) was developed so that it can enable the application of this biological product in coffee plantation areas that are attacked by nematodes. In this work the experiment was conducted in a greenhouse with a randomized design with 9 treatments (UELpae 18 wettable powder and concentrated suspension, UELpae 22 wettable powder and concentrated suspension, UELpae Mix wettable powder and concentrated suspension, Nemaplus[®], inoculated control and noninoculated control) each one with 10 repetitions in coffee seedlings (*Coffea arabica* L. cv Iapar 59). It was transplanted coffee seedlings per polyethylene bag with a mixture of autoclaved soil and sand (1:2). The inoculum of *M. paranaensis* was multiplied in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Santa Cruz); it was made the extraction of eggs and 5.000 eggs were inoculated per plant. After 5 days it was applied 2 g or

mL diluted in 10 mL of distilled water for each product per plant. After 60 days the characteristics of plant development were evaluated, as well as the effect of isolated and their formulations on the nematode. The data were subjected to analysis of variance and Tukey test at 5%. The fungus showed a variable result for the characteristics of plant development both the two formulations did not affect on diameter, fresh weight of shoots and roots of coffee. On the contrary the treatments UELpae 22, UELpae Mix formulated concentrated suspension, UELpae 18 in wettable powder and concentrated suspension formulation, and the bionematicida Nemaplus® reduced the number of eggs in the roots posing as a potencial biocontrol agent of root-knot nematodes.

Index terms: *Coffea arabica*. Root-knot nematode. Biological control. Endoparasites fungus.

3.2 Introdução

Desde as observações de Jobert sobre nematóides de galha do cafeeiro (*Meloidogyne* spp.) na então Província do Rio de Janeiro, em fins do século XIX, nenhuma outra praga ou doença foi tão devastadora para essa cultura no Brasil (LORDELLO, 1984; SANTOS, 1997). Conforme Lordello (1976, citado por GONÇALVES et al., 2004) a redução da produção brasileira de café é estimada em cerca de 20%, e desse total, as espécies de *Meloidogyne* são responsáveis por 75%. Com efeito, atribui-se aos nematóides-de-galha, a substituição da cafeicultura pela cana-de-açúcar no Rio de Janeiro, em fins do século XIX e início do século seguinte (GOELDI, 1892, citado por KRZYZANOWSKI, 2006). Como freqüentemente não exibem sintomas claros, o efeito econômico decorrente de sua presença tende a ser subestimado pelos produtores, chegando a ter perdas na agricultura mundial estimadas em US\$ 80 bilhões/ano (AGRIOS, 1997).

O controle de nematóides é vital para a exploração agrícola comercial, o que pode ser feito com o uso de nematicidas químicos (CAMPOS et al., 1990; CAMPOS, 1997), porém, estes nematicidas podem contaminar águas subterrâneas, intoxicar aplicadores ou deixar resíduos em alimentos. Nesse contexto, o controle biológico vem sendo considerado uma das alternativas dentro de uma abordagem integrada, no qual se busca assegurar o desenvolvimento sustentável da agricultura. O uso de inimigos naturais é um campo de pesquisa promissor (STIRLING, 1991) podendo atuar reduzindo populações de fitonematóides para limiares abaixo do nível de dano econômico (DUNCAN, 1991).

Uma possível alternativa consiste no emprego de fungos, uma vez que vários desses microrganismos produzem metabólitos tóxicos aos nematóides (MANKAU, 1979). Tais substâncias podem afetar a motilidade (COSTA, 2000), capacidade de penetração na planta, atração do juvenil pelo hospedeiro, eclosão ou causar a morte desses fitoparasitas (KERRY et al., 1984), podendo atuar como moléculas nematostáticas ou nematicidas

(SAIFULLAH, 1996; HALLMAN; SIKORA, 1996). Resultados de estudos que demonstram o potencial desses fungos têm sido publicados por diferentes pesquisadores (DAVIDE, 1968; KHAN; HUSAIN, 1988; KO et al., 1995, SANTIAGO et al., 2006, KRZYZANOWSKI, 2006; CADIOLI et al., 2007, 2009).

Paecilomyces lilacinus (Thom.) Samson 1974 é um fungo do solo que tem se mostrado efetivo no biocontrole de espécies do gênero *Meloidogyne* (KERRY, 1990). É um deuteromiceto da ordem Moniliales distribuído por todo o mundo, com maior frequência em regiões quentes (CARNEIRO, 1986). Caracteriza-se por penetrar nos ovos dos nematóides, destruindo o embrião, podendo exercer forte pressão na capacidade reprodutiva das fêmeas que são colonizadas e posteriormente mortas (DUNN et al., 1982). No Brasil, existem registros de *P. lilacinus* em diferentes tipos de solo, cultivados ou não, em profundidades variáveis de 0 - 40 cm ou mais (CARNEIRO, 1986). Frequentemente tem sido isolado a partir de diferentes hospedeiros ou de substratos provenientes de várias localidades (FARIA; TIGANO, 1996; SOSA-GOMEZ, 2002).

Nas Filipinas, na década de 1980, a maior parte dos estudos sobre o controle biológico de nematóides teve o enfoque no uso de *P. lilacinus*, pois, um isolado desse fungo que apresentou maior eficácia na colonização de ovos de nematóides (Phil. Strain No. 1) passou a ser produzido em massa e comercializado com a marca BIOCON pela empresa Asiatic Technologies Inc. de Manila (DAVIDE et al., 1990). Segundo Jatala (1986), os resultados da aplicação de *P. lilacinus* no campo, em algumas Fazendas no Peru, evidenciaram a eficácia desse fungo no controle de *M. incognita* em diferentes culturas e de *Tylenchulus semipenetrans* em citros. Al-Hazmi et al. (1993) também avaliaram a eficiência de um produto à base de mistura de fungos predadores, produzido com a marca comercial Nemout, na formulação de pó molhável, produzido por uma indústria americana, e confirmaram que o produto reduziu o número de galhas e de ovos de *M. javanica*, na planta hospedeira, sob condições de casa de vegetação. Um isolado patenteado de *P. lilacinus* tem sido usado pela empresa Australian Technological Innovation Corporation Pty Ltda. como o princípio ativo do nematicida biológico Paecil[®] e esse produto tem sido testado em vários países e em diferentes culturas (FERRAZ et al., 2001).

Outro exemplo é o isolado 251 (PL251) que atualmente é comercializado e registrado para a venda como Bioact[®] WG para controle de nematóides em vários países (KIEWNICK, 2004; ATKINS et al., 2005). Além disso, PL251 recebeu recentemente o registro na Environmental Protection Agency dos Estados Unidos como nematicida biológico com o nome comercial Melocon[®] WG (EPA, 2005). Os resultados preliminares obtidos com a

formulação de grânulos dispersíveis em água de PL251 (Bioact[®] WG) demonstraram o potencial de controle biológico de *M. incognita* em plantas de tomate, *Heterodera schachtii* em beterraba, bem como o nematóide *Radopholus similis* em banana, quando testado em condições de temperatura favorável para o biocontrole pelo fungo (KIEWNICK; SIKORA, 2004; KIEWNICK et al., 2004a, b).

Embora no Brasil vários pesquisadores também relataram o potencial desses fungos no biocontrole de *Meloidogyne* spp. em diferentes culturas (NAVES; CAMPOS, 1991; DALLA PRIA et al., 1991; CAMPOS, 1992; CARNEIRO; GOMES, 1993; RIBEIRO; CAMPOS, 1993; DIAS; FERRAZ, 1994; COSTA; CAMPOS, 1997; FREITAS et al., 1999; MIZOBUTSI et al., 2000; SANTIAGO et al., 2006), informações básicas sobre o comportamento de *P. lilacinus* como parasita de nematóides de galhas são necessárias para que seu emprego na agricultura seja recomendado.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a patogenicidade de isolados de *P. lilacinus* sobre ovos de *M. paranaensis* nas formulações pó molhável e suspensão concentrada, visando obter mais informações para a aplicação deste produto biológico em áreas de produção cafeeira altamente infestadas com *Meloidogyne paranaensis* e proporcionar uma maior confiabilidade do produtor para usar o produto em questão.

3.3 Material e Métodos

O delineamento experimental utilizado neste trabalho foi em blocos casualizados contendo 9 tratamentos (Pae 18 pó molhável, Pae 18 suspensão concentrada; Pae 22 pó molhável, Pae 22 suspensão concentrada, Mix Pae pó molhável, Mix Pae suspensão concentrada, Nemaplus[®]; Testemunha inoculada com *M. paranaensis* e testemunha sem a inoculação de *M. paranaensis*) e em 10 repetições.

Os isolados de *P. lilacinus* avaliados pertencem à coleção de microrganismos do Laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual de Londrina, os quais foram obtidos em áreas de cultivo de cafeeiro na região de Londrina - PR. Estes foram previamente selecionados quanto à capacidade de parasitar ovos de *M. paranaensis* “*in vitro*”, em diferentes temperaturas (CADIOLI et al., 2007). Foram multiplicados em grãos de arroz pela empresa Ballagro Agro Tecnologia a qual formulou os tratamentos com os isolados na concentração de 10⁸ esporos por grama (pó molhável-PM) ou mililitro (suspensão concentrada-SC). A formulação em pó molhável contém conídios do fungo *P. lilacinus* UELPae 18 + partículas de arroz finamente moídas e a formulação em suspensão concentrada contém conídios do fungo *P. lilacinus* UELPae 18 + estabilizantes não liberados para a

divulgação pela empresa + água. O Nemaplus® também é um produto formulado pela empresa Ballagro Agro Tecnologia e é um bio-controlador, elaborado a partir de várias seleções de bactérias específicas, chamadas de Rizobacterias, que atuam no manejo preventivo de nematóides e estas bactérias produzem uma série de compostos (metabólitos) que são tóxicos aos fitonematóides.

Foi transplantada uma muda de café 'Iapar 59', considerada suscetível para *M. paranaensis*, com dois meses de idade por saco de plástico de 3 L contendo como substrato solo e areia autoclavada na proporção de 1:2.

O inóculo de *M. paranaensis* foi multiplicado em plantas de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* L.) 'Santa Cruz', a partir das quais foi feita a extração dos ovos, segundo a metodologia de Boneti e Ferraz (1981), a suspensão foi ajustada para concentração média de 1.000 ovos e eventuais juvenis por mL; foram feitos três orifícios com 2 cm de profundidade ao redor do colo das mudas de cafeeiro e foram inoculados 5.000 ovos e eventuais juvenis do segundo estágio (J_2) por planta.

Decorridos cinco dias da inoculação do nematóide foram aplicados 2 gramas (do produto na formulação pó molhável) ou 2 mL (do produto na formulação suspensão concentrada) de cada produto diluídos em 10 mL de água destilada autoclavada por planta.

Após 60 dias foram avaliados a altura das plantas; diâmetro de caule; massas da parte aérea e sistema radicular, massas de ovos por sistema radicular, por meio da imersão em solução de floxina B 0,015%, durante 15 minutos, para coloração das mesmas; número de fêmeas que penetraram nas raízes, segundo a metodologia de Bird et al. (1983); extração dos ovos (BONETI; FERRAZ, 1981); e número de juvenis no solo ao final do experimento segundo Jenkins (1964).

As práticas de adubação, irrigação e tratos culturais foram efetuadas de acordo com as recomendações para produção de mudas de cafeeiro. Os dados obtidos aos 60 dias após a aplicação dos tratamentos para características de desenvolvimento das plantas de cafeeiro foram submetidos à análise de variância e ao teste de Duncan a 5% de probabilidade. Os resultados obtidos do efeito do fungo *P. lilacinus* sobre o nematóide *M. paranaensis* foram submetidos às análises de variância e os dados foram transformados em $\sqrt{x + k}$, $k=10$ e após foram submetidos ao teste de Duncan a 5% de probabilidade. Para isto foi utilizado o programa estatístico SASM-Agri (CANTERI et al., 2001).

3.4 Resultados e Discussão

Pode ser observado que para a característica de desenvolvimento das plantas de cafeeiro os resultados foram variáveis (Tabela 1). Para altura da parte aérea o tratamento UELpae 22 na formulação em pó molhável apresentou maior altura, diferindo significativamente do tratamento UELpae 22 suspensão concentrada que apresentou menor altura da parte aérea; este resultado pode indicar que a formulação pode ter influenciado no crescimento da planta, pois, segundo Ferraz e Monteiro (1995), o tamanho desigual de plantas, a murcha nas horas mais quentes do dia, as folhas e frutos de menor tamanho, o nanismo e, conseqüentemente, a redução de produção são sintomas típicos do ataque dos nematóides. Segundo estes mesmos autores, no caso dos nematóides formadores de galhas, em função do comprometimento do sistema radicular pela formação de células gigantes, hiperplasia e hipertrofia (sintomas histológicos) de células, pode haver uma exibição exagerada de deficiências nutricionais que se refletem na parte aérea levando a planta a um declínio vagaroso.

Para a variável diâmetro do caule não houve diferença estatística entre os tratamentos e entre as formulações. No entanto, para a característica massa da parte aérea os tratamentos Testemunha inoculada, UELpae 18 suspensão concentrada e Nemaplus[®] mostraram maior peso da parte aérea, porém, estes tratamentos apenas diferiram estatisticamente do tratamento UELpae 22 suspensão concentrada, o qual além de apresentar menor peso de parte aérea também apresentou menor altura da parte aérea. Este resultado corrobora os resultados observados por Arruda (1960), o qual cita que em plantas infestadas com espécies do gênero *Meloidogyne*, o crescimento, a translocação de água e nutrientes e a produção do cafeeiro são seriamente comprometidos. Para a variável massa da raiz, o tratamento UELpae 18 na formulação suspensão concentrada apresentou o maior massa da raiz, o qual diferiu significativamente apenas do tratamento UELpae Mix na formulação suspensão concentrada.

Estas variações encontradas para as características de desenvolvimento das plantas também foram constatadas em trabalhos desenvolvidos por Santiago et al (2006) e Cadioli et al (2009). Segundo Hutangura et al. (1999), o aumento de massa de raízes infectadas por nematóides seria conseqüência do efeito combinado da emissão de novas raízes secundárias nos locais de infecção do nematóide e da formação de galhas, mas isto não justificaria os resultados obtidos para o tratamento UELpae Mix suspensão concentrada, pois possuiu mais ovos e eventuais juvenis e não apresentou maior peso de raiz (Tabela 1 e 2).

Tabela 1 – Efeito de isolados e formulações de *Paecilomyces lilacinus* sobre o desenvolvimento das plantas de cafeeiro inoculadas com *Meloidogyne paranaensis*.

Tratamentos	Altura (cm)		Diâmetro do Caule (cm)		Peso (g)			
					Parte aérea		Raízes	
UELpae 18 PM	35,84	Bc ¹	0,47	a	13,79	ab	15,00	ab
UELpae 18 SC	38,37	ab	0,52	a	16,15	a	16,87	a
UELpae 22 PM	39,76	A	0,52	a	12,43	ab	15,22	ab
UELpae 22 SC	35,08	C	0,48	a	9,59	b	14,30	ab
UELpae Mix PM	37,67	abc	0,49	a	13,51	ab	13,56	ab
UELpae Mix SC	37,57	abc	0,52	a	14,02	ab	11,29	b
Nemaplus	36,00	bc	0,52	a	14,57	a	16,30	ab
Testemunha Inoculada	37,43	abc	0,48	a	14,66	a	13,88	ab
Testemunha não inoculada	37,98	abc	0,53	a	11,93	ab	11,95	ab
CV (%)	7,84		16,62		34,16		37,01	

¹ Médias seguidas de letras iguais nas colunas, não diferem entre si, pelo teste de Duncan em nível de 5% de significância de erro.

O tratamento UELpae 22 suspensão concentrada foi o único tratamento que não apresentou ovos e juvenis (J₂) no solo, porém este tratamento apenas diferiu estatisticamente da testemunha inoculada (Tabela 2). Para a variável número de ovos e eventuais juvenis (J₂) nas raízes, os tratamentos UELpae 22 suspensão concentrada, UELpae Mix suspensão concentrada e UELpae 18 pó molhável mostraram maior potencial de biocontrole de *M. paranaensis*, obtendo os menores valores de ovos e eventuais juvenis (J₂) nas raízes, porém não diferiram estatisticamente dos tratamentos com UELpae 18 na formulação de suspensão concentrada e do bionematicida presente no mercado Nemaplus[®]. Resultados semelhantes foram verificados por Cabanillas et al. (1989a) e Freitas et al. (1999), trabalhando com as espécies *Meloidogyne incognita* e *M. javanica* em tomateiros tratados com diferentes isolados de *P. lilacinus*. Porém, a testemunha inoculada com *M. paranaensis* também não obteve grande multiplicação da população de nematóides; isto pode ter ocorrido por fatores climáticos, pois a temperatura pode influenciar na embriogênese (VRAIN; BARKER, 1978), eclosão (BARKER et al., 1969), mobilidade e penetração (JATALA; RUSSELL, 1972), desenvolvimento pós-infectivo (DAVIDE; TRIANTAPHYLLOU, 1967), reprodução (NARDACCI; BARKER, 1979) e a sobrevivência (BERGESON, 1959) dos nematóides ou pela perda da agressividade do *M. paranaensis* por ser mantido muito tempo

apenas em plantas de tomateiro. Contudo, o tratamento UELpae Mix em pó não demonstrou controle do nematóide de galhas *M. paranaensis*.

Tabela 2 – Efeito de isolados e formulações de *Paecilomyces lilacinus* na população de ovos e juvenis de segundo estágio (J₂) de *Meloidogyne paranaensis* no solo e raízes em mudas de cafeeiro.

Tratamentos	Nº de J ₂ /250 cc de solo		Nº de Ovos e J ₂ nas raízes		Penetração J ₂ nas raízes	
UELpae 18 PM	40	ab ¹	744	d	2,65	A
UELpae 18 SC	20	b	872	cd	1,05	De
UELpae 22 PM	20	b	1762	bc	2,25	Ab
UELpae 22 SC	0	b	692	d	1,3	Cde
UELpae Mix PM	60	ab	2842	a	1,8	Bc
UELpae Mix SC	40	ab	390	d	2,25	Ab
Nemaplus	20	b	916	cd	1,4	Bcd
Testemunha Inoculada	140	a	2200	ab	0,5	Ef
Testemunha não inoculada	0	b	0	e	0	F
CV (%)	61,13		57,64		57,92	

¹ Médias seguidas de letras iguais nas colunas foram transformadas em $\sqrt{x + k}$, $k=10$ não diferem entre si, pelo teste de Duncan em nível de 5% de significância de erro.

Com relação ao efeito dos isolados de *P. lilacinus* sobre a penetração de J₂ de *M. paranaensis* nas raízes, foi observado que os isolados não reduziram a penetração de juvenis nas raízes, pois o menor valor foi apresentado pela testemunha inoculada. Isto pode ter ocorrido pelo fato dos tratamentos com os isolados terem sido aplicados 5 dias após a inoculação do nematóide e conseqüentemente este já ter penetrado nas raízes após este tempo. Segundo Moritz (2007), após 2 dias da inoculação de *M. paranaensis* em soja foi observada penetração nas raízes, já ao decorrer de 4 dias da inoculação do nematóide houve penetração massiva de J₂. No entanto segundo Kerry (1990), o fungo *P. lilacinus* atua como parasita de ovos e Dunn et al. (1982) cita que este fungo se caracteriza por atacar as massas de ovos e exerce forte pressão na capacidade reprodutiva, antes do início do ciclo reprodutivo do nematóide. Tal fato pode explicar a ineficiência dos tratamentos em não diminuir a penetração de juvenis do segundo estágio (J₂) nas raízes de cafeeiro. Holland et al. (1999) provaram que ovos em todos os estágios, incluindo aqueles que contém juvenis não eclodidos, foram

infectados por um isolado de *P. lilacinus*. Assim, o fungo primeiramente coloniza ovos mas não juvenis, os quais podem penetrar e se desenvolver dentro do tecido da raiz (JATALA, 1986).

Por conseguinte, os relatos de resultados bem sucedidos de controle de nematóides com fungos nematófagos são mais freqüentes em culturas de ciclo curto (SANTOS, 2000; SOARES et al., 2005a; SOARES et al., 2005b). Nesses casos, os fungos que atacam juvenis por formação de armadilhas ou por hifas adesivas são aplicados no solo antes do plantio ou, no máximo, com essa operação, o que aumenta a chance de captura destes antes que estes penetrem nas raízes. Porém, como o fungo em estudo é endoparasita de ovos de nematóides, os resultados precisam ser observados por mais de um ciclo de vida do nematóide. Portanto, mais estudos precisam ser feitos utilizando estes isolados para que se possa viabilizar a aplicação de *P. lilacinus* em áreas infestadas com *M. paranaensis*.

3.5 Conclusões

Os isolados de *Paecilomyces lilacinus*, tanto na formulação pó molhável quanto na formulação suspensão concentrada, reduzem a população de *Meloidogyne paranaensis*, principalmente os isolados Pae 18 na formulação pó molhável e Mix Pae e o isolado Pae 22 na formulação suspensão concentrada.

3.6 Agradecimentos

À pesquisadora doutora Alaíde Aparecida Krzyzanowski do Instituto Agrônômico do Paraná por ceder gentilmente as mudas de cafeeiro para este experimento. Este trabalho foi financiado pela Embrapa Café.

3.7 Referências Bibliográficas

AL-HAZMI, A. S.; IBRAHIM, A. A. M.; ABDUL-RAZIG, A. T. Evaluation of a nematode-encapsulating fungi complex for control of *Meloidogyne javanica* on potato. **Pakistan Journal Nematology**, v.11 p.139-149.1993.

AGRIOS, G. N. Plant diseases caused by nematodes. In: GEORGE, N. AGRIOS, F.N. (Ed.). **Plant Pathology**. 4th ed. San Diego: Academic Press, p.565-597. 1997.

ARRUDA, H. V. de. Redução no crescimento de cafeeiro com um ano de campo, devido ao parasitismo de nematóides. **Bragantia**, Campinas, v.19, p.179-182, 1960.

- ATKINS, S. D.; CLARK, I. M.; PANDE, S.; HIRSCH, P. R.; KERRY, B. R. The use of real-time PCR and species-specific primers for the identification and monitoring of *Paecilomyces lilacinus*. *FEMS Microbiology Ecology*. v. 51, p.257-264. 2005.
- BARKER, K. R.; NUSBAUM, C. J.; NELSON, L. A. Seasonal population dynamics of selected plant-parasitic nematodes as measured by three extraction procedures. *Journal of Nematology*. v.1 p.232, 1969.
- BERGESON, G. B. The influence of temperature on the survival of some species of genus *Meloidogyne*, in the absence of a host. *Nematologica*. v.4 p.344, 1959.
- BONETTI, J. I. S.; FERRAZ, S. Modificação do método de Hussey & Barker para a extração de ovos de *Meloidogyne exigua* em cafeeiro. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, DF, v.6, p. 553, 1981 .
- BYRD, D. W. J. R.; KIRKPATRICK, J.; BARKER, K. R. An improved technique for clearing and staining plant tissues for detection of nematodes. *Journal of Nematology*. v.15 p.131-147. 1983.
- CABANILLAS, E.; BARRER, K. R.; NELSON, L. A. Growth of isolates of *Paecilomyces lilacinus* on their efficacy in biocontrol of *Meloidogyne incognita* on tomato. *Journal of Nematology*, Lakeland, v.21, n.2, p.164-172, 1989a.
- CADIOLI, M. C.; SANTIAGO, D. C.; HOSHINO, A. D.; HOMECHIN, M. Crescimento micelial e parasitismo de *Paecilomyces lilacinus* sobre ovos de *Meloidogyne paranaensis* em diferentes temperaturas “*in vitro*”. *Ciência agrotecnologia*, Lavras, v. 31, n. 2, p. 305-311, mar./abr., 2007.
- CADIOLI, M. C.; SANTIAGO, D. C.; OLIVEIRA, A. D.; PAES, V. DOS S.; ARIEIRA, G.O.; BAIDA, F. C. Efeito de isolados de *Paecilomyces lilacinus* no desenvolvimento de cafezais e na população de *Meloidogyne paranaensis*. *Ciência e agrotecnologia*, Lavras, v. 33, n. 3, p. 713-720, maio/jun., 2009.
- CAMPOS, V. P. **Controle de doenças: Doenças causadas por nematóides** In: Vale, F.X.R.; Zambolim, L. (Eds.). Controle de Doenças de Plantas. Volume 1. Viçosa. UFV. 1997. pp. 141- 179.
- CAMPOS, V. P.; SIVAPALAN, P.; GNANAPRAGASAM, N. C. **Nematode parasites of coffee, cocoa and tea.** In: Luc, M., Sikora, R.A.; Bridge, J. (Eds.). Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture. Wallingford. CABI Publishing, CAB International. 1990. pp.387-430.
- CAMPOS, V. P. Perspectivas do controle biológico de fitonematóides. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, v.16, n.172, p.26-30, 1992.
- CANTERI, M. G.; ALTHAUS, R. A.; VIRGENS FILHO, J. S.; GIGLIOTI, E. A.; GODOY, C. V. SASM - Agri : Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scoft - Knott, Tukey e Duncan. *Revista Brasileira de Agrocomputação*, v.1, n.2, p.18-24. 2001.

CARNEIRO, R. M. D. G. **Etude des Possibilités D'utilisation du Champignon Nematophage *Paecilomyces lilacinus* (Thom.) Samson, 1974, Comme Agent de Lutte Biologique contre *Meloidogyne arenaria* (Neal, 1889), Chitwood, 1949.** (Tese de Doutorado). 119p. Academie de Montpellier. Universite des Sciences et Techniques du Languedoc. France. 1986.

CARNEIRO, R. M. D. G.; GOMES, C. B. Metodologia e teste de patogenicidade de *Paecilomyces lilacinus* e *P. fumosoroseus* em ovos de *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**. v.7, n.1, p. 66-75, 1993.

COSTA, S. B.; CAMPOS, V. P. Obtenção de Fêmeas de *Heterodera glycines* em hidroponia e testes de patogenicidade de fungos isolados de cistos a fêmeas de *H. glycines* e de *Meloidogyne* spp. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v.23, p.239-243, 1997.

COSTA, M. J. N. **Filtrados de culturas fúngicas e esterco animais, com ação antagonista a *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood** (Tese de Mestrado). Lavras: Universidade Federal de Lavras. 2000.

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

DAVIDE, R. G.; TRIANTAPHYLLOU, A. C. Influence of the environment on development and sex differentiation of root-knot nematodes. I. Effect of infection density, age of the host plant and soil temperature. **Nematologica**. v.13 p.102, 1967.

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

DAVIDE, R. G.; HAHN, S. K.; CAVENESS, F. E. **Biological control of nematodes using *Paecilomyces lilacinus* in the Philippines. Integrated pest management or tropical root and tuber crops.** In: The global status of and prospects for integrated pest management of root and tuber crops in the tropics. 1987, Ibadan, Nigeria. Proceedings... Ibadan: International Institute of Tropical Agriculture, 1990, p.156-163.

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

DUNCAN, L. W. Current options for nematode management. **Annual Review of Phytopathology**, v. 29, p.469-490, 1991.

DUNN, M. T.; SAYRE, M. R.; CARREL, A.; WERGIN, P. Colonization of nematode eggs by *Paecilomyces lilacinus* (Thom.) Samson as observed with scanning electron microscope. SEM/1982/III. **Scanning Electron Microscopy**, Inc., Chicago. pp. 1351-1357. 1982.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). *Paecilomyces lilacinus* strain 251; exemption from the requirement of a tolerance. **United States Federal Register** v.70 p.19278-19283. 2005.

- FARIA, M. R.; TIGANO, M. S. **Coleção de fungos entomopatogênicos do Cenargen.** (Eds.). Brasília: Embrapa, Serviço de Produção e Informação, 1996. 76p.
- FERRAZ, S.; DIAS, C. R.; FREITAS, L. G. de. **Controle de nematóides com práticas culturais.** In: ZAMBOLIM, L. Manejo integrado Fitossanidade: cultivo protegido, pivô central e plantio direto. Viçosa: UFV, 2001, p.1-53.
- FERRAZ, C. C. B.; MONTEIRO, A. R. Nematóides. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Eds.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos.** 3. ed. São Paulo: Agrônômica Ceres, 1995. v.1, p.168-201.
- FREITAS, L. G. ; FERRAZ, S.; ALMEIDA, A. M. S. . Controle de *Meloidogyne javanica* em tomateiro pela produção de mudas e substrato infestado com *Paecilomyces lilacinus*. **Nematologia Brasileira**, Brasília - DF, v. 23, n. 1, p. 65-73, 1999.
- GOELDI, E. A. Relatório sobre a moléstia do cafeeiro na Província do Rio de Janeiro. **Archivos do Museu Nacional**, Rio de Janeiro, v. 8, p. 7-123, 1892.
- GONÇALVES, W.; RAMIRO, D. A.; GALLO, P. B.; GIOMO, G. S. **Manejo de nematóides na cultura do cafeeiro.** In: Reunião itinerante de fitossanidade do Instituto Biológico – Café, 10., 2004, Mococa. Anais ... São Paulo: Instituto Biológico, p. 48-66. 2004.
- HALLMAN, J.; SIKORA, R. A. Toxicity of fungal endophyte secondary metabolites to plant parasitic nematodes and soilborne plant pathogenic fungi. **European Journal of Plant Pathology.** v.102 p.155-162. 1996.
- HOLLAND, R. J.; WILLIAMS, K. L.; KHAN, A. Infection of *Meloidogyne javanica* by *Paecilomyces lilacinus*. **Nematology.** v.1, p.131-139. 1999.
- HUTANGURA, P.; MATHESIUS, U.; JONES, M. G. K.; ROLFE B. G. Auxin induction is a trigger for root gall formation caused by root-knot nematodes in white clover and is associated with the activation of the flavonoid pathway. **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v.26, p.221-231, 1999.
- JATALA, P.; RUSSELL, C. C. Nature of sweet potato resistance to *Meloidogyne incognita* and the effects of temperature on parasitism. **Journal of Nematology.** v.4 p.1, 1972.
- JATALA, P. Biological control of plant-parasitic nematodes. **Annual Review of Phytopathology**, Stanford, v.24, n.1, p.453-489, 1986.
- JENKINS, W. R. **A rapid centrifugal – flotation technique for separating nematodes from soil.** Plant Disease Report, v. 48, 1964. p. 692.
- KHAN, T. A.; HUSAIN, S. I. Studies on the Efficacy of Seed Treatments with Pesticides, Oil-Cakes, Neem-Leaf and culture Filtrate of *Paecilomyces lilacinus* for the Control of Diseases Caused by presence of *Rotylenchulus reniformis*, *Meloidogyne incognita* and *Rhizoctonia solani* Either Individually or Concomitantly on Cowpea. **Indian Journal of Nematology**, Lawrence, v.2, n.1, p.192-198, 1988.

- KERRY, B. R.; SIMONN, A.; ROVIRA, A. D. Observations on the introductions of *Verticillium chlamydosporium* and other parasitic fungi into soil for control of the cereal cyst-nematode *Heterodera avenae*. **Annals of Applied Biology** v.105, p.509-516. 1984.
- KERRY, B. R. An assessment of progress toward microbial control of plant parasitic nematode. **Journal of Nematology**, v. 22, n.45, p.621-631, 1990. (Supplement).
- KIEWNICK, S. **Biological control of plant parasitic nematodes with *Paecilomyces lilacinus*, strain 251**. In: Sikora, R.A., Gowen, S., Hauschild, R.; Kiewnick, S. (Eds). Multitrophic interactions in soil. IOBC/wprs Bulletin. v.27, p.133-136. 2004.
- KIEWNICK, S., SIKORA, R. A., Optimizing the biological control of plant-parasitic nematodes with *Paecilomyces lilacinus* strain 251. **Phytopathology** v.94, p.S51. 2004.
- KIEWNICK, S.; MENDOZA, A.; SIKORA, R. A. Efficacy of *Paecilomyces lilacinus* strain 251 for biological control of the burrowing nematode *Radopholus similis*. **Journal of Nematology**. v.36, p.326-327. [Abstr.] 2004a.
- KIEWNICK, S.; SCHMITZ, A.; SIKORA, R. A. Biological control of the sugar beet cyst nematode *Heterodera schachtii* with *Paecilomyces lilacinus* strain 251. **Journal of Nematology**. v.36, p.327. [Abstr.] 2004b.
- KO, M. P.; BERNARD, E. C.; SCHMITT, D. P.; SIPES, B. S. Occurrence of pasteurialike organisms on selected plant-parasitic nematodes of pineapple in the hawaiian islands. **Journal of Nematology**, Lake Alfred, v.27, n.2, p.395-408, 1995.
- KRZYŻANOWSKI, A. A. **Controle biológico de nematóides de galha do cafeeiro com fungos nematófagos**. (Tese de Doutorado). Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” Junho de 2006. p. 60.
- LORDELLO, L. G. E. **Nematóides das Plantas Cultivadas**. 8. ed. São Paulo: Nobel, 1984. 314 p.
- MANKAU, R. Biocontrol: fungi as nematode control agents. **Journal of Nematology** v.12, p.1- 4. 1979.
- MIZOBUTSI, E. H.; FERRAZ, S.; RIBEIRO, R. C. F. Avaliação do parasitismo de diversos isolados fúngicos em ovos de *Heterodera glycines* e *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, Brasília-DF. v.24, n.2, p.167-172, 2000.
- MORITZ, M. P. **Reação de cultivares de soja a *Meloidogyne paranaensis* e estudos de mecanismos de resistência**. (Dissertação de Mestrado) 68p. Universidade Estadual de Londrina, Paraná. Brasil. 2007
- NARDACCI, J. F.; BARKER, K. R. The influence of temperature on *Meloidogyne incognita* on soybean. **Journal of Nematology**. v.11, p.62, 1979.
- NAVES, R. L.; CAMPOS, V. P. Ocorrência de fungos predadores de nematóides no Sul de Minas Gerais e estudo da capacidade predatória e crescimento *in vitro* de alguns de seus isolados. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v.15 , n.167, p.72 -76, 1991.

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

SAIFULLAH, N. Nematicidal and nematostatic effect of cell-free culture filtrates of *Verticillium chlamydosporium* Goddard *in vitro*. **Afro Asian Journal of Nematology** v.6, p.32-35. 1996.

SANTIAGO, D. C.; HOMECHIN, M.; SILVA, J. F. V.; RIBEIRO, E. R.; GOMES, B. C.; SANTORO, P. H. Seleção de isolados de *Paecilomyces lilacinus* (Thom.) Samson para controle de *Meloidogyne paranaensis* em tomateiro. **Ciência Rural**. Santa Maria. v. 36, n. 4, p. 1055-1064, 2006.

SANTOS, J. M. dos. **Estudo de espécies de *Meloidogyne* GOELDI, que infectam o cafeeiro no Brasil e descrição de *Meloidogyne goeldii* n. sp. Jaboticabal.** (Tese Doutorado) Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista. 1997. 165 f.

SANTOS, J. M. dos. 2000. "Coquetel" de fungos combate vermes em flores e hortifrutigranjeiro. Disponível em: <<http://www.horticiencia.com.br/news/news2.asp?id=578>> Acesso em: 29 nov. 2005.

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

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

SOSA-GOMEZ, D. R. **Fungos entomopatogênicos: catálogo de isolados.** (Eds.). Londrina: Embrapa Soja, 2002. v.1, p.1-32. (Série Documentos).

STIRLING G. R. **Biological control of plant parasitic nematodes.** Wallingford: CAB International, 1991. 282p.

VRAIN, T. C.; BARKER, K. R. Influence of low temperature on development of *Meloidogyne incognita* and *M. hapla* eggs in egg masses. **Journal of Nematology**. v.10, p.311, 1978.

4. ARTIGO B: INFLUÊNCIA DA APLICAÇÃO DE *Paecilomyces lilacinus* EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES SOBRE A REPRODUÇÃO DE ORGANISMOS BIOINDICADORES *Folsomia candida* E *Enchytraeus crypticus*.

4.1 Resumo

Os nematóides formadores de galhas (*Meloidogyne* Goeldi, 1887) causam grande perda na agricultura mundial e com a conscientização pública dos efeitos nocivos causados pelos nematicidas, formas alternativas de manejo dos fitonematóides estão sendo investigadas para que se consiga um manejo ecologicamente sustentável. O controle biológico com fungos nematófagos é um campo de pesquisa potencial em todo o mundo e o fungo *Paecilomyces lilacinus* (Thom., 1910) Samson, 1974 é o mais estudado. No entanto, além dos efeitos causados na população de nematóides, há também o interesse em saber qual o efeito que a aplicação massal de conídios pode causar na reprodução de organismos bioindicadores do solo (*Enchytraeus crypticus* (Westheide & Graefe, 1992) e *Folsomia candida* (Willem, 1902) respectivamente conhecidos como enquitreídeos e colêmbolos), os quais são organismos padrões de testes do ISO e respondem prontamente às mudanças ambientais. Estes organismos foram multiplicados e sincronizados, e após foram montados os testes de reprodução de *E. crypticus* e *F. candida* em laboratório segundo as normas padronizadas pelo ISO utilizando conídios do fungo *P. lilacinus* em diferentes concentrações (0, 15, 250, 450 e 650 mg de conídios. kg⁻¹ de solo OCDE). Após 28 dias foi feita a avaliação também segundo as normas ISO. Foi observado que a quantidade de conídios aplicados não teve correlação com a reprodução de *Enchytraeus crypticus*, porém para *Folsomia candida* quanto maior a concentração de conídios aplicados, menor a reprodução final. A sobrevivência do fungo *P. lilacinus*, ao final do experimento, não diferiu significativamente entre as concentrações testadas em enquitreídeos e colêmbolos, indicando que os dois organismos podem ter se alimentado do fungo em questão.

Termos para indexação: Nematóides de galhas. Controle Biológico. Fungos nematófagos. *Paecilomyces lilacinus*. Bioindicadores do solo. *Folsomia candida*. *Enchytraeus crypticus*.

Abstract

The root-knot nematodes (*Meloidogyne* Goeldi, 1887) cause loss in agriculture worldwide and with public awareness of the harmful effects caused by nematicides, alternative forms of management of plant parasitic nematodes are being investigated so as to achieve an ecologically sustainable management. The biological control with nematophagous fungi is a potential research field in the world and the fungus *Paecilomyces lilacinus* (Thom., 1910) Samson, 1974 is the most studied one. However, apart from the effects on nematode population, there is also interest in knowing what effect the mass application of conidia can cause on reproductive bioindicators of soil organisms (*Enchytraeus crypticus* (Westheide & Graefe, 1992) and *Folsomia candida* (Willem, 1902), respectively known as enchytraeid and springtails) which are standard testing organisms of the ISO and respond readily to environmental changes. These organisms were multiplied and synchronized, and afterwards the *E. crypticus* and *F. candida* reproduction tests were assembled the laboratory according to ISO standards using conidia of the fungus *P. lilacinus* at different concentrations (0, 15, 250, 450 and 650 mg of conidia. kg⁻¹ soil OECD). After 28 days the assessment was also made according to the rules cited by the ISO. According to the results it was observed that the

amount of conidia did not correlate with the reproduction of the *Enchytraeus crypticus*, but for *Folsomia candida* the higher the concentration of conidia applied, the lower the final reproduction. As for survival of the fungus *P. lilacinus* at the end of the experiment, it was observed that there was no significant difference between the concentration tested in experiments with enchytraeid and springtails, indicating that the two organisms may have fed on the fungus in question.

Index terms: Root-knot nematode, biological control, nematophagous fungi, *Paecilomyces lilacinus*, Bioindicators of soil, *Folsomia candida*, *Enchytraeus crypticus*.

4.2 Introdução

Os nematóides constituem o grupo mais abundante de animais multicelulares em número de indivíduos no mundo, estimado em um milhão de espécies (VIGLIERCHIO, 1991; BAXTER, 2003). Muitas espécies são importantes na agricultura pelos danos causados à produção, e os nematóides fitoparasitas promovem a destruição do sistema radicular, induzindo a formação de hiperplasias ou lesões necróticas nas raízes impedindo as plantas de absorverem água e nutrientes.

As perdas devidas ao ataque de nematóides na agricultura mundial são estimadas em aproximadamente US\$ 80 bilhões/ano (AGRIOS, 1997). Na agricultura americana, essas perdas são estimadas em US\$ 8 bilhões/ano, o que corresponde a 10% em relação à agricultura mundial (BARKER et al., 1994). No Brasil, a quantificação de perdas não é precisa, devido principalmente às interações com danos provocados por pragas e outras doenças, condições climáticas, presença de plantas invasoras e inadequação de tratamentos culturais. Em vista do desconhecimento da importância econômica dos nematóides, esses organismos têm sido frequentemente negligenciados nos agroecossistemas, somente assumindo “status” de patógeno quando sua população se encontra muito elevada, com prejuízos acentuados (RITZINGER; FANCELLI, 2006).

Ao longo das últimas décadas, o controle dos nematóides formadores de galhas foi baseado principalmente no uso de fumigantes organofosforados de solo e nematicidas carbamatos (NOLING; BECKER, 1994). As preocupações ambientais e a segurança alimentar têm criado pressões sociais e legislativas para eliminar muitos defensivos agrícolas do mercado, dos quais o exemplo mais recente é o brometo de metila (NOLLING; DICKSON, 1992; MCKENRY et al., 1994, CALVERT et al., 1998). Com a retirada dos produtos químicos, uma nova estratégia ambiental compatível com o controle de pragas terá que ser desenvolvida em um espaço de tempo relativamente curto, para evitar perdas

significativas de produtividade nas culturas, devido a um amplo complexo de solo, plantas, pragas e patógenos (NOLLING; BECKER, 1994).

O desenvolvimento de estratégias viáveis de manejo aponta cada vez mais para uma abordagem integrada do uso de agentes de controle biológico com práticas culturais adequadas, como a resistência da planta hospedeira, plantas nematicidas ou antagônicas e, quando necessário, uso criterioso de nematicidas químicos para reduzir populações de nematóides para que fiquem abaixo do limiar de dano econômico (GOWEN et al., 1998; BOURNE; KERRY, 1999; DESAEGER; RAO, 2000).

Fungos nematófagos têm sido considerados agentes promissores de controle biológico de nematóides fitoparasitas (JANSSON et al., 1985; DUPONNOIS et al., 1995; SORBO et al., 2003). As espécies de fungos endoparasitas de ovos de nematóides mais conhecidas são *Pochonia* e *Paecilomyces* e esta última é a espécie fúngica que possui o maior número de bionematicidas formulados que tem sido relatado (DONG; ZHANG, 2006).

Paecilomyces lilacinus (Thom.) Samson, 1974, é um hifomiceto comum no solo com distribuição cosmopolita (DUBE; SMART, 1987). É um patógeno facultativo de nematóides sedentários e reconhecido como um dos mais promissores antagonistas para o controle de nematóides de galhas e nematóides de cistos (SIDDIQUI; MAHMOOD, 1996). Contudo, para que a aplicação deste fungo a campo possa ter maior confiabilidade dos produtores nos bionematicidas, estudos sobre o efeito dos conídios sobre organismos bioindicadores de qualidade do solo, ou seja, organismos que respondem rapidamente aos fatores de estresse do solo, precisam ser desenvolvidos.

O campo da ecotoxicologia estuda os efeitos dos químicos nos organismos (WALKER et al., 2001). A resposta dos organismos do solo à contaminantes tem sido obtida por meio de espécies representativas, por exemplo, minhocas (*Eisenia* sp.), enquitreídeos (*Enchytraeus* sp., *Cognettia* sp.), e colêmbolos têm sido os grupos mais utilizados nos estudos pela facilidade de manter a cultura em laboratório e pelo tempo de geração curto na temperatura ambiente (ACHAZI et al., 1997; RONDAY; HOUX, 1996). Por cerca de 20 anos, testes ecotoxicológicos padronizados do solo foram realizados. Na maioria destes métodos, em particular aqueles usando invertebrados, o solo artificial é usado como substrato nos testes (OECD, 1984). Produtos químicos a serem avaliados são adicionados a estes substratos em várias concentrações e seus efeitos aos organismos (minhocas, enquitreídeos, colêmbolos e ácaros predadores) são medidos (JÄNSCH et al., 2005). Portanto, para este estudo foram selecionadas espécies de enquitreídeos e colêmbolos, *Enchytraeus crypticus* (Westheide & Graefe 1992) e *Folsomia candida* (Willem 1902), respectivamente.

Os enquitreídeos pertencem à ordem dos Oligochaeta e assim ao filo dos Annelida e são os parentes mais próximos das minhocas (ERSÉUS; KÄLLERSJÖ, 2004). Apesar do seu papel importante em muitos ecossistemas, os enquitreídeos foram negligenciados como organismos dos testes ecotoxicológicos até cerca de 15 anos atrás (RÖMBKE, 2003). No entanto, *E. crypticus*, é uma espécie que devido ao seu rápido desenvolvimento tem se tornado a espécie de escolha dos testes nos anos recentes (ACHAZI et al., 1997; KUPERMAN et al., 2003b). O teste de reprodução com enquitreídeos foi padronizado internacionalmente por ASTM (2004), ISO (International Organization for Standardization) (2003a), e OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) (2003) e é similar ao teste de reprodução de minhoca e de colêmbolos (ISO 1998, 1999a), que foram desenvolvidos ao mesmo tempo.

E. crypticus fazem parte da mesofauna saprofítica da camada decompositora superficial do solo. Através da alimentação dos enquitreídeos, o solo assume uma estrutura de grânulos com estabilidade mais elevada do que a maioria das partículas do solo. Possuem uma habilidade de escavação limitada comparada à maioria das minhocas, contudo, podem melhorar em pequena escala o manejo da água e do ar do solo, especialmente quando a população é alta. Jaffee et al. (1997) suspeitaram que este microrganismo pode interferir no controle biológico de nematóides fitoparasitas por afetar diretamente o fungo patogênico.

Folsomia candida Willem 1902, está sendo exposta a contaminantes via solo e/ou alimentação em testes que examinam a bioacumulação e/ou efeitos no comportamento. Alguns testes para avaliar a toxicidade de poluentes orgânicos e inorgânicos têm sido usados como bioensaios para monitorar e remediar os solos contaminados (CROUAU et al., 2002; DIEZ et al., 2001; FAVA; BERTIN, 1999; FAVA PICCOLO, 2002; FRISCHE, 2003; GEJLSBIERG et al., 2001; JUVONEN et al., 2000; KRATZ; RIESBECK, 1998; SCHÄFER; ACHAZI, 1999; VAN GESTEL et al., 2001). A International Standards Organization (ISO) publicou um protocolo que usa *F. candida* como uma espécie de teste ecotoxicológico que emprega efeitos na reprodução como valor limite (ISO, 1999).

Os colêmbolos possuem um papel muito importante como reguladores de processos da decomposição através da predação da microfauna e são membros importantes na comunidade decompositora (HOPKIN, 1997). É assumido que na natureza, *F. candida* se alimenta de fungos (KLIRONOMOS et al., 1992), embora o organismo também possa se alimentar de nematóide (LEE; WIDDEN, 1996).

Algumas pesquisas tem mostrado que a poluição do solo por uma ampla variedade de contaminantes pode mudar a composição das espécies como a comunidade de

colêmbolos e enquitreídeos em comparação a locais não impactados (ABEL; LARINK, 1994; NÜSS, 1994; CHERNOVA et al., 1995; FILSER et al., 1995; MOLDENKE; THIES, 1996; SALMINEN; HAIMI, 1996; FRAMPTON, 1997; KUZNETSOVA; POTAPOV, 1997; CHERNOVA; KUZNETSOVA, 2000; REBECCHI et al., 2000; COLE et al., 2001) de forma que as atividades antropogênicas pode ter efeitos persistentes e duradouros nos colêmbolos (FRAMPTON, 2001).

E, este trabalho objetivou avaliar o efeito da aplicação de conídios do fungo nematófago *Paecilomyces lilacinus* em diferentes concentrações em dois organismos bioindicadores de qualidade do solo *Enchytraeus crypticus* e *Folsomia candida* e avaliou também a interferência dos dois organismos bioindicadores na sobrevivência deste fungo no solo.

4.3 Material e Métodos

O trabalho foi realizado na Universidade de Coimbra – Portugal, Departamento de Zoologia, nas dependências do Instituto do Mar (IMAR).

Em princípio foi feita a preparação do solo artificial OCDE (ISO-11268-1, 1993; Fairbrother et al., 1999; OECD, 2000) com 5% de turfa, 21% de caolin, 75% de areia e 3,7 g CaCO₃ kg⁻¹ de solo artificial OCDE para ajuste do pH (entre 5,5-6,5), segundo as normas do ISO-11274 (1994). Logo após foi determinada a capacidade de retenção de água segundo as normas do ISO-11274 (1998).

Ao mesmo tempo dos procedimentos citados acima foi feita a sincronização das culturas de *Enchytraeus crypticus* e *Folsomia candida* através das normas do ISO-16387 (2003) e ISO-11267 (1999), respectivamente.

O isolado de *P. lilacinus* (UEL pae 18) avaliado pertence à coleção de microrganismos do Laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual de Londrina, o qual foi obtido em áreas de cultivo de café na região de Londrina – PR. Este foi previamente selecionado quanto à capacidade de parasitar ovos de *M. paranaensis* “*in vitro*”, em diferentes temperaturas (CADIOLI et al., 2007) e a patogenicidade sobre *M. paranaensis* em café em casa de vegetação (CADIOLI et al., 2009). Este fungo foi previamente multiplicado em arroz, triturado e formulado na concentração de 10⁸ conídios por grama pela empresa Ballagro-Agro Tecnologia.

Ensaio I:

Foi feita sincronização da cultura de *Enchytraeus crypticus* ao ponto que quando foi instalado o experimento os organismos utilizados apresentavam clítelos

desenvolvidos, ou seja, estavam em fase de reprodução através das normas ISO-16387 (2003).

Cada tratamento conteve 5 réplicas, cada uma com 20 g de solo OCDE previamente preparado. Os tratamentos foram: C0= Controle (sem o fungo); C1= 0,5 mg do fungo *Paecilomyces lilacinus*; C2= 7,5 mg do fungo *Paecilomyces lilacinus*; C3= 13,5 mg do fungo *Paecilomyces lilacinus* e C4= 19,5 mg do fungo *Paecilomyces lilacinus*.

A suspensão com os conídios do fungo foi preparada para aplicação em todos os tratamentos, e para isso, foi feita uma suspensão com 50 mL de água destilada + 246 mg do conídio do fungo *Paecilomyces lilacinus*. Após, para cada tratamento foi adicionado o valor de suspensão (água destilada + fungo) do fungo para o total de 100 g de solo, sendo adicionados 44,25 mL de suspensão + água destilada por tratamento. Foram retiradas alíquotas de solo para a medição do pH de cada tratamento em questão e para determinação do teor de água.

Após o preparo do solo artificial com a adição do fungo *P. lilacinus*, foram adicionados 10 organismos de *E. crypticus* por réplica e 25 mg de aveia moída como alimento, fornecidos semanalmente. Os frascos foram climatizados em BOD a 25 °C com fotoperíodo de 12 por 12 horas de claro e escuro.

Após 28 dias foi adicionado em cada réplica, álcool 80% e Rosa de Bengala 1% aos potes e agitados. Passados três dias, os enquitreídeos estavam coloridos e foram contados em microscópio estereoscópio.

Ensaio II:

Foi feita sincronização da cultura de colêmbolos ao ponto que quando foi instalado o experimento a cultura estava entre 10 - 12 dias de idade conforme preconiza as normas ISO 11267 (1999).

Cada tratamento conteve 5 réplicas, cada uma com 30 g de solo OCDE. Os tratamentos foram: C0 = Controle (sem o fungo); C1 = 0,5 mg do fungo *Paecilomyces lilacinus*; C2 = 7,5 mg do fungo *Paecilomyces lilacinus*; C3 = 13,5 mg do fungo *Paecilomyces lilacinus* e C4 = 19,5 mg do fungo *Paecilomyces lilacinus*.

A suspensão com os conídios do fungo foi preparada para aplicação em todos os tratamentos e, para isso, foi feita uma suspensão com 100 mL de água destilada + 246 mg do fungo *Paecilomyces lilacinus*. Após, para cada tratamento foi adicionado o valor em suspensão (água destilada + fungo) do fungo *P. lilacinus* para o total de 150 g de solo. Foram adicionados 53,1 mL de suspensão + água destilada por tratamento. Foram retiradas alíquotas de solo para a medição do pH de cada tratamento em questão e para o valor da

retenção de umidade. A capacidade de retenção de água do solo artificial foi medida com resultado de 59%.

Após a preparação do solo com o fungo *P. lilacinus*, foram adicionados 10 colêmbolos por réplica e 2 mg de levedura como fonte de alimento. Os frascos com os tratamentos foram pesados e foi avaliada a perda de água semanalmente. Após quatorze dias da montagem do experimento, foram fornecidos 2 mg de levedura por réplica em todos os tratamentos. Os frascos foram acondicionados em BOD a 25 °C com fotoperíodo de 12 por 12 horas de claro e escuro.

Após 28 dias do início do ensaio, cada réplica foi retirada, transferida para um recipiente onde foi colocada água + tinta de caneta azul (Parker). Os colêmbolos ficaram na superfície e foi tirada uma foto de cada réplica das concentrações. Esta foto foi transferida para o computador e foi feita a contagem de colêmbolos através do programa ImageTool.

O critério de validação no controle de reprodução para *F. candida* é uma média de 100 juvenis (ISO, 1999). O coeficiente de variação (CV) da reprodução foi ajustado a um máximo de 30% (ISO, 1999), idêntico aos testes da reprodução de minhoca e de ácaro (ISO, 1998).

Para avaliar a sobrevivência do fungo no solo foi feita a diluição seriada (10^{-3}) de cada repetição e foi plaqueada uma alíquota de 0,1 mL em meio semi-seletivo de aveia para *P. lilacinus* de Alves et al. (1998) modificado, com 20 g de farinha de aveia, 20 g de ágar, 230 mg de Baycor Plus (dodine 800 g kg⁻¹), 50 mg de solução de violeta genciana, 5 mg de Tetraciclina (Cloridrato de tetraciclina, 300 mg), diluídos em 1000 mL de água destilada e incubados por três dias a 25 °C, para posterior determinação do percentual de desenvolvimento das colônias nas placas.

Os dados dos testes de reprodução de *E. crypticus* e *F. candida* e sobrevivência do fungo *P. lilacinus* foram submetidos à análise de variância com desdobramento dos graus de liberdade em polinômios ortogonais para comparação das médias.

4.4 Resultados e Discussão

Pode ser observado que quanto maior a concentração de conídios do fungo *P. lilacinus*, menor foi a reprodução dos colêmbolos (Tabela 1). Isto corrobora com Fountain e Hopkin (2005) que relataram que o fungo no qual *F. candida* se alimenta influencia o seu crescimento e fecundidade. Também há relatos de que a qualidade do substrato alimentar fúngico pode influenciar no crescimento dos colêmbolos (HOGERVORST et al., 2003) e

reprodução (KLIRONOMOS et al., 1999), alterando o tamanho da população e assim afetando o futuro da intensidade de alimentação.

Experimentos de laboratório com *F. candida* em microcosmos, com espécies de fungos testadas separadamente em microcosmos, mostrou que alguns fungos são mais nutritivos que outros (FOUNTAIN; HOPKIN, 2005). Contudo, é difícil verificar as razões para esta diferença que podem ser decorrentes dos diferentes teores de proteína (DRAHEIM; LARINK, 1995) ou a inibição do crescimento dos colêmbolos por substâncias químicas que atuam negativamente sobre os organismos que ingere (HOPKIN, 1997).

Outro estudo de fungos como alimento para *F. candida* destacou a importância de considerar não somente a espécie de fungo envolvida, mas igualmente o seu estágio de vida (SABATINI; INNOCENTI, 2000). Quatro espécies de fungos patogênicos de raízes de cereais de inverno foram avaliadas. O micélio de três espécies favoreceu a nutrição para reprodução de *F. candida*. Contudo, o micélio de *Bipolaris sorokiniana* foi negativo e os colêmbolos que se alimentaram dele morreram. Intrigantemente, os conídios de *B. sorokiniana* foram comidos por *F. candida* e forneceram uma dieta suficiente para a reprodução.

Os resultados obtidos neste trabalho não confirmam que *F. candida* consome e inativa fungos entomopatogênicos aplicados como pesticidas biológicos sem sofrer mortalidade, distúrbio reprodutivo, ou qualquer outro efeito prejudicial como foi citado por Broza et al. (2001); Sjursen et al. (2001), pois o tratamento controle obteve maior reprodução indicando que a ingestão do fungo diminuiu a reprodução de *F. candida*.

Não houve diferença significativa nos resultados de reprodução dos enquitreídeos com a aplicação de diferentes concentrações de conídios. Tal fato difere dos resultados obtidos por Jaffee et al. (1997) que relataram o rápido aumento do número de *E. crypticus* quando foram adicionados os peletes com hifas fúngicas no solo, indicando que os enquitreídeos não somente ingeriram como também digeriram o fungo.

Tabela 1 – Reprodução dos organismos bioindicadores *Folsomia candida* e *Enchytraeus crypticus* em relação à aplicação de diferentes concentrações de esporos do fungo *Paecilomyces lilacinus*.

Tratamentos	Nº <i>F. candida</i>	Nº <i>E. crypticus</i>
C0	881,17	781,33
C1	740,33	651,17
C2	614,17	728,00
C3	591,33	565,50
C4	472,00	772,33
	Y=807,44-17,17X (p<0,000 R ² =88,00)	Ns
CV (%)	26,49	23,34

Quanto à sobrevivência do fungo *P. lilacinus* ao final do experimento (Tabela 2), foi observado que na presença dos colêmbolos não houve diferença estatística entre as concentrações e a recuperação do fungo do solo. É assumido que na natureza *F. candida* se alimenta de fungos (KLIRONOMOS et al., 1992), embora o organismo também se alimente de nematóides (LEE; WIDDEN, 1996). Hopkin (1997) comentou que os colêmbolos afetam indiretamente processos de decomposição se alimentando das hifas fúngicas. Também, a alimentação seletiva dos colêmbolos pode afetar negativamente ou positivamente a abundância de espécies fúngicas (VARGA et al., 2002).

Quanto à sobrevivência do fungo na presença de enquitreídeos não houve diferença significativa, indicando que estes organismos podem ter se alimentado do fungo nas maiores concentrações. Os enquitreídeos são tidos como consumidores de material orgânico morto microbiologicamente colonizado (O'CONNOR, 1967; BROCKMEYER et al., 1990; DIDDEN, 1993), mas um número de trabalhos reportam que alguns enquitreídeos se alimentam de fungo (DASH; CRAGG, 1972; STANDEN; LATTE, 1977; HEDLUND; AUGUSTSSON, 1995) e Jaffe et al (1997) suspeitaram que *E. crypticus* afetou diretamente o fungo e concluíram que *E. crypticus* pode interferir no controle biológico de nematóides fitoparasitas.

Segundo Jaffee e Muldoon (1997), a hifa peletizada de *Hirsutella rhossiliensis* reduziu a invasão de nematóides nas raízes em microcosmos em laboratório, mas não em campo, o que foi atribuído ao fato que *E. crypticus* destruíram colônias das hifas peletizadas dos fungos nematófagos e reduziram o controle biológico de nematóide formador de galhas *M. javanica*. O enquitreídeo também reduziu a densidade da população do fungo formador de armadilha *Monacrosporium gephyropagum*, *Arthrobotrys thaumasia* e *A. haptotyla* pela ingestão e consumo do fungo (JAFFE et al., 1997).

Tabela 2 – Sobrevivência (%) do fungo *Paecilomyces lilacinus* após 28 dias em contato com os organismos *Folsomia candida* e *Enchytraeus crypticus*.

Tratamentos	Enquitrédeos	Colêmbolos
C1	29,17	11,67
C2	23,33	32,00
C3	24,17	20,33
C4	24,17	25,00
	Ns	Ns
CV (%)	21,00	39,67

A comercialização de microrganismos bionemáticos se baseia em resultados de muita pesquisa. Um fator limitante destes bionemáticos é a inconstante performance no campo (LAY et al., 1982; DICKSON; MITCHELL, 1985; CARNEIRO; CAYROL, 1991; PERSSON; JANSSON, 1999; MEYER et al., 2001; SORRIBAS et al., 2003), a perda de virulência (LOHMANN et al., 1989; ZUCKERMAN et al., 1989; WANG et al., 2003), consequentemente a baixa qualidade de controle na aplicação (JENKINS et al., 1998) por causa principalmente dos fatores ambientais que o fungo estará sujeito quando aplicado em campo.

Os agentes de controle biológico no solo estão sujeitos ao antagonismo imposto por diferentes organismos. É preciso uma investigação rigorosa para que se possa aplicar bionemáticos, adquirir a confiança dos produtores e manter o ecossistema o mais possível intacto de estresses antropogênicos.

4.5 Conclusões

A concentração dos conídios do fungo *Paecilomyces lilacinus* influencia na reprodução dos colêmbolos.

Há indicação de que os dois organismos bioindicadores *Enchytraeus crypticus* e *Folsomia candida* se alimentam do fungo *Paecilomyces lilacinus*.

4.6 Agradecimentos

À Professora Doutora Elke Jurandy Bran Nogueira Cardoso, ao Professor Doutor Marco Antonio Nogueira e ao Pós Graduando Alexandre Martin Martinês. Ao representante da região Beira Litoral de Portugal da Bayer CropScience Mario Santiago. Este trabalho foi financiado pelo vínculo de cooperação internacional CAPES/GRICES.

4.7 Referências Bibliográficas

- ABEL, K.; LARINK, O. Different effects of the insecticide Dursban (Chlorpyrifos) on various collembolan species. **Mitteilungen der Deutschen Gesellschaft für Allgemeine und Angewandte Entomologie**. v.9, p.147–52. 1994.
- ACHAZI, R. K.; CHROSZCZ, G.; MIERKE, W. Standardisation of test methods with terrestrial invertebrates for assessing remediation procedures for contaminated soils. **Eco-Inforna**. p.284–289. 1997.
- AGRIOS, G. N. Plant diseases caused by nematodes. In: GEORGE, N. AGRIOS, F.N. (Ed.). **Plant Pathology**. 4th ed.. San Diego: Academic Press, 1997. p.565-597.
- ALVES, S. B.; ALMEIDA, J. E. M. de; MOINO JÚNIOR, A.; ALVES, L. F. A. Técnicas de laboratório. In: ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 637-711, 1163 p.
- ASTM. 2004. Standard guide for conducting laboratory soil toxicity of bioaccumulation tests with the lumbricid earthworm *Eisenia fetida* and the enchytraeid potworm *Enchytraeus albidus*. ASTM Guideline No. E 1676–97.
- BARKER, K. R.; HUSSEY, L. R.; KRUSBERG, L. R.; BIRD, G. W.; DUNN, R. A.; FERRIS, H.; FERRIS, V. R.; FRECKMAN, D. W.; GABRIEL, C. J.; GREWAL, A. E.; McGUIDWIN, A. E.; RIDDLE, D. L.; ROBERTS, P. A.; SCHIMMITT, D. P. Plant and soil nematodes: societal impact and focus for the future. **Journal of Nematology**, Lakeland, v.26, p.127-137, 1994.
- BAXTER, M. Counting angels with DNA. **Nature**, v.421, p.122–124. 2003.
- BENGTSSON, G.; RUNDGREN, S. Respiration and growth of a fungus, *Mortierella isabellina*, in response to grazing by *Onychiurus armatus* (Collembola). **Soil Biology Biochemistry** v.15, p.469–473. 1983.
- BOURNE, J. M.; KERRY, B. R., The effect of the host 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 Biochemistry**. v.31, p.75–84. 1999.
- BROCKMEYER, V.; SCHMIDT, R.; WESTHEIDE, W. Quantitative investigations of the food of two terrestrial enchytraeid species (Oligochaeta). **Pedobiologia** v.34, p.151–156. 1990.
- BROZA, M.; PEREIRA, R. M.; STIMAC, J. L. The nonsusceptibility of soil Collembola to insect pathogens and their potential as scavengers of microbial pesticides. **Pedobiologia** v.45, p.523–34. 2001.
- CADIOLI, M. C.; SANTIAGO, D. C.; HOSHINO, A. D.; HOMECHIN, M. Crescimento micelial e parasitismo de *Paecilomyces lilacinus* sobre ovos de *Meloidogyne paranaensis* em diferentes temperaturas “in vitro”. **Ciência Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 2, p. 305-311, mar./abr., 2007.

- CADIOLI, M. C.; SANTIAGO, D. C.; OLIVEIRA, A. D.; PAES, V. DOS S.; ARIEIRA, G.O.; BAIDA, F. C. Efeito de isolados de *Paecilomyces lilacinus* no desenvolvimento de cafezais e na população de *Meloidogyne paranaensis*. **Ciência Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 3, p. 713-720, maio/jun., 2009.
- CALVERT, G. M.; TALASKA, G.; MUELLER, C. A.; AMMENHEUSER, M. M.; AU, W. W.; FAJEN, J. M.; FLEMING, L. E.; BRIGGLE, T.; WARD, E. Genotoxicity in workers exposed to methyl bromide. **Mutation Research: Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**. v.417, n.2-3, p.115-128. 1998.
- CARNEIRO, R. M. D. G.; CAYROL, J. C. Relationship between inoculum density of the nematophagous fungus *Paecilomyces lilacinus* and control of *Meloidogyne arenaria* on tomato. **Revue Nematol** v.14, p.629-634. 1991.
- CHERNOVA, N. M.; BALABINA, I. P.; PONOMAREVA, O. N. Changes in population growth of springtail (Collembola) under the influence of herbicides. **Polskie Pismo Entomologiczne** v.4, p.912-98. 1995.
- CHERNOVA, N. M.; KUZNETSOVA, N. A. Collembolan community organisation and its tempoal predictability. **Pedobiologia** v.44, p.451-66. 2000.
- COLE, L. J.; MCCRACKEN, D. I.; FOSTER, G. N.; AITKEN, M. N. Using Collembola to assess the risks of applying metal-rich sewage sludge to agricultural land in western Scotland. **Agriculture, Ecosystems. Environment**. v.83, p.177-89. 2001.
- CROUAU, Y.; GISCLARD, C.; PEROTTI, P. The use of *Folsomia candida* (Collembola Isotomidae) in bioassays of waste. **Applied Soil Ecology**. v.19, p.65-70. 2002.
- DESAEGER, J.; RAO, M. R., Infection and damage potential of *Meloidogyne javanica* on *Sesbania sesban* in different soil types. **Nematology** v.2, p.169-178. 2000.
- DICKSON, D. W.; MITCHELL, D. J. Evaluation of *Paecilomyces lilacinus* as a biocontrol agent of *Meloidogyne javanica* on tobacco. **Journal of Nematology**. v.17, p.519. 1985.
- DIDDEN, W. A. M. Ecology of terrestrial Enchytraeidae. **Pedobiologia** v.37, p.2-29. 1993.
- DIEZ, J. A.; DE LA TORRE, A. I.; CARTAGENA, M. C.; CARBALLO, M.; VALLEJO, A. Evaluation of the application of pig slurry to an experimental crop using agronomic and ecotoxicological approaches. **Jounal Environment Quality**. v.30, p.2165-72. 2001.
- DONG, L. Q.; ZHANG, K. Q. Microbial Control of Plant-parasitic nematodes: a five-party interaction. **Plant Soil**. v.288, p.31-45. 2006.
- DRAHEIM, R.; LARINK O. Effects of differently cultured fungi as a diet of Collembola. **Acta Zoologica Fennica**. v.196, p.168- 70. 1995.
- DUBE, B.; SMART JR, G. C. Biological control of *Meloidogyne incognita* by *Paecilomyces lilacinus* and *Pasteuria penetrans*. **Journal of Nematology** v.19, p. 222-227. 1987.

- DUPONNOIS, R.; MATEILLE, T.; GUEYE, M. Biological characteristics and effects of two strains of *Arthrobotrys oligospora* from Senegal on Meloidogyne species parasitizing tomato plants. *Biocontrol Science and Technology*. v.5, p. 517-525. 1995.
- ERSÉUS, C.; KÄLLERSJÖ, M. 18S rDNA phylogeny of Clitellata (Annelida). *Zool. Scr.* v.33, p.187–196. 2004.
- FAIRBROTHER, A.; GLAZEBROOK, P. W.; VAN STRAALLEN, N.; TARAZONA, J. V. **Test methods for hazard determination of metals and sparingly soluble metal compounds in soils:summary of SETAC Pellston workshop.** In A. Fairbrother (ed.). A Publication of SETAC. San Lorenzo de EL Escorial, Spain. 1999.
- FAVA, F.; BERTIN, L. Use of exogenous specialised bacteria in thebiological detoxification of a dump sitepolychlorobiphenyl- contaminated soil in slurry phase conditions. *Biotechnology Bioengineering*. v.64, p.240–249. 1999.
- FAVA, F.; PICCOLO, A. Effects of humic substances on the bioavailability and aerobic biodegradation of polychlorinated biphenyls in a model soil. *Biotechnology Bioengineering*. v.77, p.204–211. 2002.
- FILSER, J.; FROMM, H.; NAGEL, R. F.; WINTER, K. Effects of previous intensive agricultural management on microorganisms and the biodiversity of soil fauna. *Plant and Soil*. v.170, p.123–129. 1995.
- FOUNTAIN, M. T.; HOPKIN, S. P. *Folsomia cândida* (Collembola): A “Standard” Soil Arthropod. *Annual Review Entomology*. v.50, p.201-222. 2005.
- FRAMPTON, G. K. The potential of Collembola as indicators of pesticide usage: evidence and methods from the UK arable ecosystem. *Pedobiologia*. v.41, p.179–84. 1997.
- FRAMPTON, G. K. **Large scale monitoring of non-target pesticide effects on farmland arthropods in England: the compromise between replication and realism of scale.** In: J.J. Johnston (ed), pp. 54–67 Pesticides and Wildlife. Oxford University Press. 2001.
- FRISCHE T. Ecotoxicological evaluation of in situ bioremediation of soils contaminated by the explosive 2,4,6- trinitrotoluene (TNT). *Environment Pollution*. v.121, p.103–113. 2003.
- GEJLSBIERG, B.; KLINGE, C.; SAMSOE-PETERSEN, L.; MADSEN, T. Toxicity of linear alkylbenzene sulfonates and nonylphenol in sludge-amended soil. *Environment Toxicology Chemistry*. v.20, p.2709–2716. 2001.
- GOWEN, S. R.; TZORTZAKAKIS, E. A.; CHANNER, A. G. Control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by the parasite *Pasteuria penetrans* as influenced by initial nematode population densities. *Nematologica*. v.44, p.369–379. 1998.
- HANLON, R. D. G.; ANDERSON, J. M. The effects of Collembola grazing on microbial activity in decomposing leaf litter. *Oecologia*. v.38, p. 93–99. 1979.
- HEDLUND, K.; AUGUSTSSON, A. Effects of enchytraeid grazing on fungal growth and respiration. *Soil Biology Biochemistry*. v. 27, p.905–909. 1995.

HOGERVORST, R. F.; DIJKHUIS, M. A. J.; VAN DER SCHAAR, M. A.; BERG, M. P.; VERHOEF, H. A. Indications for the tracking of elevated nitrogen levels through the fungal route in a soil food web. **Environmental Pollution**. v.126, p.257–266. 2003.

HOPKIN, S. P. **Biology of springtails. Insecta: Collembola**. Oxford University Press, Oxford, UK. pp. 330. 1997.

ISO. 1993. **Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). - Part 1: Determination of acute toxicity using artificial soil substrate**. ISO 11268-1.

ISO. 1999. **Soil quality - Inhibition of reproduction of Collembola (*Folsomia candida*) by soil pollutants**. ISO 11267.

ISO. 2003. **Soil Quality – Effects of pollutants on Enchytraeidae (*Enchytraeus* sp.) – Determination of effects on reproduction and survival**. ISO 16387.

ISO. 1994. **Soil Quality – Determination of pH**. ISO 10390.

ISO. 1998. **Soil Quality - Determination of the water retention characteristic. Laboratory Methods**. ISO 11274.

ISO. 1999a. **Soil Quality — inhibition of reproduction of Collembola (*Folsomia candida*) by soil pollutants**. ISO, Geneva, Switzerland. No. 11267.

ISO. 2003a. **Soil quality — effects of pollutants on Enchytraeidae (*Enchytraeus* sp.). Determination of effects on reproduction**. ISO, Geneva, Switzerland. No. 16387.

JAFFEE, B. A.; MULDOON, A. E. Suppression of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by alginate pellets containing the nematophagous fungi *Hirsutella rhossiliensis*, *Monacrosporium cionopagum* and *M. elliposporum*. **Biocontrol Science Technology** (in press). 1997.

JAFFEE, B. A.; MULDOON, A. E.; DIDDEN, W. A. M. Enchytraeids and nematophagous fungi in soil microcosms. **Biology and Fertility of Soils**. v.25, p.382:388. 1997.

JÄNSCH, S.; AMORIM, M. J.; RÖMBKE, J. Identification of the ecological requirements of important terrestrial ecotoxicological test species. **Environmental Review**. v.13, p.51-83. 2005.

JANSSON, H. B.; JEYAPRAKASH, A.; ZUCKERMAN B. M. Control of root-knot nematodes on tomato by the endoparasitic fungus *Meria coniospora*. **Journal of Nematology**. v.17, p.327-329. 1985.

JENKINS, N. E.; HEVIEFO, G.; LANGEWALD, J.; CHERRY, A. J.; LOMER, C. J.; Development of mass production technology for aerial conidia for use as mycopesticides. **Biocontrol News and Information**. v.19, p.21N–31N. 1998.

JUVONEN, R.; MARTIKAINEN, E.; SCHULTZ, E.; JOUTTI, A.; AHTIAINEN, J. A battery of toxicity tests as indicators of decontamination in composting oily waste. **Ecotoxicological Environment Safety**. v.47, p.156–66. 2000.

KLIRONOMOS, J. N.; WIDDEN, P.; DESLANDES, I. Feeding preferences of the collembolan *Folsomia candida* in relation to microfungal successions on decaying litter. **Soil Biology Biochemistry**. v.24, p.685–692. 1992.

KLIRONOMOS, J. N.; BEDNARCZUK, E. M.; NEVILLE, J. Reproductive significance of feeding on saprobic and arbuscular mycorrhizal fungi by the collembolan, *Folsomia candida*. **Functional Ecology** v.13, p.756–761. 1999.

KRATZ, W.; RIESBECK, F. Die Wirkung von Sprengstoffen in Böden einer militärischen Altlast auf die Populationsentwicklung von *Folsomia candida* (Willem 1902) (Collembola, Insecta). **Z. Umweltchem. Ökotox.** v.10, p.143–46. 1998.

KUPERMAN, R. G.; CHECKAI, R. T.; SIMINI, M.; PHILLIPS, C. T.; KOLAKOWSKI, J. E.; KURNAS, C. W.; SUNAHARA, G. I. Survival and reproduction of *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta, Enchytraeidae) in a natural sandy loam soil amended with the nitro-heterocyclic explosives RDX and HMX. **Pedobiologia**, v.47, p.651–656. 2003b.

KUZNETSOVA, N. A.; POTAPOV, M. B. Changes in structure of communities of soil springtails (Hexapoda: Collembola) under industrial pollution of the South Taiga Bilberry pine forests. **Russian Journal Ecology**. v.28, p.386–92. 1997.

LAY, E. C.; LARA, J.; JATALA, P.; GONZALES, F. Preliminary evaluation of *Paecilomyces lilacinus* as a biological control of the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*, in industrial tomatoes. **Nematropica** v.12, p.154. 1982.

LEE, Q.; WIDDEN, P. *Folsomia candida*, a “fungivorous” collembolan, feeds preferentially on nematodes rather than soil fungi. **Soil Biology Biochemistry**. v.28, p.689–690. 1996.

MARAUN, M.; MARTENS, H.; MIGGE, S.; THEENHAUS, A.; SCHEU, S. Adding to “the enigma of soil animal diversity”: fungal feeders and saprophagous soil invertebrates prefer similar food substrates. **European Journal of Soil Biology**. v.39, p.85–95. 2003.

LOHMANN, U.; SIKORA, R. A.; HOFER, M. Influence of phospholipids on growth, sporulation and virulence of the endoparasitic fungi *Drechmeria coniospora*, *Verdcillium balanoides* and *Harposporium anguillulae* in liquid culture. **Journal of Phytopathology**. v.125, p.139–147. 1989.

MCKENRY, M.; BUZO, T.; KRETSCH, J.; KALU, S.; OTOMO, E.; ASHCROFT, R.; LANGE, A.; KELLEY, K. Soil fumigants provide multiple benefits: alternatives give mixed results. **California Agriculture**. v.48, p.22–28. 1994.

MEYER, S. L. F.; ROBERTS, D. P.; CHITWOOD, D. J.; CARTA, L. K.; LUMSDEN, R. D.; MAO, W. L. Application of *Burkholderia cepacia* and *Trichoderma virens*, alone and in combinations, against *Meloidogyne incognita* on Bell pepper. **Nematropica** v.31, p.75–86. 2001.

MOLDENKE, A. R.; THIES, W. G. Effect on soil arthropods one year after application of chloropicrin to control laminated root rot. III. Treatment effects on non target soil invertebrates. **Canadian Journal of Forest Research**. v.26, p.120–27. 1996.

- NOLING, J. W.; BECKER, J. O.; The challenge of research and extension to define and implement alternatives to methyl bromide. *Suppl. Journal of Nematology*. v.26 (4S), p.573–586. 1994.
- NOLING, J. W.; DICKSON, D. W. The face of methyl bromide within Florida agriculture. *Citrus Vegetable Magazine*. 19–24. 1992.
- NÜSS, D. Outdoor experiments with monitor-systems: effects of acid rain, liming and heavy metals on decomposition and Collembola. *Zoologische Beitrage*. v.35, p.121–83. 1994.
- O'CONNOR, F. B. **The Enchytraeidae**. In: Burges A, Raw F (eds) *Soil biology*. Academic Press, London, pp 213–257. 1967.
- OECD. **Earthworm, acute toxicity tests**. Guideline for Testing Chemicals No. 207. Paris, France. 1984.
- OECD Draft Document. **OECD Guideline for the testing of chemicals. Proposals for a new guideline. Earthworm Reproduction Test (*Eisenia fetida/andrei*)**. pp. 1–17. 2000.
- OECD. **Enchytraeidae reproduction test**. Guideline for testing of chemicals No. 220. Paris, France. 2003.
- PERSSON, C.; JANSSON, H. B. Rhizosphere colonization and control of *Meloidogyne* spp. by nematode-trapping fungi. *Journal of Nematology*. v.31, p.164–171. 1999.
- REBECCHI, L.; SABATINI, M. A.; CAPPI, C.; GRAZIOSO, D.; VICARI, A.; DINELLI, G.; BERTDANI, R. Effects of a sulfonylurea herbicide on soil microarthropods. *Biology and Fertility Soils* v.30, p.312–7. 2000.
- RITZINGER, C. H. S. P.; FANCELLI, M. Manejo integrado de nematóides na cultura da bananeira. *Revista Brasileira de Fruticultura*., Jaboticabal - SP, v.28, n.2, p.331-338, Agosto 2006.
- RÖMBKE, J. Ecotoxicological laboratory tests with enchytraeids: A review. *Pedobiologia*, v.47, p. 607–616. 2003.
- RONDAY, R.; HOUXNW, H. Suitability of seven species of soil-inhabiting invertebrates for testing toxicity of pesticides in soil pore water. *Pedobiologia* v.40, p.106– 12. 1996.
- SABATINI, M. A.; INNOCENTI, G. Soilborne plant pathogenic fungi in relation to some collembolan species under laboratory conditions. *Mycological Research*. v.104, p.1197–201. 2000.
- SALMINEN, J.; HAIMI, J. Effects of pentachlorophenol on forest soil: a microcosm experiment for testing ecosystem responses to anthropogenic stress. *Biology Fertility Soils* v.23, p.182–188. 1996.
- SCHÖFER, R.; ACHAZI, R. K. The toxicity of soil samples containing TNT and other ammunition derived compounds in the enchytraeid and Collembola biotest. *Environmental Science Pollution Research*. v.6, p.213– 219. 1999.

- SJURSEN, H.; BAYLEY, M.; HOLMSTRUP, M. Enhanced drought tolerance of a soil-dwelling springtail by reacclimation to a mild drought stress. **Journal Insect Physiology**. v.47, p.1021–1027. 2001.
- SIDDIQUI, Z. A.; MAHMOOD, I. Biological control of plant parasitic nematodes by fungi: a review. **Bioresource Technology** v.58, p.229-239. 1996.
- SMIT, C. E.; VAN BEELEN, P.; VAN GESTEL, C. A. M. Development of zinc bioavailability and toxicity for the springtail *Folsomia candida* in an experimentally contaminated field plot. **Environmental Pollution**. v.98, p.73–80. 1997.
- SORBO, G. D.; MARZIANO, F.; D'ERRICO, F. P. Diffusion and effectiveness of the nematophagous fungus *Hirsutella rhossiliensis* in control of the cyst nematode *Heterodera daverti* under field conditions. **Journal Plant Pathology** v.85, p.219–221. 2003.
- SORRIBAS, F. J.; ORNAT, C.; GALEANO, M.; VERDEJO-LUCAS, S. Evaluation of a native and introduced isolate of *Pochonia chlamydosporia* against *Meloidogyne javanica*. **Biocontrol Science Technology**. v.13, p.707–714. 2003.
- STANDEN, V.; LATTE, P. M. Distribution of a population of *Cognettia sphagnetorum* (Enchytraeidae) in relation to microhabitats in a blanket bog. **Journal of Animal Ecology**. v.46, p.213–229. 1977.
- TORDOFF, G. M.; BODDY, L. T.; JONES, H. Species-specific impacts of collembola grazing on fungal foraging ecology. **Soil Biology Biochemistry** v.40 (2008) p.434–442. 2007.
- VAN GESTEL, C. A. M.; VAN DER WAARDE, J. J.; DERKSEN, J. G. M.; VAN DER HOEK, E. E.; VEUL, M. F. X. M. The use of acute and chronic bioassays to determine the ecological risk and bioremediation efficiency of oil-polluted soils. **Environmental Toxicology Chemistry**. v.20, p.1438–49. 2001.
- VARGA, J.; NAAR, Z.; DOBOLYI, C. Selective feeding of collembolan species *Tomocerus longicornis* (Mull.) and *Orchesella cincta* (L.) on moss inhabiting fungi. **Pedobiologia** v.46, p.526–538. 2002.
- VERHOEF, H. A.; PRAST, J. E.; VERWEIJ, R. A. Relative importance of fungi and algae in the diet and nitrogen nutrition of *Orchesella cincta* (L.) and *Tomocerus minor* (Lubbock) (Collembola). **Functional Ecology** v.2, p.195–201. 1988.
- VIGLIERCHIO, D. R. (Ed.). **The World of Nematodes: a fascinating component of the animal kingdom**. University of California: Davis, CA, 1991. 266p.
- VISSER, S. **Role of the soil invertebrates in determining the composition of soil microbial communities**. In: Fitter, A.H., Atkinson, D., Read, D.J., Usher, M.B. (Eds.), *Ecological Interactions in Soil. Plants, Microbes and Soil Animals*. Blackwell Scientific, Oxford, pp. 297–317. 1985.

WALKER, R. L.; BURNS, I. G.; MOORBY, J. Response of plant growth rate to nitrogen supply: a comparison of relative addition and N interruption treatments. **Journal of Experimental Botany** v.52, p.309-317. 2001.

WANG, K. H.; SIPES, B. S.; SCHMITT, D. P. Intercropping cover crops with pineapple for the management of *Rotylenchulus reniformis*. **Journal of Nematology**. v.35, p.39-47. 2003.

ZUCKERMAN, B. M.; DICKLOW, M. B.; COLES, G. C.; MARBAN-MENDOZA, N. Loss of virulence of the endoparasitic fungus *Drechmeria coniospora* in culture. **Journal of Nematology**. v.21, p.135-137. 1989.

5. ARTIGO C: INTERAÇÃO ENTRE *Folsomia candida*, *Enchytraeus crypticus* E *Meloidogyne paranaensis* EM RESPOSTA AO FUNGO *Paecilomyces lilacinus*.

5.1 Resumo

O fungo *Paecilomyces lilacinus* (Thom., 1910) Samson, 1974 é relatado como agente de biocontrole de nematóides e, com o interesse por práticas ecologicamente corretas, tem sido dada ênfase à estrutura da comunidade invertebrada do solo, visando identificar um manejo que possa otimizar atividades do ecossistema. Este trabalho objetivou avaliar em microcosmos a interação dos microrganismos bioindicadores do solo colêmbolo (*Folsomia candida* Willem, 1902) e enquitreídeo (*Enchytraeus crypticus* Westheide & Graefe, 1992) em conjunto com a aplicação do fungo *P. lilacinus* (UELpae 18) e o efeito causado no nematóide *Meloidogyne paranaensis* (Carneiro et al., 1996) na cultura do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Easypeel). O trabalho foi realizado na Universidade de Coimbra – Portugal, constando de 16 tratamentos, cada um com cinco réplicas utilizando todas as interações entre planta, colêmbolo, enquitreídeo, nematóide e fungo, em delineamento de blocos ao acaso. Recipientes de 1,5 L contendo 750g de solo artificial OCDE, foram utilizados segundo as normas do ISO. Plântulas de tomateiro com 30 dias de idade foram transplantadas e inoculadas com 5000 ovos de *M. paranaensis* por vaso. Foram utilizadas populações de 20 organismos de *Folsomia candida* e *Enchytraeus crypticus* por vaso de microcosmos, sincronizados segundo as normas do ISO. Após, foram aplicados 650 mg do isolado do fungo diluídas em 10 mL de água destilada por vaso. Os microcosmos foram fechados e, após 60 dias foram avaliadas características de desenvolvimento das plantas, população de *M. paranaensis* nas raízes, população de *F. candida* e *E. crypticus* no solo, e sobrevivência do fungo *P. lilacinus* no solo. Os resultados apontaram uma diminuição na altura de plantas e um aumento na massa das raízes das plantas de tomateiro quando na presença do nematóide. A interação fungo x colêmbolo x enquitreídeos mostrou influências variáveis nas características de desenvolvimento das plantas. Para maior altura de planta a interação de fungo e colêmbolos não foi dependente do enquitreídeo; e para massa de parte aérea e de raiz esta interação foi dependente do enquitreídeo para apresentar os maiores valores. Para reprodução do nematóide o fungo foi eficiente no controle da população com ou sem a presença dos organismos bioindicadores, e os bioindicadores sem a presença do fungo também diminuíram eficazmente a população de nematóides. A maior reprodução dos colêmbolos e dos enquitreídeos foi obtida na presença do fungo e este obteve alta sobrevivência na presença do nematóide.

Termos para indexação: Nematóides de galhas, Controle Biológico, Fungos Nematófagos, Bioindicadores do solo.

Abstract

The fungus *Paecilomyces lilacinus* (Thom., 1910) Samson, 1974 is reported as a biocontrol agent for nematodes, and with interest in environmentally friendly practices, emphasis has been given to the structure of soil invertebrate community, to identify a management able to optimize activities for ecosystem operation. This study evaluated in microcosm the interaction of bioindicators organisms of soil springtail (*Folsomia candida* Willem, 1902) and enchytraeid (*Enchytraeus crypticus* Westheide & Graefe, 1992) together with the application of the fungus *P. lilacinus* (UELpae 18) and the effect caused by the nematode *Meloidogyne*

paranaensis (Carneiro et al., 1996) in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Easypeel). The work was conducted at the University of Coimbra - PT, where 16 treatments were done, each with five replicates using all interactions between plants, springtails, enchytraeid, nematode and fungus, in a randomized design. Containers of 1.5 L were used containing 750g of OECD artificial soil, according to the ISO standards. Tomato seedlings with 30 days of age were transplanted and inoculated with 5.000 eggs of *M. paranaensis*. We used populations of 20 organisms of *Folsomia candida* and *Enchytraeus crypticus* per containers microcosms, synchronized according to the ISO standards. After 650 mg of fungal conidia isolate were applied diluted in 10 mL of distilled water per container. The microcosms were closed so that there was no loss of microorganisms and, after 60 days characteristics of tomato plant development were evaluated, the population of *M. paranaensis* on roots, the population of *F. candida* and *E. crypticus* in the soil, and survival of the fungus *P. lilacinus* in soil. The results showed a decrease in height and an increase in root mass of tomato plants in the presence of the nematode. The interaction springtail x fungus x enchytraeid showed variable influences on the characteristics of plant development. It was observed that for a greater plant height the interaction of the fungus and Collembola it was not dependent on the Enchytraeid; on the other hand the weight of shoot and root of this interaction was dependent on the Enchytraeid to present the greater results. For nematode reproduction the fungus was efficient in population control with or without the presence of bioindicators organisms, as the bioindicators without the presence of the fungus also effectively decreased the nematode population. Further reproduction of Collembola and Enchytraeid was obtained in the presence of the fungus and the fungus had a high survival in the presence of the nematode.

Index terms: Root-knot nematode, biological control, nematophagous fungi, Bioindicators of soil.

5.2 Introdução

Nematóides formadores de galhas (*Meloidogyne* spp.) estão entre os grupos de nematóides fitoparasitas que mais causam danos (8 a 20%) e perdas (87 bilhões de dólares) por ano nos campos das principais plantas cultivadas em todo o mundo (SASSER; FRECKMAN, 1987).

O controle destes nematóides tem sido realizado principalmente por nematicidas químicos, rotação de culturas (SASSER; JR. UZZELL, 1991; JOHNSON et al., 1997; REYNOLDS et al., 2000; PLOEG, 2002; KRATOCHVIL et al., 2004), cultivares resistentes quando disponíveis (WIDMER; ABAWI, 2000), cultura de cobertura, adubação verde, solarização, pousio e controle biológico (BARKER; KOENNING, 1998). No entanto, todo método de controle tem sucesso limitado, e a maioria que se aproxima de um método sustentável de controle de nematóide integra diversas ferramentas e estratégias para o manejo de pragas em um sistema agrícola sustentável (AKHTAR, 1997).

Com o crescimento das limitações do uso de nematicidas no manejo de nematóides, pois o controle químico é muito caro, não sustentável e afeta o agroecossistema negativamente (AHMAD; KHAN, 2004), vários agentes de biocontrole têm sido avaliados

para o manejo deste patógeno. Os fungos oportunistas têm mostrado resultados encorajadores no controle de nematóides formadores de galhas (LEIJ et al., 1993; KHAN; SAXENA, 1996, 1997; NAKAT et al., 1998; JONATHAN; RAJEDRAN, 2000; AHMAD; KHAN, 2004).

Paecilomyces lilacinus (Thom) Samson, 1974, um hifomiceto comum no solo com distribuição cosmopolita (DUBE; SMART, 1987), é um fungo oportunista que é usado em grande número de formulados nematicidas biológicos (DONG; ZHANG, 2006). Os fatores limitantes deste fungo são o inconstante desempenho no campo (LAY et al., 1982; DICKSON; MITCHELL, 1985; CARNEIRO; CAYROL, 1991; PERSSON; JANSSON, 1999; MEYER et al., 2001; SORRIBAS et al., 2003), a perda de virulência (LOHMANN et al., 1989; ZUCKERMAN et al., 1989; WANG et al., 2003) e baixa qualidade de controle na primeira aplicação (JENKINS; GRZYWACZ, 2000).

A eficiência do fungo *P. lilacinus*, como agente de controle biológico, tem sido testada em muitos países com resultados positivos para o parasitismo de estágios sedentários dos nematóides fitoparasitas (DAVID; ZORILLA, 1983; JATALA, 1986; KHAN; HUSSEIN, 1988, 1990). Um exemplo é o isolado 251 (PL251) que atualmente é comercializado e registrado para a venda como Bioact[®] WG para controle de nematóides em vários países (KIEWNICK, 2004; ATKINS et al., 2005). Além disso, PL251 recebeu recentemente o registro US Environment Protection Agency como nematicida biológico com o nome comercial Melocon[®] WG (EPA, 2005). Os resultados preliminares obtidos com a formulação de grânulos dispersíveis em água de PL251 (Bioact[®] WG) demonstraram o potencial de controle biológico de *M. incognita* em plantas de tomate, *Heterodera schachtii* em beterraba, bem como o nematóide *Radopholus similis* em banana, quando testado em condições de temperatura favorável para o biocontrole pelo fungo (KIEWNICK; SIKORA, 2003; KIEWNICK et al., 2004a, b).

No entanto, é preciso avaliar o efeito do fungo oportunista na penetração, no desenvolvimento e no ciclo de vida dos nematóides (ASHRAF; KHAN, 2005) que tem uma grande importância na estratégia de manejo de nematóides fitoparasitas, pois há um grande número de fungos que ocorrem naturalmente no solo e podem exercer influência nos microrganismos, inclusive nos nematóides (ANVER et al., 2001).

É preciso também se avaliar o efeito do fungo oportunista no ciclo de vida de organismos bioindicadores da qualidade de solo que estarão interagindo na microbiota do solo. Com a crescente demanda de tecnologias e produtos ecologicamente corretos, têm sido desenvolvidas várias estratégias de medição da qualidade ambiental e da sustentabilidade da exploração agropecuária. O uso de bioindicadores mostra-se promissor como indicadores

ambientais que respondem às perturbações ou mudanças ambientais; indicadores ecológicos que demonstram efeitos das mudanças ambientais como alterações de habitats, fragmentação, mudanças climáticas, poluição e outros fatores que geram impacto na biota; e, por último, indicadores de biodiversidade, que refletem índices de diversidade (MCGEOCH, 1998).

Por cerca de 20 anos, testes ecotoxicológicos padronizados do solo têm sido realizados. Na maioria destes métodos, usa-se invertebrados em solo artificial como substrato para os testes (OECD, 1984). Os produtos químicos são adicionados e avaliados nestes substratos em várias concentrações e seus efeitos aos organismos (minhocas, enquitreídeos, colêmbolos e ácaros predadores) são medidos. Neste experimento utilizou-se como organismos bioindicadores uma espécie de enquitreídeo (*Enchytraeus crypticus* Westheide & Graefe 1992; Oligochaeta) e uma espécie de colêmbolo (*Folsomia candida* Willem 1902; Collembola: Isotomidae).

Apesar do seu papel importante em muitos ecossistemas, os enquitreídeos foram negligenciados como organismos testes até cerca de 15 anos atrás (RÖMBKE, 2003). Com a descoberta de sua sensibilidade aos estresses antropogênicos, foram desenvolvidos estudos de testes de reprodução a campo e em laboratório com *Enchytraeus albidus* para avaliar os efeitos dos produtos químicos e analisar a qualidade do solo utilizando solo artificial (RÖMBKE; MOSER, 1999, 2002). *E. crypticus* é uma espécie que, devido ao seu rápido desenvolvimento, tem se tornado a espécie de escolha dos testes nos anos recentes (ACHAZI et al., 1997; KUPERMAN et al., 2003b). Este teste foi padronizado internacionalmente por ASTM (2004), ISO (2003a), e OECD (2003) e é similar ao teste de reprodução de minhoca e de colêmbolos (ISO 1998, 1999 a).

Os enquitreídeos pertencem à classe dos Clitellata, ordem dos Oligochaeta e ao filo dos Annelida. Fazem parte da mesofauna saprofítica da camada decompositora superficial do solo (JÄNSCH et al., 2005) e, por isso, são conhecidos por serem consumidores saprofíticos (O'CONNOR, 1967; BROCKMEYER et al., 1990; DIDDEN, 1993), mas há trabalhos que reportam que alguns enquitreídeos se alimentam de fungos (DASH; CRAGG, 1972; STANDEN; LATTE, 1977; DASH et al., 1980; HEDLUND; AUGUSTSSON, 1995) e de bactérias filamentosas (KRIŠTŮFEK et al., 1995). Jaffee et al. (1997) suspeitaram que *E. crypticus* afeta diretamente o fungo, e concluíram que este microrganismo pode interferir no controle biológico de nematóides fitoparasitas.

Folsomia candida é amplamente usada em estudos ecotoxicológicos (ISO, 1999a), pois possui um tempo de geração relativamente curto e reprodução partenogênica, o que faz a espécie apropriada para estudar indivíduos diferentes e parâmetros de populações

em um experimento único (CROMMENTUIJN et al., 1993). Já os colêmbolos são classificados como microsaprófagos decompositores (JÄNSCH et al., 2005), se alimentam de fungos (KLIRONOMOS et al., 1992; FILSER, 2002; FOUNTAIN; HOPKIN, 2005), mas podem igualmente se alimentar de nematóides (BROWN, 1954; GILMORE; POTTER, 1993; LEE; WIDDEN, 1996; HOPKIN, 1997). Read et al. (2006) reportaram que ácaros e colêmbolos foram capazes de reduzir o número de nematóides em laboratório e se alimentaram de espécies alvo de nematóides no campo.

Portanto, confrontando o ecossistema do solo e suas complexas interações das comunidades de espécies e seus processos biológicos, químicos e físicos associados, simplificados sistemas de laboratório foram construídos para preencher uma lacuna com a complicada situação do campo. Coletivamente, estes sistemas de laboratório são chamados de “microcosmos” e apesar das discussões sobre a confiabilidade desses sistemas (TAYLOR; PARKINSON, 1988), houve poucas tentativas de se chegar a alguma padronização (VAN STRAALLEN; VAN GESTEL, 1993).

Os fatores que conduzem às mudanças na dinâmica das populações dos nematóides no solo são pouco conhecidos. No entanto, os organismos *E. crypticus* e *F. candida* podem em conjunto com o fungo *P. lilacinus* reduzir a população do nematóide *M. paranaensis* em raízes de plantas de tomateiro em microcosmos, ou podem prejudicar a eficiência do parasitismo do fungo *P. lilacinus* aumentando assim a população do nematóide *M. paranaensis*. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito das interações dos organismos *Meloidogyne paranaensis*, *Paecilomyces lilacinus*, *Enchytraeus crypticus* e *Folsomia candida* em plantas de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.).

5.3 Material e Métodos

O trabalho foi realizado na Universidade de Coimbra – Portugal, Departamento de Zoologia, nas dependências do Instituto do Mar (IMAR).

Em princípio foi feita a preparação do solo artificial OCDE (FAIRBROTHER et al., 1999; OECD, 2000) com 5% de turfa, 21% de caolin, 75% de areia e 3,7 g CaCO₃ kg⁻¹ de solo artificial OCDE para ajuste do pH (entre 5,5-6,5), segundo as normas do ISO-11274 (1994). Logo após foi determinada a capacidade de retenção de água segundo as normas do ISO-11274 (1998).

O delineamento experimental foi em blocos casualizados em esquema fatorial 2x2x2x2, totalizando 16 tratamentos (Tabela 1) Recipientes de 1,5 L foram utilizados contendo 750 g de solo artificial, segundo as normas do ISO.

Tabela 1 – Tratamentos elaborados com 5 repetições cada.

Tratamento	
1	Planta
2	Planta + <i>M. paranaensis</i>
3	Planta + <i>F. candida</i>
4	Planta + <i>E. crypticus</i>
5	Planta + <i>M. paranaensis</i> + <i>F. candida</i>
6	Planta + <i>M. paranaensis</i> + <i>E. crypticus</i>
7	Planta + <i>F. candida</i> + <i>E. crypticus</i>
8	Planta + <i>P. lilacinus</i>
9	Planta + <i>P. lilacinus</i> + <i>M. paranaensis</i>
10	Planta + <i>P. lilacinus</i> + <i>E. crypticus</i>
11	Planta + <i>P. lilacinus</i> + <i>F. candida</i>
12	Planta + <i>P. lilacinus</i> + <i>M. paranaensis</i> + <i>F. candida</i> + <i>E. crypticus</i>
13	Planta + <i>P. lilacinus</i> + <i>M. paranaensis</i> + <i>E. crypticus</i>
14	Planta + <i>P. lilacinus</i> + <i>M. paranaensis</i> + <i>F. candida</i>
15	Planta + <i>M. paranaensis</i> + <i>F. candida</i> + <i>E. crypticus</i>
16	Planta + <i>P. lilacinus</i> + <i>F. candida</i> + <i>E. crypticus</i>

Um mês antes da montagem do experimento, sementes de tomateiro cultivar Easypeel foram germinadas em estufa e foram transplantadas em vasos contendo 50 g de solo OCDE e aos 30 dias foram transplantadas para o experimento.

Ao mesmo tempo foi realizada a sincronização das culturas de *Enchytraeus crypticus* e *F. candida* segundo as normas ISO-16387 (2003) e ISO-11267 (1999), respectivamente. Foram aplicados 20 organismos de *E. crypticus* e *F. candida* por vaso, no dia da montagem do experimento.

Para tanto, os nematóides foram multiplicados em plantas de tomateiro cultivar Easypeel e após 60 dias procedeu-se a extração dos ovos e eventuais juvenis das raízes pela técnica de extração descrita por Bonetti e Ferraz (1981). A suspensão foi ajustada para 1000 ovos e eventuais juvenis por mL e foram aplicados 5000 ovos e eventuais juvenis por repetição.

Após 3 dias foram aplicados 650 mg do fungo *P. lilacinus* (UELPae 18) em 10 mL de água destilada. Estes fungos foram previamente multiplicados em arroz, triturados e formulados na concentração de 10^8 esporos por grama pela empresa Ballagro-Agro Tecnologia. O isolado de *P. lilacinus* (UELpae 18) avaliado pertence à coleção de microrganismos do Laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual de Londrina, o

qual foi obtido em áreas de cultivo de cafeeiro na região de Londrina – PR. Este foi previamente selecionado quanto à capacidade de parasitar ovos de *M. paranaensis* “*in vitro*”, em diferentes temperaturas (CADIOLI et al., 2007) e a patogenicidade sobre *M. paranaensis* em cafeeiro em casa de vegetação (CADIOLI et al., 2009).

Os microcosmos foram fechados para que não houvesse perda dos microrganismos e foram colocados em estufa climatizada a 22° C com fotoperíodo de 12 por 12 horas claro e escuro e foram regados diariamente.

Após 60 dias as garrafas com as plantas foram cortadas, foram retiradas as raízes, e medida a altura da parte aérea e pesada a parte aérea e as raízes das plantas de tomateiro. Em seguida foi feita a extração dos ovos de nematóides pela técnica descrita por Bonetti e Ferraz (1981). A parte superior do solo foi dividida (250 g) e para o tratamento com colêmbolos este solo foi colocado no extrator na temperatura de 45° C, enquanto que para enquitreídeo foi adicionado álcool 80% + rosa de bengala 1%. Passada uma semana foram feitas as contagens dos dois organismos em microscópio estereoscópio.

Para avaliar a sobrevivência do fungo no solo foi feita a diluição seriada (10^{-3}) de cada repetição e foi plaqueada uma alíquota de 0,1 mL em meio semi-seletivo de aveia para *P. lilacinus* de Alves et al. (1998) modificado, com 20 g de farinha de aveia, 20 g de ágar, 230 mg de Baycor Plus (dodine 800 g kg⁻¹), 50 mg de solução de violeta genciana, 5 mg de Tetraciclina (Cloridrato de tetraciclina, 300 mg), em 1000 mL de água destilada. Passados 7 dias de incubação foi determinado o percentual de desenvolvimento das colônias nas placas. Outra amostra foi recolhida de cada repetição para ser medido o pH dos tratamentos ao final do experimento segundo as normas do ISO-11274 (1994).

Os dados obtidos tanto para as características de desenvolvimento das plantas quanto para o desenvolvimento dos organismos utilizados no experimento foram submetidos a análise de variância com desdobramento das interações entre os organismos para comparação das médias.

5.4 Resultados e Discussão

Os resultados para a altura das plantas, peso de parte aérea e de raiz das plantas de tomate mostraram-se variáveis, sendo que a altura das plantas teve dependência significativa do nematóide e da interação colêmbolo x fungo x enquitreídeo (Tabela 2). Quando foi avaliado o peso da parte aérea foi observada dependência significativa da interação colêmbolo x fungo x enquitreídeo e o peso de raiz foi influenciado pela interação do fungo x nematóide e colêmbolo x fungo x enquitreídeo.

Tabela 2 – Efeitos significativos das fontes de variação ($p \leq 0.05$) das Análises de Variância das características de desenvolvimento de plantas de Tomateiro.

Característica	Fonte de Variação	GL	Teste F (p. valor)
Altura de Planta CV = 22,91%	Nematóide	1	0,0000
	Colêmbolo x Fungo x Enquitreídeo	1	0,0515
	Fungo dentro (Colêmbolo 1 Enquitreídeo 0)	1	0,0001
	Enquitreídeo dentro (Colêmbolo 1 Fungo 1)	1	0,0126
Peso de Parte Aérea CV = 33,29%	Colêmbolo x Fungo x Enquitreídeo	1	0,0049
	Colêmbolo dentro (Fungo 1 Enquitreídeo 0)	1	0,0193
	Fungo dentro (Colêmbolo 1 Enquitreídeo 0)	1	0,0040
	Enquitreídeo dentro (Colêmbolo 1 Fungo 1)	1	0,0003
Peso de Raiz CV = 30,64%	Nematóide x Fungo	1	0,0001
	Nematóide dentro (Fungo 0)	1	0,0008
	Nematóide dentro (Fungo 1)	1	0,0145
	Fungo dentro (Nematóide 0)	1	0,0208
	Fungo dentro (Nematóide 1)	1	0,0005
	Colêmbolo x Fungo x Enquitreídeo	1	0,0004
	Colêmbolo dentro (Fungo 1 Enquitreídeo 0)	1	0,0002
	Fungo dentro (Colêmbolo 1 Enquitreídeo 0)	1	0,0001
Enquitreídeo dentro (Colêmbolo 1 Fungo 1)	1	0,0001	

Na presença do nematóide *M. paranaensis* a altura das plantas de tomateiro foi estatisticamente inferior (18,47 cm) do que na ausência do nematóide (23,14 cm), independente da presença ou ausência dos organismos bioindicadores *F. candida* e *E. crypticus* ou mesmo do fungo nematófago *P. lilacinus*, ou seja, o nematóide influenciou negativamente no crescimento das plantas de tomateiro. Este resultado corrobora com os obtidos por Ferraz e Monteiro (1995) que relataram que o tamanho desigual de plantas, a murcha nas horas mais quentes do dia, as folhas e frutos de menor tamanho, o nanismo e, conseqüentemente, a redução de produção são sintomas típicos do ataque dos nematóides. Segundo estes mesmos autores, no caso dos nematóides formadores de galhas, em função do comprometimento do sistema radicular pela formação de células gigantes, hiperplasia e hipertrofia (sintomas histológicos) de células, pode haver uma exibição exagerada de deficiências nutricionais que se refletem na parte aérea, levando a planta a um declínio vagaroso.

Quando o fungo estava presente, a altura de plantas foi maior (25,08 cm) do que na sua ausência (16,07 cm), isto quando o colêmbolo estava presente e o enquitreídeo ausente. Na presença do enquitreídeo a altura de planta foi maior (21,54 cm) do que na sua ausência (16,07 cm) quando o colêmbolo e o fungo estavam presentes, ou seja, independente da presença ou ausência de *E. crypticus*, quando estavam presentes em conjunto *F. candida* e *P. lilacinus* houve um aumento significativo da altura das plantas de tomateiro.

Para a massa da parte aérea das plantas de tomateiro foi observado que na presença de colêmbolo a massa da parte aérea foi estatisticamente inferior (2,45 g) do que na sua ausência (3,81 g), quando o fungo estava presente e o enquitreídeo estava ausente. Na presença do fungo, a massa da parte aérea foi menor (2,45 g) do que na sua ausência (4,14 g) quando em conjunto com colêmbolos e na ausência dos enquitreídeos. Na presença do enquitreídeo, a massa da parte aérea foi superior (4,64 g) do que em sua ausência (2,45 g) quando na presença de colêmbolo e fungo. Estes resultados mostraram-se inversos aos resultados para altura das plantas de tomateiro, pois a presença do fungo e dos colêmbolos diminuiu significativamente a massa da parte aérea e apenas quando estavam em conjunto com *E. crypticus* tiveram um aumento significativo da massa da parte aérea, mostrando-se dependentes deste organismo.

Para a variável massa da raiz das plantas de tomateiro, na presença do nematóide foi estatisticamente maior do que na sua ausência, quando o fungo estava ausente, e menor na sua presença. Na presença do fungo a massa da raiz foi estatisticamente inferior (1,53 g) do que na sua ausência (2,17 g) quando o nematóide estava presente e estatisticamente inferior (1,97 vs 1,55 g) na sua ausência. Isto indica que na raiz em que foi inoculado o nematóide e não foi aplicado o fungo obteve-se um maior peso. Segundo Hutangura et al. (1999), o aumento de massa de raízes infectadas por nematóides é consequência do efeito combinado da emissão de novas raízes secundárias nos locais de infecção do nematóide e formação de galhas. Estas variações encontradas para as características de desenvolvimento das plantas em relação à presença do nematóide formador de galhas também foram encontradas em trabalhos desenvolvidos por Santiago et al. (2006) e Cadioli et al. (2009).

Na presença do colêmbolo, a massa das raízes foi inferior (1,09 g) ao que era na sua ausência (2,07 g) quando na presença do fungo e ausência de enquitreídeo. Na presença do fungo, a massa da raiz foi inferior (1,09 g) ao que era na sua ausência (2,09 g) quando na presença do colêmbolo e na ausência de enquitreídeo. Na presença do enquitreídeo, a massa das raízes foi superior (2,15 g) ao que era na ausência (1,09 g) do que quando na presença de colêmbolo e fungo. Isto indica que, igualmente para a massa de parte aérea o bioindicador enquitreídeo, de alguma forma, ajudou a aumentar a massa das raízes. Resultado divergente foi relatado por Jaffee et al. (1997), os quais citaram que igualmente ao número de nematóides, o efeito de *E. crypticus* no crescimento das raízes foi indireto, as raízes foram atrofiadas quando os enquitreídeos interferiram no controle biológico dos nematóides formadores de galhas.

Estes resultados corroboram Andrade (1999), que afirma que o ambiente ao redor das raízes representa uma região de intensa atividade microbiana, onde as interações microrganismo-microrganismo e microrganismo-planta são evidentes e extremamente complexas.

A reprodução dos nematóides ao final de sessenta dias teve influência significativa da interação colêmbolo x fungo x enquitreídeos, em que a reprodução dos colêmbolos foi dependente da interação do nematóide x fungo, do nematóide x enquitreídeo e do fungo x enquitreídeo (Tabela 3). Já a reprodução dos enquitreídeos sofreu influência da interação nematóide x fungo e a sobrevivência do fungo foi influenciada pela interação nematóide x enquitreídeo.

Todos os tratamentos que continham *M. paranaensis* obtiveram o índice de galhas mais elevado segundo a escala de Taylor e Sasser (1978) e massas de ovos por sistema radicular (dados não apresentados na tabela por não diferirem estatisticamente entre si). Isto significa que houve penetração dos juvenis nas raízes, com formação de galhas e massas de ovos, porém o número de ovos por massas de ovos destes tratamentos foram significativamente menores (Tabela 3).

Para reprodução de nematóides foi observado que na presença do colêmbolo a reprodução de nematóide foi inferior (1.306 nematóides) do que na sua ausência (33.152 nematóides) quando na ausência do fungo e presença do enquitreídeo. Estes resultados indicam que os organismos bioindicadores de qualidade do solo reduziram a população final de nematóides, mostrando potencial para agentes de controle biológico. Huhta et al. (1998) em um estudo desenvolvido em laboratório, observaram que *F. candida* consumiu nematóides, mas citaram que não estava claro se os nematóides são importantes componentes da dieta dos colêmbolos. No entanto, Read et al. (2006) com o uso de PCR para detectar a predação de nematóides por microartrópodes, ácaros e colêmbolos no laboratório e no campo confirmaram a hipótese de que os ácaros e os colêmbolos são predadores significantes de nematóides, capazes de reduzir a sua densidade populacional. Também, Wilson e Gaugler (2004) encontraram correlação positiva entre a taxa de declínio da população de nematóides no solo e a abundância de ácaros e colêmbolos, corroborando os resultados do presente estudo.

Tabela 3 – Efeitos das fontes de variação ($p \leq 0.05$) sobre os resultados da Análise de Variância do efeito de *Paecilomyces lilacinus* na população de *Meloidogyne paranaensis*, *Enchytraeus crypticus* e *Folsomia candida* em microcosmo e sobrevivência de *P. lilacinus* no solo ao final do experimento em tomateiro.

Característica	Fonte de Variação	GL	Teste F (p. valor)
Reprodução do Nematóide CV = 46,63%	Colêmbolo x Fungo x Enquitreídeo	1	0,0006
	Colêmbolo dentro (Fungo 0 Enquitreídeo 1)	1	0,0000
	Fungo dentro (Colêmbolo 0 Enquitreídeo 0)	1	0,0142
	Fungo dentro (Colêmbolo 0 Enquitreídeo 1)	1	0,0000
	Fungo dentro (Colêmbolo 1 Enquitreídeo 0)	1	0,0004
	Enquitreídeo dentro (Colêmbolo 0 Fungo 0)	1	0,0008
Reprodução do Colêmbolo CV = 70,99%	Nematóide x Fungo	1	0,0077
	Nematóide dentro (Fungo 1)	1	0,0000
	Fungo dentro (Nematóide 0)	1	0,0000
	Nematóide x Enquitreídeo	1	0,0124
	Nematóide dentro (Enquitreídeo 0)	1	0,0000
	Enquitreídeo dentro (Nematóide 0)	1	0,0000
	Fungo x Enquitreídeo	1	0,0143
	Fungo dentro (Enquitreídeo 0)	1	0,0000
	Enquitreídeo dentro (Fungo 1)	1	0,0000
Reprodução do Enquitreídeo CV = 66,19%	Nematóide x Fungo	1	0,0247
	Nematóide dentro (Fungo 1)	1	0,0013
	Fungo dentro (Nematóide 0)	1	0,0000
	Fungo dentro (Nematóide 1)	1	0,0074
Sobrevivência do Fungo CV = 50,67%	Nematóide x Enquitreídeo	1	0,0020
	Nematóide dentro (Enquitreídeo 1)	1	0,0003
	Enquitreídeo dentro (Nematóide 1)	1	0,0002

Porém, na presença do enquitreídeo, a reprodução de nematóide foi superior (33.152 nematóides) do que na sua ausência (18.176 nematóides) quando na ausência de colêmbolo e fungo. Isto indica que de alguma forma os enquitreídeos influenciaram negativamente no controle biológico de nematóides de galhas quando sozinhos no solo. Jaffee et al. (1997) observaram que *E. crypticus* não reduziram o número de nematóides, pelo contrário, houve indicações de aumento da penetração dos nematóides nas raízes quando um número pequeno de enquitreídeos foi adicionado. Se este efeito é real, no entanto, pode ter sido um efeito indireto em que os enquitreídeos alteram a porosidade do solo (DIDDEN, 1990) e aumentam o movimento do nematóide pelo solo. McInnis e Jaffee (1989) relataram que por causa do tamanho relativamente grande e pela mobilidade, os enquitreídeos podem mecanicamente danificar o fungo *H. rhossiliensis*, removendo os conídios e reduzindo a adesão nos nematóides.

Na presença do fungo a reprodução do nematóide foi inferior (7.696 nematóides) quando na sua ausência (18.176 nematóides) e na ausência de colêmbolos e enquitreídeos. Também na presença do fungo a reprodução de nematóide foi inferior (4.512

nematóides) do que na ausência (33.152 nematóides), na ausência do colêmbolo, mas presença de enquitreídeo. E na presença do fungo a reprodução do nematóide foi inferior (3.616 nematóides) do que na ausência (19.536 nematóides) quando na presença de colêmbolo e ausência de enquitreídeo. Ou seja, independentemente da presença ou ausência dos organismos bioindicadores em conjunto com o fungo, houve redução da população de nematóides pelo fungo nematófago *P. lilacinus*.

Há vários trabalhos que relatam a eficiência do fungo *P. lilacinus* na supressão da população de nematóides fitoparasitas (CADIOLI et al., 2009). Lara et al. (1996) demonstraram que *P. lilacinus* reduziu significativamente *M. incognita* do solo, das populações da raiz e aumentou o rendimento do tomateiro. Na mesma cultura Siddiqui et al. (2000) relataram a redução da infecção de *M. javanica* quando Ahmad e Khan (2004) indicaram que o fungo *P. lilacinus* eficazmente parasitou fêmeas, massas de ovos e ovos de *M. incognita* em pimenta, afetando assim a multiplicação da geração posterior do nematóide. Holland et al. (1999) provou que ovos em todos os estágios, incluindo aqueles que contêm juvenis não eclodidos, foram infectados por um isolado de *P. lilacinus*. Assim, o fungo primeiramente coloniza ovos mas não juvenis, os quais podem penetrar e se desenvolver dentro do tecido da raiz (Jatala, 1986), confirmando o resultado obtido neste trabalho com a observação do alto índice de galhas em todos os tratamentos em que o nematóide foi inoculado.

Schenk (2004) demonstrou o controle de nematóides de galhas em tomate e pepino, e o aumento da produção de frutos em condições de campo com a aplicação de um produto comercial formulado com conídios de *P. lilacinus* aplicado em pré-plantio, combinado com a aplicação no substrato das mudas e uma segunda aplicação após 6 semanas do plantio. E Cabanillas e Barker (1989) e Kiewnick e Sikora (2006) relataram que um bom nível de controle de nematóides foi conseguido tanto pela aplicação do isolado peruano de *P. lilacinus* dez dias antes do transplantio de tomate quanto do isolado PL251 seis dias antes do transplantio das mudas.

Para reprodução de colêmbolos, na presença de nematóide a reprodução foi inferior (21,2 colêmbolos) do que na ausência (71,2 colêmbolos) quando na presença do fungo. Na presença do fungo a reprodução dos colêmbolos foi superior (71,2 colêmbolos) do que na ausência (19,4 colêmbolos) quando na ausência de nematóide. Ou seja, o fungo *P. lilacinus* aumentou a reprodução de *F. candida* quando se apresentou sozinho.

Na presença de nematóide, a reprodução dos colêmbolos foi inferior (19,5 colêmbolos) do que na ausência (68,2 colêmbolos) quando na presença de enquitreídeos. Na

presença de enquitreídeos, a reprodução dos colêmbolos foi inferior (22,4 colêmbolos) do que na ausência (68,2 colêmbolos) quando na ausência de nematóides. Isto indica que o enquitreídeo e o nematóide afetaram de forma negativa a reprodução dos colêmbolos.

Na presença do fungo a reprodução dos colêmbolos foi superior (68,9 colêmbolos) do que na ausência (18,8 colêmbolos) quando na ausência de enquitreídeos. Na presença do fungo a reprodução dos colêmbolos foi inferior (23,5 colêmbolos) do que na ausência (68,9 colêmbolos) quando na presença de enquitreídeos. Ou seja, novamente o fungo *P. lilacinus* aumentou a reprodução de *F. candida* quando se apresentou sozinho, pois como os enquitreídeos também se alimentam de fungos, pode ter havido competição entre os dois organismos bioindicadores.

Broza et al. (2001) e Sjursen et al. (2001) relataram que *F. candida* consome e inativa fungos entomopatogênicos aplicados como pesticidas biológicos sem sofrer mortalidade, distúrbio reprodutivo, ou qualquer outro efeito prejudicial. Experimentos de laboratório com *F. candida* em microcosmos mostrou que alguns fungos são mais nutritivos que outros. Contudo, é difícil verificar as razões para esta diferença, podendo ser relacionadas ao teor de proteína (DRAHEIM; LARINK, 1995) ou à inibição do crescimento por agentes químicos que prejudicam a alimentação (HOPKIN, 1997).

A qualidade do substrato alimentar fúngico pode influenciar no crescimento dos colêmbolos (HOGERVORST et al., 2003) e reprodução (KLIRONOMOS et al., 1999), alterando o tamanho da população e assim afetando o futuro da intensidade de alimentação. A maioria dos colêmbolos se alimenta de hifas fúngicas e *F. candida* não é uma exceção, exibindo uma forte preferência para certas espécies (HOPKIN, 1997). Em microcosmos no laboratório, *F. candida* prefere fungos em crescimento na superfície de material orgânico em decomposição do que em partículas de solo (BRIONES, et al., 1999), e dada a escolha, preferiu consumir o fungo saprofítico *Alternaria alternata* que um fungo micorrízico arbuscular (FMA) (KLIRONOMOS; MOUTOGLIS, 1999). Também Sabatini e Innocenti (2000), estudando quatro espécies de fungos patogênicos, observaram que o micélio de três das espécies foi adequado para a nutrição e reprodução de *F. candida*.

Para reprodução de enquitreídeo pode ser notado na tabela 3 que na presença de nematóide a reprodução de enquitreídeo foi inferior (68,7 enquitreídeos) do que na sua ausência (131,3 enquitreídeos) quando na presença do fungo. Porém, na presença do fungo a reprodução de enquitreídeos foi superior (131,3 enquitreídeos) do que na sua ausência (21,5 enquitreídeos) quando na ausência de nematóide. Na presença do fungo a reprodução de enquitreídeos foi superior (68,7 enquitreídeos) do que na sua ausência (18 enquitreídeos)

quando na presença de nematóide. Ou seja, independente da presença do nematóide, quando estava presente o fungo *P. lilacinus* no solo o enquitreídeo obteve uma reprodução significativamente maior. Resultado similar foi obtido por Jaffee et al. (1997), que relataram o aumento no número de *E. crypticus* quando foram adicionados os peletes com hifas do solo, indicando que os enquitreídeos não somente ingeriram como também digeriram o fungo.

A sobrevivência do fungo na presença de nematóides foi superior (20,75 %) do que na sua ausência (9,25 %) quando na ausência de enquitreídeos. Na presença de enquitreídeos a sobrevivência do fungo foi inferior (9 %) do que na sua ausência (20,75 %) quando na presença de nematóide. Tal fato indica que a presença de *E. crypticus* influenciou negativamente a sobrevivência do fungo nematófago. Já na presença do nematóide houve uma sobrevivência significativamente maior, resposta positiva para um agente promissor de controle biológico. Jaffee et al. (1997) relataram a hipótese de que a exclusão dos enquitreídeos do campo aumentou o estabelecimento do fungo nematófago.

Anver et al. (2001) relataram que *P. lilacinus* é capaz de não somente colonizar e destruir órgãos de fêmeas reprodutivas, ovos e cistos de nematóides mas é também é um bom competidor entre os microrganismos do solo, crescendo facilmente em substâncias orgânicas na ausência de um hospedeiro natural (por exemplo o nematóide). Assim, poderá haver primeiro uma multiplicação em substratos orgânicos antes de atacar os nematóides. Além disso, este fungo não depende da interação com a rizosfera da planta hospedeira como um fator para o controle biológico (KIEWNICK et al., 2004a). Portanto, ele pode ser aplicado sem a planta hospedeira no campo e no momento em que as temperaturas do solo são favoráveis para o fungo reduzir o inóculo de nematóides. Assim, a aplicação do fungo *P. lilacinus* no solo quando forem plantadas culturas não hospedeiras de nematóides de galhas pode ser uma estratégia alternativa para reduzir a infestação desta praga (KIEWNICK; SIKORA, 2006).

Anastasiadis et al. (2008) relataram o isolamento de *P. lilacinus* do solo após 3 meses da sua aplicação, isto indicou que o fungo sobreviveu durante todo período e foi compatível com as práticas agrônômicas e condições ambientais de agricultura intensiva em estufas.

Resultados conflitantes foram encontrados por Bengtsson e Rundgren (1983) que citaram que os colêmbolos, em densidades moderadas, estimularam frequentemente o crescimento fúngico, enquanto Visser (1985), Verhoef et al (1988) e Hanlon e Anderson (1979) complementaram, respectivamente, que estimulam o crescimento fúngico através da remoção de hifas senescentes, da criação da associação de um nutriente lábil com a

produção de urina, e de fezes. Varga et al (2002) relataram que a alimentação seletiva dos colêmbolos pode afetar a abundância de espécies fúngicas.

Contudo, o biocontrole do nematóide de galha ainda não chegou ao status de ser um tratamento para ser aplicado sozinho (GIANNAKOU et al., 2004). A combinação de várias medidas sustentáveis para o meio ambiente, tais como incorporação de adubo verde, plantio direto, plantas resistentes, plantas antagonistas, dentre outras, é viável para que se consiga o equilíbrio do agroecossistema do campo.

5.5 Conclusões

O fungo *Paecilomyces lilacinus* (UELPae 18) reduziu a população de *Meloidogyne paranaensis* em plantas de tomateiro.

Os organismos bioindicadores de qualidade de solo *Folsomia candida* e *Enchytraeus crypticus* mostraram-se potenciais agentes de controle biológico do nematóide *Meloidogyne paranaensis*.

A interação dos organismos (*Paecilomyces lilacinus*, *Folsomia candida* e *Enchytraeus crypticus*) diminuiu a população de *Meloidogyne paranaensis* em plantas de tomateiro em microcosmos.

O fungo *Paecilomyces lilacinus* aumentou a reprodução dos organismos bioindicadores do solo *Folsomia candida* e *Enchytraeus crypticus*.

5.6 Agradecimentos

À Professora Doutora Elke Jurandy Bran Nogueira Cardoso, ao Professor Doutor Marco Antonio Nogueira e ao Pós-Graduando Alexandre Martin Martinês. Ao representante da região Beira Litoral de Portugal da Bayer CropScience, Mario Santiago. Este trabalho foi financiado pelo vínculo de cooperação internacional CAPES/GRICES.

5.7 Referências Bibliográficas

ACHAZI, R. K.; CHROSZCZ, G.; MIERKE, W. Standardisation of test methods with terrestrial invertebrates for assessing remediation procedures for contaminated soils. **Eco-Infoma** 1997 p.284–289. 1997.

AHMAD, S. F.; KHAN, T. A. Management of *Meloidogyne incognita*, by integration of *Paecilomyces lilacinus* with organic materials in Chilli. **Archives Phytopathology and Plant Protection** v.37, p.35 – 40. 2004.

- AKHTAR, M. Current options in integrated management of plant-parasitic nematodes. **Integrated Pest Management Review**. v.2, p.187–197. 1997.
- ALVES, S. B.; ALMEIDA, J. E. M. de; MOINO JÚNIOR, A.; ALVES, L. F. A. Técnicas de laboratório. In: ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 637-711, 1163 p.
- ANASTASIADIS, I. A.; GIANNAKOU, I. O.; PROPHETOU-ATHANASIADOU, D. A.; GOWENA, S. R. The combined effect of the application of a biocontrol agent *Paecilomyces lilacinus* with various practices for the control of root-knot nematodes. **Crop Protection** v.27 p. 352–361. 2008
- ANDRADE, G. **Interacciones microbianas en la rizosfera**. In: SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S.; LOPES, A. S.; GUILHERME, L. R. G.; FAQUIN, V.; FURTINI NETO, A. E.; CARVALHO, J. G. (Ed.). Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas: Soil fertility, soil biology, and plant nutrition interrelationships. Viçosa: SBCS, Lavras: UFLA/DCS, 1999. p. 551 - 575.
- ANVER, S.; KHAN, A. A.; ALAM, M. M. Integrated Management of Root-knot and Reniform Nematodes with Neem Cake and Biological Fungus *Paecilomyces lilacinus* on Chickpea and Pigeonpea. **Arch. Phytoph. Pflanz.**, v.34, p.255-264, 2001.
- ASHRAF, M. S.; KHAN, T. A. Effect of opportunistic fungi on the life cycle of the root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*) on brinjal. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**. v.38, n.3, p.227 – 233. August 2005.
- ASTM. 2004. **Standard guide for conducting laboratory soil toxicity of bioaccumulation tests with the lumbricid earthworm *Eisenia fetida* and the enchytraeid potworm *Enchytraeus albidus***. ASTM Guideline No. E 1676–97.
- ATKINS, S. D.; CLARK, I. M.; PANDE, S.; HIRSCH, P. R.; KERRY, B. R. The use of real-time PCR and species-specific primers for the identification and monitoring of *Paecilomyces lilacinus*. **FEMS Microbiology Ecology** v.51, p.257-264. 2005.
- BARKER, K. R.; KOENNING, S. R. Developing sustainable systems for nematode management. **Annual Review Phytopathology**. v.36, p.165–205. 1998.
- BENGTSSON, G.; RUNDGREN, S. Respiration and growth of a fungus, *Mortierella isabellina*, in response to grazing by *Onychiurus armatus* (Collembola). **Soil Biology & Biochemistry** v.15, p.469–473. 1983.
- BONETTI, J. I. S.; FERRAZ, S. Modificação do método de Hussey & Barker para a extração de ovos de *Meloidogyne exigua* em cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v.6, p. 553, 1981.
- BRIONES, M. J. I.; INESON, P.; SLEEP, D. Use of delta 13C to determine food selection in collembolan species. **Soil Biology Biochemistry**. v.31, p.937–40. 1999.

- BROCKMEYER, V.; SCHMIDT, R.; WESTHEIDE, W. Quantitative investigations of the food of two terrestrial enchytraeid species (Oligochaeta). **Pedobiologia** v.34, p.151–156. 1990.
- BROWN, W. L. Collembola feeding upon nematodes. **Ecology**, v.35, p.421. 1954.
- BROZA, M.; PEREIRA, R. M.; STIMAC, J. L. The nonsusceptibility of soil Collembola to insect pathogens and their potential as scavengers of microbial pesticides. **Pedobiologia** v.45, p.523–34. 2001.
- CABANILLAS, E.; BARKER, K. R. Impact of *Paecilomyces lilacinus* inoculum level and application time on control of *Meloidogyne incognita* on tomato, **Journal of Nematology**. v.21, p. 115–120. 1989.
- CADIOLI, M. C.; SANTIAGO, D. C.; HOSHINO, A. D.; HOMECHIN, M. Crescimento micelial e parasitismo de *Paecilomyces lilacinus* sobre ovos de *Meloidogyne paranaensis* em diferentes temperaturas “*in vitro*”. **Ciência Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 2, p. 305-311, mar./abr., 2007.
- CADIOLI, M. C.; SANTIAGO, D. C.; OLIVEIRA, A. D.; PAES, V. DOS S.; ARIEIRA, G.O.; BAIDA, F. C. Efeito de isolados de *Paecilomyces lilacinus* no desenvolvimento de cafezais e na população de *Meloidogyne paranaensis*. **Ciência agrotecnologia**. Lavras, v. 33, n. 3, p. 713-720, maio/jun., 2009.
- CARNEIRO, R. M. D. G.; CAYROL, J. C. Relationship between inoculum density of the nematophagous fungus *Paecilomyces lilacinus* and control of *Meloidogyne arenaria* on tomato. **Revue Nematol** v.14, p.629–634. 1991.
- CROMMENTUIJN, T.; BRILIS, J.; VAN STRAALLEN, N. M. Influence of cadmium on life-history characteristics of *Folsomia candida* (Willem) in an artificial soil substrate. **Ecotoxicological Environmental Safety**. v.26, p. 216–227. 1993.
- DASH, M. C.; CRAGG, J. B. Selection of microfungi by Enchytraeidae (Oligochaeta) and other members of the soil fauna. **Pedobiologia** v.12, p.282–286. 1972.
- DASH, M. C.; NANDA, B.; BEHERA, N. Fungal feeding by Enchytraeidae (Oligochaeta) in a tropical woodland in Orissa, India. **Oikos** v.34, p.202–205. 1980.
- DAVID, R. G.; ZORILLA, R. A. Evaluation of a fungus *Paecilomyces lilacinus* (Thom.) Samson, for the biological control of potato cyst nematode *Globodera rostochiensis* woll. As compared with some nematicides. **Phillipine Agriculturist**, v.66, p.397–404. 1983.
- DIDDEN, W. A. M. Ecology of terrestrial Enchytraeidae. **Pedobiologia** v.37, p.2–29. 1993.
- DIDDEN, W. A. M. Involvement of Enchytraeidae (Oligochaeta) in soil structure evolution in agricultural fields. **Biology and Fertility Soils** v.9, p.152–158. 1990
- DICKSON, D. W, MITCHELL, D. J. Evaluation of *Paecilomyces lilacinus* as a biocontrol agent of *Meloidogyne javanica* on tobacco. **Journal of Nematology** v.17, p.519. 1985.

- DONG, L. Q.; ZHANG, K. Q. Microbial Control of Plant-parasitic nematodes: a five-party interaction. **Plant Soil**. v.288, p.31-45. 2006.
- DRAHEIM, R.; LARINK, O. Effects of differently cultured fungi as a diet of Collembola. **Acta Zoologica Fennica**. v.196, p.168–170. 1995.
- DUBE, B.; SMART, G. C. Biological control of *Meloidogyne incognita* by *Paecilomyces lilacinus* and *Pasteuria penetrans*. **Journal of Nematology**. v.19, p.222–227. 1987.
- ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). *Paecilomyces lilacinus* strain 251; exemption from the requirement of a tolerance. **United States Federal Register** v.70, p.19278-19283. 2005.
- FAIRBROTHER, A.; GLAZEBROOK, P. W.; VAN STRAALLEN, N.; TARAZONA, J. V. **Test methods for hazard determination of metals and sparingly soluble metal compounds in soils:summary of SETAC Pellston workshop**. In A. Fairbrother (ed.). A Publication of SETAC. San Lorenzo de EL Escorial, Spain. 1999.
- FERRAZ, C. C. B.; MONTEIRO, A. R. Nematóides. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Eds.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v.1, p.168-201.
- FILSER, J. The role of Collembola in carbon and nitrogen cycling in soil. **Pedobiologia**, v.46, p.234–245. 2002.
- FOUNTAIN, M. T.; HOPKIN, S. P. *Folsomia candida* (Collembola): a ‘standard’ soil arthropod. **Annual Review of Entomology**, v.50, p.201–222. 2005.
- GIANNAKOU, I. O.; KARPOUZAS, D. G.; PROPHETOUATHANASIADOU, D. A novel non-chemical nematicide for the control of root-knot nematodes. **Applied Soil Ecology** v.26, p.69-79. 2004.
- GILMORE, S. K.; POTTER, D. A Potential role of Collembola as biotic mortality agents for entomopathogenic nematodes. **Pedobiologia**, v.37, p.30–38. 1993.
- HANLON, R. D. G.; ANDERSON, J. M. The effects of Collembola grazing on microbial activity in decomposing leaf litter. **Oecologia** v.38, p. 93–99. 1979.
- HEDLUND, K.; AUGUSTSSON, A. Effects of enchytraeid grazing on fungal growth and respiration. **Soil Biology Biochemistry**. v.27, p.905–909. 1995.
- HOGERVORST, R. F.; DIJKHUIS, M. A. J.; VAN DER SCHAAR, M. A.; BERG, M. P.; VERHOEF, H. A. Indications for the tracking of elevated nitrogen levels through the fungal route in a soil food web. **Environmental Pollution** v.126, p.257–266. 2003.
- HOLLAND, R. J.; WILLIAMS, K. L.; KHAN, A. Infection of *Meloidogyne javanica* by *Paecilomyces lilacinus*. **Nematology** v.1, p.131-139. 1999.
- HOPKIN, S. P. **Biology of springtails. Insecta: Collembola**. Oxford University Press, Oxford, UK. pp. 330. 1997.

HUHTA, E.; JOKIMAKI, J.; HELLE, P. Predation on artificial nests in a forest dominated landscape the effects of nest type, patch size and edge structure. **Ecography** v.21, p.464–471. 1998.

HUTANGURA, P.; MATHESIUS, U.; JONES, M. G. K.; ROLFE B. G. Auxin induction is a trigger for root gall formation caused by root-knot nematodes in white clover and is associated with the activation of the flavonoid pathway. **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v.26, p.221-231, 1999.

ISO. **Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). - Part 1: Determination of acute toxicity using artificial soil substrate.** ISO 11268-1, 1993.

ISO. 1994. **Soil Quality – Determination of pH.** ISO 10390.

ISO. **Soil quality - Inhibition of reproduction of Collembola (*Folsomia candida*) by soil pollutants.** ISO 11267, 1999.

ISO. **Soil Quality – Effects of pollutants on *Enchytraeidae* (*Enchytraeus* sp.) – Determination of effects on reproduction and survival.** ISO 16387, 2003.

ISO. **Soil Quality – Determination of pH.** ISO 10390, 1994.

ISO. **Soil Quality - Determination of the water retention characteristic. Laboratory Methods.** ISO 11274, 1998.

ISO. **Soil Quality — inhibition of reproduction of Collembola (*Folsomia candida*) by soil pollutants.** ISO, Geneva, Switzerland. No. 11267. 1999a.

ISO. **Soil quality — effects of pollutants on *Enchytraeidae* (*Enchytraeus* sp.). Determination of effects on reproduction.** ISO, Geneva, Switzerland. No. 16387. 2003a.

JAFFEE, B. A., MULDOON, A. E., DIDDEN, W. A. M. Enchytraeids and nematophagous fungi in soil microcosms. **Biology and Fertility of Soils**. v.25, p.382:388. 1997.

JÄNSCH, S.; AMORIM, M. J.; RÖMBKE, J. Identification of the ecological requirements of important terrestrial ecotoxicological test species. **Environmental Review**. v.13, p.51-83. 2005.

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

JENKINS, N. E.; GRZYWACZ, D. Quality control of fungal and viral biocontrol agents- assurance of product performance. **Biocontrol Sci Technol**. v. 10, p.753–777. 2000.

JONATHAN, E. I.; RAJENDRAN, G. Biocontrol potential of the parasitic fungus *Paecilomyces lilacinus* against root-knot nematode *Meloidogyne incognita* in banana. **Journal Biological Control** v.14, p.67 – 69. 2000.

JOHNSON, A. W.; BURTON, G. W.; SUMNER, D. R.; HANDOO, Z. Coastal bermudagrass rotation and fallow for management of nematodes and soilborne fungi on vegetable crops. **Journal Nematology**. v.29, p.710–716. 1997.

KHAN, T. A.; HUSAIN, S. I. Studies on efficacy of *Paecilomyces lilacinus* as biocontrol agent against a disease complex caused by the interaction of *Rotylenchulus reniformis*, *Meloidogyne incognita* and *Rhizoctonia solani* on cowpea. **Nematol. Medit.**, v.16, p.229 – 231. 1988.

KHAN, T. A.; HUSAIN, S. I. Biological control of root-knot nematode and reniform nematodes and rootrot fungus on cowpea. **Bioved**, v.I, p.19 – 24. 1990.

KHAN, T. A.; SAXENA, S. K. Comparative efficacy of *Paecilomyces lilacinus* in the control of *Meloidogyne* spp. and *Rotylenchulus reniformis* on tomato. **Pakistan Journal of Nematology**. v.14, p.111 – 116. 1996.

KIEWNICK, S. Biological control of plant parasitic nematodes with *Paecilomyces lilacinus*, strain 251. In: Sikora, R.A., Gowen, S., Hauschild, R. & Kiewnick, S. (Eds). **Multitrophic interactions in soil**. IOBC/wprs Bulletin v.27, p.133-136. 2004.

KIEWNICK, S.; SIKORA, R. A. Optimising the biological control of plant parasitic nematodes with *Paecilomyces lilacinus* strain 251. **Phytopathology** v.94, S51. [Abstr.] 2004.

KIEWNICK, S.; MENDOZA, A.; SIKORA, R. A. Efficacy of *Paecilomyces lilacinus* strain 251 for biological control of the burrowing nematode *Radopholus similis*. **Journal of Nematology** v.36, p.326-327. [Abstr.] 2004a.

KIEWNICK, S., SCHMITZ, A.; SIKORA, R.A. Biological control of the sugar beet cyst nematode *Heterodera schachtii* with *Paecilomyces lilacinus* strain 251. **Journal of Nematology** v.36, p.327. [Abstr.] (2004b).

KIEWNICK, S.; SIKORA, R. A. Evaluation of *Paecilomyces lilacinus* strain 251 for the biological control of the northern root-knot nematode *Meloidogyne hapla* Chitwood **Nematology**, v.8, n.1, p.69-78. 2006.

KLIRONOMOS, J. N.; WIDDEN, P.; DESLANDES, I. Feeding preferences of the collembolan *Folsomia candida* in relation to microfungus successions on decaying litter. **Soil Biology Biochemistry**. v.24, p. 685–692. 1992.

KLIRONOMOS, J.N.; BEDNARCZUK, E. M.; NEVILLE, J. Reproductive significance of feeding on saprobic and arbuscular mycorrhizal fungi by the collembolan, *Folsomia candida*. **Functional Ecology** v.13, p.756–761. 1999.

KLIRONOMOS, J. N.; MOUTOGLIS, P. Colonization of non-mycorrhizal plants by mycorrhizal neighbours as influenced by the collembolan, *Folsomia candida*. **Biology and Fertility of Soils**. v.29, p.277-281. 1999.

KRATOCHVIL, R. J.; SARDANELLI, S.; EVERTS, K.; GALLAGHER, E. Evaluation of crop rotation and other cultural practices for management of root-knot and lesion nematodes. **Agronomy Journal** v.96, p.1419–1428. 2004.

- KRIŠTŮFEK, V.; HALLMANN, M.; WESTHEIDE, W.; SCHREMPF, H. Selection of various *Streptomyces* species by *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta). **Pedobiologia** v.39, p.547–554. 1995.
- KUPERMAN, R. G.; CHECKAI, R. T.; SIMINI, M.; PHILLIPS, C. T.; KOLAKOWSKI, J. E.; KURNAS, C. W.; SUNAHARA, G. I. Survival and reproduction of *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta, Enchytraeidae) in a natural sandy loam soil amended with the nitro-heterocyclic explosives RDX and HMX. **Pedobiologia**, v.47, p.651–656. 2003b.
- LARA MARTEZ, J. N.; ACOSTA, C.; BETANCOURT, N.; VICENTE RODRIGUEZ, R. Biological control of *Meloidogyne incognita* in tomato in Puerto Rico. **Nematropica** v.26, p.143–152. 1996.
- LAY, E. C.; LARA, J.; JATALA, P.; GONZALES, F. Preliminary evaluation of *Paecilomyces lilacinus* as a biological control of the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*, in industrial tomatoes. **Nematropica** v.12, p.154. 1982.
- LEE, Q.; WIDDEN, P. *Folsomia candida*, a “fungivorous” collembolan, feeds preferentially on nematodes rather than soil fungi. **Soil Biology Biochemistry**. v.28, p.689–690. 1996.
- LEIJ, F. A.; DE, A. M.; KERRY, B. R.; DENNEHY, J. A. *Verticillium chlamydosporium* as a biological control agent for *Meloidogyne incognita* and *M. hapla* in pot and microplot tests. **Nematologica** v.39, p.115 – 126. 1993.
- LOHMANN, U.; SIKORA, R. A.; HOFER, M. Influence of phospholipids on growth, sporulation and virulence of the endoparasitic fungi *Drechmeria coniospora*, *Verticillium balanoides* and *Harposporium anguillulae* in liquid culture. **Journal of Phytopathology** v.125, p.139–147. 1989.
- MCGEOCH, M. A. The selection, testing and application of terrestrial insects as bioindicators. **Biology Review**, v.73, p.181-201, 1998.
- MCINNIS, T. M.; JAFFEE, B. A. An assay for *Hirsutiella rhossiliensis* spores and the importance of phialides for nematode inoculation. **Journal of Nematology** v.21, p.229–234. 1989.
- MEYER, S. L. F.; ROBERTS, D. P.; CHITWOOD, D. J.; CARTA, L. K.; LUMSDEN, R. D.; MAO, W. L. Application of *Burkholderia cepacia* and *Trichoderma virens*, alone and in combinations, against *Meloidogyne incognita* on Bell pepper. **Nematropica** v.31, p.75–86. 2001.
- NAKAT, R. V.; ACHARYA, A.; RAO, D. V. S.; JONATHAN, E. I.; WASHNIKAR, R.; JHA, S.; SINGH, U. S.; REDDY, P. P.; KUMAR, N. K. K.; VERGHESE, A. Evaluation of *Paecilomyces lilacinus* for the management of root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) on betelvine. Advances in IPM for horticultural crops. Proceedings of the first national symposium on pest management in horticultural crops: Environmental implications and thrusts. Bangalore, India, 15 – 17 October, 1997. pp 308 – 311. 1998.
- O’CONNOR, F. B. The Enchytraeidae. In: Burges A, Raw F (eds) Soil biology. Academic Press, London, pp 213–257. 1967.

OECD. **Earthworm, acute toxicity tests**. Guideline for Testing Chemicals No. 207. Paris, France. 1984.

OECD Draft Document. **OECD Guideline for the testing of chemicals. Proposals for a new guideline. Earthworm Reproduction Test (*Eisenia fetida/andrei*)**. pp. 1–17. (2000).

OECD. **Enchytraeidae reproduction test**. Guideline for testing of chemicals No. 220. Paris, France. 2003.

PERSSON, C.; JANSSON, H. B. Rhizosphere colonization and control of *Meloidogyne* spp. by nematode-trapping fungi. **Journal of Nematology** v.31, p.164–171. 1999.

PLOEG, A. T. Effects of selected marigold varieties on root-knot nematodes and tomato and melon yields. **Plant Disease** v.86, p.505–508. 2002.

READ, D. S.; SHEPPARD, K.; BRUFORD, M. W.; GLEN, D. M.; SYMONDSON, W. O. C. Molecular detection of predation by soil micro-arthropods on nematodes. **Molecular Ecology** v.15, p.1963–1972. 2006.

REYNOLDS, L. B.; POTTER, J. W.; BALL-COELHO, B. R. Crop rotation with *Tagetes* sp. is an alternative to chemical fumigation for control of root-lesion nematodes. **Agronomy Journal** v.92, p.957–966. 2000.

RÖMBKE, J. Ecotoxicological laboratory tests with enchytraeids: A review. **Pedobiologia**, v.47, p. 607–616. 2003.

RÖMBKE, J.; MOSER, T. Organisation and performance of an international ringtest for the validation of the enchytraeid reproduction test Vol. 1 and 2. UBA-Texte 4/99. 1999.

RÖMBKE, J.; MOSER, T. Validating the Enchytraeid Reproduction Test: organisation and results of an international ringtest. **Chemosphere**, v.46, p.1117–1140. 2002.

SABATINI, M. A.; INNOCENTI, G. Soilborne plant pathogenic fungi in relation to some collembolan species under laboratory conditions. **Mycological Research**. v.104, p.1197–201. 2000.

SANTIAGO, D. C.; HOMECHIN, M.; SILVA, J. F. V.; RIBEIRO, E. R.; GOMES, B. C.; SANTORO, P. H. Seleção de isolados de *Paecilomyces lilacinus* (Thom.) Samson para controle de *Meloidogyne paranaensis* em tomateiro. **Ciência Rural**. Santa Maria. v. 36, n. 4, p. 1055-1064. 2006.

SASSER, J. N.; FRECKMAN, D. W. A world prospective on nematology: The role of the society. In: Veech JA, Dickson DW, editors. *Vistas on nematology*. Hyattsville: Soc Nematologists Inc. p 7 – 14. 1987.

SASSER, J. N.; UZZELL, G. JR. Control of the soybean cyst nematode by crop rotation in combination with a nematicide. **Journal of Nematology**. v.23, p.344–347. 1991.

SCHENK, S. Control of nematodes in tomato with *Paecilomyces lilacinus* strain 251. Hawaii Agricultural Research Center. **Vegetable Reports** v.5, p.1-5. 2004.

- SJURSEN, H.; BAYLEY, M.; HOLMSTRUP, M. Enhanced drought tolerance of a soil-dwelling springtail by reacclimation to a mild drought stress. **Journal Insect Physiology**. v.47, p.1021–27. 2001.
- SIDDIQUI, I. A.; QURESHI, S. A.; SULTANA, V.; EHTESHAMUL-HAQUE, S.; GHAFFAR, A. Biological control of rot-root knot disease complex of tomato. **Plant Soil** v.227, p.163–169. 2000.
- SORRIBAS, F. J.; ORNAT, C.; GALEANO, M.; VERDEJO-LUCAS, S. Evaluation of a native and introduced isolate of *Pochonia chlamydosporia* against *Meloidogyne javanica*. **Biocontrol Science Technology**. v.13, p.707–714. 2003.
- STANDEN, V.; LATTER, P. M. Distribution of a population of *Cognettia sphagnetorum* (Enchytraeidae) in relation to microhabitats in a blanket bog. **Journal Animal Ecology** v.46, p.213–229. 1977.
- TAYLOR, A. L.; SASSER, J. N. Biology, identification and control of root-knot nematodes (*Meloidogyne species*). Raleigh: International *Meloidogyne* Project, NCSU & USAID Coop. Publ., 1978. 111p.
- TAYLOR, B.; PARKINSON, D. A new microcosm approach to litter decomposition studies. **Canadian Journal of Botany** v.66, p.1933–1939. 1988.
- VAN STRAALLEN, N. M.; VAN GESTEL, C. A. M. Soil invertebrates and microorganisms. Pages 25 1–277 In: P. Calow, editor. **Handbook of ecotoxicology**. Volume 1. Blackwell, Oxford, England. 1993.
- VARGA, J.; NAAR, Z.; DOBOLYI, C. Selective feeding of collembolan species *Tomocerus longicornis* (Mull.) and *Orchesella cincta* (L.) on moss inhabiting fungi. **Pedobiologia** n.46, p.526–538. 2002.
- VERHOEF, H. A.; PRAST, J. E.; VERWEIJ, R. A. Relative importance of fungi and algae in the diet and nitrogen nutrition of *Orchesella cincta* (L.) and *Tomocerus minor* (Lubbock) (Collembola). **Functional Ecology** v.2, p.195–201. 1988.
- VISSER, S. Role of the soil invertebrates in determining the composition of soil microbial communities. In: Fitter, A.H., Atkinson, D., Read, D.J., Usher, M.B. (Eds.), Ecological Interactions In: **Soil, Plants, Microbes and Soil Animals**. Blackwell Scientific, Oxford, pp. 297–317. 1985.
- WANG K. H.; SIPES, B. S.; SCHMITT, D. P. Intercropping cover crops with pineapple for the management of *Rotylenchulus reniformis*. **Journal of Nematology** v.35, p.39–47. 2003.
- WIDMER, T. L.; ABAWI, G. S. Mechanism of suppression of *Meloidogyne hapla* and its damage by a green manure of Sudan grass. **Plant Disease** v.84, p.562–568. 2000.
- WILSON, M.; GAUGLER, R. Factors limiting short-term persistence of entomopathogenic nematodes. **Journal. Applied Entomology**. v.128, p. 250–253. 2004.

6 CONCLUSÕES GERAIS

Os isolados do fungo *Paecilomyces lilacinus* mostraram potencial para controle biológico de nematóide *Meloidogyne paranaensis* em mudas de cafeeiro em casa de vegetação.

Os bioindicadores de qualidade de solo *Folsomia candida* e *Enchytraeus crypticus* se alimentaram do fungo *Paecilomyces lilacinus*, mas houve diminuição da reprodução do bioindicador *Folsomia candida* com o aumento da concentração dos conídios do fungo *Paecilomyces lilacinus*.

O fungo *Paecilomyces lilacinus* reduziu a população de *Meloidogyne paranaensis* em conjunto ou sem os organismos bioindicadores de qualidade do solo *Folsomia candida* e *Enchytraeus crypticus*.

Os organismos bioindicadores de qualidade do solo *Folsomia candida* e *Enchytraeus crypticus* em conjunto mostraram-se potencialmente capazes de reduzir a população de *Meloidogyne paranaensis*.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos mostram que estudos mais aprofundados sobre a interação de microfauna e mesofauna do solo precisam ser desenvolvidos. Por exemplo, estudos em PCR para avaliar a porcentagem de alimentação de *Folsomia candida* e *Enchytraeus crypticus* sobre o fungo *Paecilomyces lilacinus* (UELPae 18) na presença e na ausência de *Meloidogyne paranaensis* e, estudos para avaliar mais rigorosamente a eficiência do controle do fungo *Paecilomyces liacinus* na presença e na ausência dos organismos bioindicadores *Folsomia candida* e *Enchytraeus crypticus* sobre os nematóides formadores de galhas em diferentes culturas a campo.

REFERÊNCIAS

- ACHAZI, R. K. Einfluss von anthropogenen Schadstoffen (PAK und PCB) auf terrestrische Invertebraten urbaner Ökosysteme. In: Bodenökologische Untersuchungen zur Wirkung und Verteilung von organischen Stoffgruppen (PAK, PCB) in ballungsraumtypischen Ökosystemen. *Edited by W. Kratz and A. Brose*. Report for the German Federal Ministry for Education and Research (BMBF), GSF, München. pp. 109–120. 1997.
- ACHAZI, R. K.; CHROSZCZ, G.; PILZ, C.; ROTHE, B.; STEUDEL, I.; THROL, C. Der Einfluss des pH-Werts und von PCB52 auf Reproduktion und Besiedlungsaktivität von terrestrischen Enchytraeen in PAK-, PCB und Schwermetallbelasteten Böden. *Verh. Ges. Oekol.* v.26, p.37–42. 1996.
- ACHAZI, R. K.; CHROSZCZ, G.; MIERKE, W. Standardisation of test methods with terrestrial invertebrates for assessing remediation procedures for contaminated soils. *Eco-Inforna* v.12, p.284–289. 1997.
- ACHAZI, R. K.; FRÖHLICH, E.; HENNEKEN, M.; PILZ, C. The effect of soil from former irrigation fields and of sewage sludge on dispersal activity and colonizing success of the annelid *Enchytraeus crypticus* (Enchytraeidae, Oligochaeta). *Newsl. Enchytraeidae*, v.6, p.117–126. 1999.
- ACHAZI, R. K.; RÖMBKE, J.; RIEPERT, F. Collembolen als Testorganismen. In: Toxikologische Beurteilung von Böden. Edited by S. Heiden, R. Erb, W. Dott, and A. Eisenträger. Spektrum Verlag, Heidelberg. pp. 83–103. 2000.
- AGRIOS, G. N. Plant diseases caused by nematodes. In: GEORGE, N. AGRIOS, F.N. (Ed.). *Plant Pathology*. 4th ed. San Diego: Academic Press, 1997. p.565-597.
- AHMAD, S. F.; KHAN, T. A. Management of *Meloidogyne incognita*, by integration of *Paecilomyces lilacinus* with organic materials in Chilli. *Archives Phytopathology Plant Protection* v.37, p.35 – 40. 2004.
- ALAM, M. M.; KHAN, A. M.; SAXENA, S. K. Mechanism of control of plant parasitic nematode as a result of the application of organic amendments to the soil. V-Role of phenolics compounds. *Indian Journal Nematology*, v.9, p.136 – 142. 1979.
- AL-HAZMI, A. S.; SCHIMITT, D. P.; SASSER, J. N. The effect of *Arthrobotrys conoides* on *Meloidogyne incognita* populations densities in corn as influenced by temperature, fungus inoculum density and of fungus introduction in the soil. *Journal of Nematology*, DcLcon Springs. v.14. n.2. p.168-174. 1982.

ALLEN, E. A.; HAZEN, B. E.; HOCH, H. C.; KWON, Y.; LEINHOS, G. M. E.; STAPLES, R. C.; STUMPF, M. A.; TERHUNE, B. T. Appressorium formation in response to topographical signals by 27 rust species. **Phytopathology** v.81, p.323-331. 1991.

ALVES, S. B. (Ed.) Controle microbiano de insetos. Piracicaba: FEALQ, Fungos entomopatogênicos. p.289-382. 1998.

ALVES, F. R.; CAMPOS, V. P. Efeitos da temperatura sobre a atividade de fungos no controle biológico de *Meloigogyne javanica* e *M. incógnita* raça 3. **Ciência Agrotecnológica**, Lavras. v.27. n.1. p.91-97, 2003.

AKHTAR M. Current options in integrated management of plant-parasitic nematodes. **Integrated Pest Management Review** v.2, p.187-197. 1997.

AMORIM, M. J.; RÖMBKE, J.; SOARES, A. M. V. M. Avoidance behaviour of *Enchytraeus albidus*: effects of Benomyl, Carbendazim, Phenmedipham and different soil types. **Chemosphere**, v.59, p.501-510. 2005a.

AMORIM, M. J.; SCHEFFCZYK, A.; RÖMBKE, J.; SOARES, A. M. V. M. Effect of different soil types on the enchytraeids *Enchytraeus albidus* and *Enchytraeus luxuriosus* using the herbicide Phenmedipham. **Chemosphere**. In press. 2005b.

AMORIM, M. J.; SCHEFFCZYK, A.; NOGUEIRA, A. J. A.; RÖMBKE, J.; SOARES, A. M. V. M. Effect of different soil types on the Collembolans *Folsomia candida* and *Hypogastrura assimilis* using the herbicide Phenmedipham. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.** 48. 2005c.

ANDREEVA, N. A.; USHAKOVA, V. L.; EGOROV, N. S. Study of proteolytic enzymes of different strains of *Penicillium lilacinum* (Thom.) in connection with their fibrinolytic activity. **Microbiology**. v.41, p.364-368, 1972.

ANVER, S.; KHAN, A. A.; ALAM, M. M. Integrated Management of Root-knot and Reniform Nematodes with Neem Cake and Biological Fungus *Paecilomyces lilacinus* on Chickpea and Pigeonpea. **Arch. Phytoph. Pflanz.**, v. 34, p. 255-264, 2001.

ARAI, T.; MIKAMI, Y.; FUKUSHIMA, K.; UTSUMI, T.; YAZAWA, K. A new antibiotic leucinostatin derived from *Penicillium lilacinum*. **Journal of Antibiotics**. v.26, p.157-61, 1973.

ARRUDA, H. V. de. Redução no crescimento de cafeeiro com um ano de campo, devido ao parasitismo de nematóides. **Bragantia**, v.19, p.179-82, 1960.

ASTM. Standard guide for conducting laboratory soil toxicity of bioaccumulation tests with the lumbricid earthworm *Eisenia fetida* and the enchytraeid potworm *Enchytraeus albidus*. ASTM Guideline No. E 1676–97. 2004.

ATKINS, S. D.; CLARK, I. M.; PANDE, S.; HIRSCH, P. R.; KERRY, B. K. The use of real-time PCR and species-specific primers for the identification and monitoring of *Paecilomyces lilacinus*. **FEMS Microbiol. Ecol.** v.51, p.257–264. 2005.

BAE, Y. S.; KNUDSEN, G. R. Influence of a fungus-feeding nematode on growth and biocontrol efficacy of *Trichoderma harzianum*. **Phytopathology** v.91, p.301–306. 2001.

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

BARKER, K.R.; HUSSEY, L.R.; KRUSBERG, L.R.; BIRD, G.W.; DUNN, R.A.; FERRIS, H.; FERRIS, V.R.; FRECKMAN, D.W.; GABRIEL, C.J.; GREWAL, A.E.; McGUIDWIN, A.E.; RIDDLE, D.L.; ROBERTS, P.A.; SCHIMMITT, D.P. Plant and soil nematodes: societal impact and focus for the future. **Journal of Nematology**, Lakeland, v.26, p.127-137, 1994.

BARROS, E. Effects of land-use system on the soil macrofauna in western Brazilian Amazonia. **Biology. Fertility. Soils**, Berlin, v. 35, n. 5, p. 338-347, 2002.

BARROS, E. Soil physical degradation and changes in macrofaunal communities in Central Amazon. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 26, n. 2, p. 157-168, 2004.

BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J. E. M.; LAMAS, C. Effect of thiamethoxam on entomopathogenic microorganisms. **Neotropical Entomology**, v.30, n.3, p.437-447, 2001.

BATISTA FILHO, A.; RAMIRO, Z. A.; ALMEIDA, J. E. M.; LEITE, L. G.; CINTRA, E. R. R.; LAMAS, C. Manejo integrado de pragas em soja: impacto de inseticidas sobre inimigos naturais. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.70, n.1, p.61-67, 2003.

BAXTER M. Counting angels with DNA. **Nature**, v.421, p.122–124. 2003.

BEARE, M. H. Aggregate-protected and unprotected organic matter pools in conventional and no-tillage soils. **Soil Science Society American Journal**, Madison, v. 58, n. 3, p. 787-795, 1994.

BELLINGER, P. F.; CHRISTIANSEN, K.A.; JANSSENS, F. Checklist of the Collembola of the world. Disponível em: < <http://www.collembola.org>>. Acesso em: 15 fev. De 2007.

BENZ, G. Synergism of micro-organisms and chemical insecticides. In: BURGESS, H.D.; HUSSEY, N.W. (Ed.). **Microbial control of insects and mites**. New York: Academic Press, 1971. p.327-355.

BIRD, D. M. C. K. Manipulation of host gene expression by root-knot nematodes. **Journal Parasitology** v.82, p.881-888. 1996.

BLANCHART, E. Role of earthworms in the restoration of the macroaggregate structure of a de-structured soil under field conditions. **Soil Biology Biochemistry**. Oxford, v.24, n.12, p.1587-1594, 1992.

BOMAN, H. G. Insect responses to microbial infections. In: BURGESS, H.D. (Ed.). **Microbial control of pest and plant diseases**. 1970-1980. New York: Academic Press, 1980. p.769-784.

BONANTS, P. J. M.; FITTERS, P. F. L.; THIJS, H.; DEN BELDER, E.; WAALWIJK, C.; HENFLING, J. W. D. M., A basic serine protease from *Paecilomyces lilacinus* with biological activity against *Meloidogyne hapla* eggs. **Microbiology** v.141, p.775-784. 1995.

BOURNE, J. M.; KERRY, B. R., The effect of the host 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 Biochemistry**. v.31, p.75-84. 1999.

BRIAN, P. W.; HEMMING, H. G. Production of antifungal and antibacterial substances by fungi, preliminary examination of 166 strains of fungi imperfecti. **Journal of General Microbiology**. v.1, p.158-67, 1947.

BROCKMEYER, V.; SCHMIDT, R.; WESTHEIDE, W. Quantitative investigations of the food of two terrestrial enchytraeid species (Oligochaeta). **Pedobiologia** v.34, p.151-156. 1990.

BROWN, G. G. How do earthworms affect microfloral and faunal community diversity? **Plant Soil**, Dordrecht, v.170, n.1, p.209-231, 1995.

- BRUNS, E.; EGELER, P.; RÖMBKE, J.; SCHEFFCZYK, A.; SPÖRLEIN, P. Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by the oligochaetes *Enchytraeus luxuriosus* and *Enchytraeus albidus* (Enchytraeidae, Oligochaeta, Annelida). **Hydrobiologia**, v.463, p.185–197. 2001.
- BRÜGGL, G. Populationsentwicklung von *Enchytraeus crypticus* (Enchytraeidae, Oligochaeta) und Einfluss subletaler Pestizidbelastungen unter Laborbedingungen. Ph.D thesis, University of Osnabrück. 1994.
- BRUSSAARD, L. Biodiversity and ecosystem functioning in soil. **Ambio**, Stockholm, v. 26, n. 8, p. 563-570, 1997.
- BURSELL, E. 1970. An introduction to insect physiology. Academic Press, London, UK. pp. 276.
- CADIOLI, M. C.; SANTIAGO, D. C.; HOSHINO, A. D.; HOMECHIN, M. Crescimento micelial e parasitismo de *Paecilomyces lilacinus* sobre ovos de *Meloidogyne paranaensis* em diferentes temperaturas “*in vitro*”. **Ciência. agrotecnologia.**, Lavras, v. 31, n. 2, p. 305-311, mar./abr., 2007.
- CADIOLI, M. C. **SELEÇÃO DE ISOLADOS DE *Paecilomyces lilacinus* PARA CONTROLE INTEGRADO DE *Meloidogyne paranaensis* EM CAFEZEIRO.** 2007. Dissertação de Mestrado em Agronomia. Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, 2007.
- CADIOLI, M. C.; SANTIAGO, D. C.; OLIVEIRA, A. D.; PAES, V. DOS S.; ARIEIRA, G.O.; BAIDA, F. C. Efeito de isolados de *Paecilomyces lilacinus* no desenvolvimento de cafezais e na população de *Meloidogyne paranaensis*. **Ciência agrotecnologia.**, Lavras, v. 33, n. 3, p. 713-720, maio/jun., 2009.
- CALVERT, G.M., TALASKA, G., MUELLER, C.A., AMMENHEUSER, M.M., AU, W.W., FAJEN, J.M., FLEMING, L.E., BRIGGLE, T., WARD, E., Genotoxicity in workers exposed to methyl bromide. **Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.** v.417 n.2–3, p.115–128. 1998.
- CAMPOS, V. P.; SIVAPALAN, P. ; GNAPRAGASM, N. C. Nematodes of coffee, cocoa and tea. In: LUC, M.; SIKORA, R.A.; BRIDGE, J.. (Org.). **Plant parasitic nematode in sub tropical and tropical agriculture.** 1 ed. Londres: C.A.B. International, 1990, p.420-451.

CANDANEDO, E.; JATALA, P.; GONZALES, F. Control biológico del nematodo *Meloidogyne incognita* com el hongo *Paecilomyces lilacinus*. In: **Abstracts of Proceedings**. Society of Caribbean, Caribbean, 1983. p.354.

CANNAYANE, I.; SIVAKUMAR, C. V. Nematode egg-parasitic fungus 1: *Paecilomyces lilacinus* – a review. **Agricultural Reviews** v.22, p.79-86. 2001.

CARNEIRO, R. G.; CARNEIRO, R. M. D. G. Levantamento preliminar dos nematóides do gênero *Meloidogyne* associados à cultura do café do norte do Paraná, no período de 1978 a 1980. **Nematologia Brasileira**. v.6, p.33-139. 1982.

CARNEIRO, R. M. D. G. 1986. **Estude dès Possibilités D'utilisation du Champignon Nematophage *Paecilomyces lilacinus* (Thom.) Samsom, 1974, Comme Agent de Lutte Biologique contre *Meloidogyne arenaria* (Neal, 1889), Chitwood, 1949.** (Tese de Doutorado). 119p. Academie de Montpellier. Universite des Sciences et Techniques du Languedoc. France.

CARNEIRO, R. M. D. G. Efeitos do filtrado de cultura de *Paecilomyces lilacinus* (Thom.) Samsom, 1974 na eclosão de larvas de *Meloidogyne arenaria* (Neal, 1889), Chitwood, 1949. **Fitopatologia Brasileira**. v.12, p.151. 1987.

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

CARNEIRO, R. G. Fitonematóides na cafeicultura paranaense: Situação atual. Resumos do XVII Congresso Brasileiro de Nematologia. Jaboticabal, SP, Brasil. Fevereiro, 1993.

CARNEIRO, R. M. D. G.; CAYROL, J. C. Relationship between inoculum density of the nematophagus fungus *Paecilomyces lilacinus* and control of *Meloidogyne arenaria* on tomato. v.14, n.4, p.629-634. 1991.

CARNEIRO, R. M. D. G.; GOMES, C. B. Metodologia e teste de patogenicidade de *Paecilomyces lilacinus* e *P. fumosoroseus* em ovos de *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**. v.7, n.1, p.66-75. 1993.

CARNEIRO, R. M. D. G.; KULCZYNSKI, S. M. Metodologia de produção de conídios para diferentes isolados de *Paecilomyces* ssp. em arroz. **Nematologia Brasileira**. v.17, p.98-101. 1993.

CARNEIRO, R. M. D. G., CARNEIRO, R. G., ABRANTES, I. M. O., SANTOS, M. S. N. A.; ALMEIDA, M. R. A. *Meloidogyne paranaensis* n. sp. (Nemata: Meloidogynidae), a Root-Knot Nematode Parasitizing Coffee in Brazil. **Journal of Nematology**. v.28, n.2. p.177-189, 1996.

CAVALCANTI, R. S.; MOINO JUNIOR, A.; SOUZA, G. C.; ARNOSTI, A. Efeito de produtos fitossanitários fenpropatrina, imidaclopride, iprodione, e tiametoxam sobre o desenvolvimento do fungo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.69, n.3, p.17-22, 2002.

CHAUSSOD, R. La qualite biologique des sols: evaluation et implications. Etude Gestion Sols, Ardon, v. 3. n. 4, p. 262-277, 1996.

CHAUVAT, M.; ZAITSEV, A. S.; WOLTERS, V. Successional changes of Collembola and soil microbiota during forest rotation. **Oecologia**, v.137, p.269-276, 2003.

CINTRA, E. R. R. **Avaliação de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. para o controle de *Fidicinoides pronoe* (Hemiptera: Cicadidae) e sua compatibilidade com produtos fitossanitários utilizados na cultura do café.** 2004. 46f. Dissertação (Mestrado em Proteção de Plantas) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2004.

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

COLLADO, R.; SCHMELZ, R. M.; MOSER, T.; RÖMBKE, J. Enchytraeid Reproduction Test (ERT): different sublethal responses of two *Enchytraeus* species (Oligochaeta) to toxic chemicals. **Pedobiologia**, v.43, p. 625–629. 1999.

COSTA, S. B.; CAMPOS, V. P. Obtenção de Fêmeas de *Heterodera glycines* em hidroponia e testes de patogenicidade de fungos isolados de cistos a fêmeas de *H. glycines* e de *Meloidogyne* spp. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v.23, p.239-243, 1997.

COSTA, M. J. N.; CAMPOS, V. P.; PFENNING, L. F.; OLIVEIRA, D. F. Patogenicidade e Reprodução de *Meloidogyne incognita* em Tomateiros (*Lycopersicon esculentum*) com a Aplicação de Filtrados Fúngicos ou Extratos de Plantas e de Esterco Animais. **Nematologia Brasileira**. v.24. n.2, p.219-226. 2000.

CROMMENTUIJN, T. **Sensitivity of soil arthropods to toxicants**. Ph.D thesis, Netherlands Integrated Soil Research Programme/Ministry of Housing, Physical Planning and Environment, Amsterdam. 1994.

CROMMENTUIJN, T.; BRILS, J.; VAN STRAALLEN, N. M. Influence of cadmium on life-history characteristics of *Folsomia candida* (Willem) in an artificial soil substrate. **Ecotoxicological Environment Safety** v.26, p. 216–227. 1993.

CROMMENTUIJN, T.; STAB, J. A.; DOORNEKAMP, A.; ESTOPPEY, O.; VAN GESTEL, C. A. M. Comparative ecotoxicity of cadmium, chlorpyrifos and triphenyltin hydroxide to four clones of the parthenogenetic collembolan *Folsomia candida* in an artificial soil. **Funct. Ecol.** v.9, p.734–742. 1995.

CULIK, M. P.; SOUSA, J. L.; VENTURA, J. A. Biodiversity of Collembola in tropical agricultural environments of Espírito Santo, Brasil. **Applied Soil Ecology**, v.21, p.49-58, 2002.

CULIK, M. P.; ZEPPELINI FILHO, D. Diversity and distribution of Collembola (Arthropoda: Hexapoda) of Brazil. **Biodivers. Conserv.**, v.12, p. 1119-1143, 2003.

CUTZ-POOL, L. Q.; PALACIOS-VARGAS, J. G.; CASTAÑOMENESES, G.; GARCÍA-CALDERÓN, N. E. Edaphic Collembola from two agroecosystems with contrasting irrigation type in Hidalgo State, México. **Applied Soil Ecology**. v.36, p.46-52, 2007.

DAVIDE, R. G. Nematode problems affecting agriculture in the Philippines. **Journal of Nematology**. v.20, n.2, p.214-218. 1988.

DASH, M. C.; CRAGG, J. B. Selection of microfungi by Enchytraeidae (Oligochaeta) and other members of the soil fauna. **Pedobiologia** v.12, p.282–286. 1972.

DASH, M. C.; NANDA, B.; BEHERA, N. Fungal feeding by Enchytraeidae (Oligochaeta) in a tropical woodland in Orissa, India. **Oikos** v.34, p.202–205. 1980.

DE GUIRAN, G.; RITTER, M. Life cycle of *Meloidogyne* species and factors influencing their development. In: Lamberti, F. & Taylor, C.E. (Eds). **Root-knot nematodes**. London: Academic Press. pp. 173-191. 1979.

DESAEGER, J.; RAO, M. R. Infection and damage potential of *Meloidogyne javanica* on *Sesbania sesban* in different soil types. **Nematology** v.2, p.169–178. 2000.

DEVRAJAN, K.; RAJENDRAN, G. Effect of the fungus, *Paecilomyces lilacinus* (Thom.) Sanson on the burrowing nematode, *Radopholus similis* (Cobb) Thorne in Banana. **Pest Management in Horticultural Ecosystems**. v.7, n.2, p.171-173, 2001.

DEVRAJAN, K.; SEENIVASAN, N. Biochemical changes in banana roots due to *Meloidogyne incognita* infected with *Paecilomyces lilacinus*. **Current Nematology**. v.13, n.1. p.1-5, 2002.

DIDDEN, W. A. M. Involvement of Enchytraeidae (Oligochaeta) in soil structure evolution in agricultural fields. **Biology Fertility Soils** v.9, p.152–158. 1990.

DIDDEN, W. A. M. Ecology of terrestrial Enchytraeidae. **Pedobiologia**, v.37, p.2–29. 1993.

DIDDEN, W. A. M.; FRUEND, H. L.; GRAEFE, U. Enchytraeids. In: **Fauna in soil ecosystems — recycling processes, nutrient fluxes and agricultural production**. Edited by G. Benckiser. M. Dekker Inc., The Netherlands. pp. 135–172. 1997.

DIRVEN-VAN BREEMEN, E. M.; BAERSELMAN, R.; NOTENBOOM, J. 1994. Onderzoek naar de geschiktheid van de potwormsoorten *Enchytraeus albidus* en *E. crypticus* (Oligochaeta, Annelida) in bodemecotoxicologisch onderzoek. National Institute of Public Health and the Environment (RIVM) Laboratory for Ecological Risk Assessment, Bilthoven, The Netherlands. RIVM Rep. 719102025.

DIX, N. J. Effect of soil fungistasis on spore germination and germtube growth in *Penicillium* species. **Transactions British Mycological Society**. v.58, p.59-66. 1972.

DOMSCH, K. H.; GAMS, W. **Compendium of soil fungi**. (Eds.). New York: Academic Press, 1980. 859p.

DUBE, B.; SMART, G. C. Biological control of *Meloidogyne incognita* by *Paecilomyces lilacinus* and *Pasteuria penetrans*. **Journal of Nematology** v.19, p.222–227. 1987.

DUNCAN, L. W. Current options for nematode management. **Annual Review of Phytopathology**. v. 29, p.469-490, 1991.

DUNN, M. T.; SAYRE, R. M.; CARREL, A.; WERGIN, W. P. Colonisation of nematode eggs by *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson as observed with scanning electron microscope. **Scan. Electron Microsc.** v.3, p.1351–1357. 1982.

DURÁN, J.; CARBALLO, M.; HIDALGO, E. Efecto de fungicidas sobre la germinación y el crecimiento de *Beauveria bassiana*. **Manejo Integrado de Plagas y Agroecología**, v.71, p.73-78, 2004.

DUTILLEUL, P.; LEGENDRE, P. Spatial heterogeneity against heteroscedasticity: an ecological paradigm versus a statistical concept. **Oikos** v.66, p.152-167. 1993.

E. C. (ENVIRONMENT CANADA). 2004. Toxicity test methodologies for assessing the impacts of contaminant mixtures in soil using terrestrial species of ecological relevance to Canadian soil systems. *In* Workshop Proceedings of the Environment Canada's Pacific Environmental Sciences Centre, North Vancouver, B.C., 19–21 February 2003. Method Development and Applications Section, Special Programs Division, Environmental Technology Centre, Ottawa, Ont. pp. 69.

EDNEY, E. B. Water balance in land arthropods. Springer-Verlag, Berlin, Germany. pp. 282. 1977.

EISENBACK, J. D.; TRIANTAPHYLLOU, H. H. Root-knot nematodes: *Meloidogyne* species and races. In: NICKLE, W. R. **Manual of Agricultural Nematology Marcel Dekker**. (Ed.). Inc. New York. 1991. p.191-274.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. *Paecilomyces lilacinus* strain 251; Exemption from the requirement of a tolerance. Federal Register, v. 70, pp. 19278–19283. 2005.

EMMETT, R. W.; PARBERY, D. G. Appressoria. **Annual Review of Phytopathology** v.13, p.147-167. 1975.

ER, M. K.; GÖKÇE, A. Effects of selected pesticides used against glasshouse tomato pests on colony growth and conidial germination of *Paecilomyces fumosoroseus*. **Biological Control**, v.31, p.398-404, 2004.

ERSÉUS, C.; KÄLLERSJÖ, M. 18S rDNA phylogeny of Clitellata (Annelida). **Zool. Scr.** v.33, p.187–196. 2004.

ESBENSHADE, P. R.; TRIANTAPHYLLOU, A. C. Use of enzyme phenotypes of identification of *Meloidogyne* species, **Journal of Nematology**, Lakeland, v. 17, n. 1, p. 6-20, 1985.

FERRAZ, S. Summary Report on the Current Status, Progress and Needs for Meloidogyne Research in Brazil. (Region III). In: **Ann Advanced Treatise on Meloidogyne**. (eds.). Raleigh, NC – USA: North Carolina State University, 1985, v.1, p.351-352.

FERRAZ, L. C. C. B. As meloidoginoses da soja: passado, presente e futuro. In. SILVA, J. F. V.; MAZAFERRA, P.; CARNEIRO, R. G.; ASMUS, G. L.; FERRAZ, L. C. C. B. **Relações parasito-hospedeiro nas meloidoginoses da soja**. (Eds.). Londrina: Embrapa Soja: Sociedade de Nematologia, 2001. 127p.

FIORETTO, A. M. C.; VILLACORTA, A. Exigências térmicas para o desenvolvimento do fungo nematófago *Paecilomyces lilacinus*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.24, n.8, p.975-978, 1981.

FITTERS, P. F. L.; GAMS, W.; DEN BELDER, E. D. A time lapse technique to study the effect of fungal products on embryogenesis of nematode eggs. **Mededelingen van de Faculteit Landbouwetenschappen**. v.58, n.2, p.751-756, 1993.

FOLKER-HANSEN, P.; KROGH, P. H.; HOLMSTRUP, M. Effect of dimethoate on body growth of representatives of the soil living mesofauna. **Ecotoxicological Environment Safety**. v.33, p. 207–216. 1996.

FRANCO, J.; JATALA, P.; BOCANGEL, M. Efficiency of *Paecilomyces lilacinus* as a biocontrol agent of *Globodera pallida*. **Journal of Nematology**. v.13, p.438-9. 1981.

FREIRE, F. C. O.; BRIDGE, J. Parasitism of eggs, females and juveniles of *Meloidogyne incognita* by *Paecilomyces lilacinus* and *Verticillium chlamydosporium*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.10, n.3, p.577-596, 1985.

FREITAS, L. G. Effectiveness of different isolates of *Paecilomyces lilacinus* and an isolate of *Cylindrocarpon destructans* on the control of *Meloidogyne javanica*. **Nematropica**, Louisiana, v.25, n.2, p.109-115, 1995.

FREITAS, L. G.; FERRAZ, S.; ALMEIDA, A. M. S. Controle de *Meloidogyne javanica* em tomateiro pela produção de mudas e substrato infestado com *Paecilomyces lilacinus*. **Nematologia Brasileira**. v.23, n.1, p.65-71. 1999.

GASPARD, J. T.; MANKAU, R. Targeting root-knot nematode developmental stages with fungae antagonists. **Phytopathology**. v.75, p.1344, 1985.

GHEYSEN, G.; FENOLL, C. Gene expression in nematode feeding sites. **Annual Review Phytopathology**. v.40, p.124-168. 2002.

GIANNAKOU, I. O.; KARPOUZAS, D. G.; PROPHETOUATHANASIADOU, D. A novel non-chemical nematicide for the control of root-knot nematodes. **Applied Soil Ecology** v.26, p.69-79. 2004.

GIANNAKOU, I. O.; ANASTASIADIS, I. A.; GOWEN, S. R.; PROPHETOU-ATHANASIADOU, D. A. 2007. Effects of a non-chemical nematicide combined with soil solarization for the control of root-knot nematodes. **Crop Prot.**, doi:10.1016/j.cropro.2007.02.003.

GODOY, G.; RODRIGUEZ-KÁBANA, R.; MORGAN-JONES, G. Parasitismo f eggs of *Heterodera glycines* and *Meloidogyne arenaria* by fungi isolated from cysts of *H. glycines*. **Nematropica**. v.12, p.111-119. 1982.

GODOY, G.; RODRIGUEZ-KÁBANA, R.; MORGAN-JONES, G. Fungal parasites of *Meloidogyne arenaria* eggs in Alabama soil. A mycological survey and greenhouse studies. **Nematropica**. v.13, p.207-13. 1983.

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

GOMES CARNEIRO, R. M. D.; CAYROL, J. C. Relationship between inoculum density of the nematophagous fungus *Paecilomyces lilacinus* and the control of *Meloidogyne arenaria* on tomato. **Review Nematology**. v.14, p.629–634. 1991.

GOWEN, S. R.; TZORTZAKAKIS, E. A.; CHANNER, A. G. Control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by the parasite *Pasteuria penetrans* as influenced by initial nematode population densities. **Nematologica** v.44, p.369–379. 1998.

GRAEFE, U.; SCHMELZ, R. Indicator values, strategy types and life forms of terrestrial Enchytraeidae and other microannelids. **Newsl. Enchytraeidae**, v.6, p.59–68. 1999.

GREENSLADE, P.; VAUGHAN, G. T. A comparison of Collembola species for toxicity testing of Australian soils. **Pedobiologia**, v.47, p. 171–179. 2003.

GUPTA, S. C.; LEATHERS, T. D.; WICKLOW, D. T. Hydrolytic enzymes secreted by *Paecilomyces lilacinus* cultured on sclerotia of *Aspergillus flavus*. **Applied Microbiology and Biotechnology** v.39, p.99-103. 1993.

HEALY, B. Distribution of terrestrial Enchytraeidae in Ireland. **Pedobiologia**, v.20, p. 159–175. 1980.

HEDLUND, K.; AUGUSTSSON, A. Effects of enchytraeid grazing on fungal growth and respiration. **Soil Biology Biochemistry** v.27, p.905–909. 1995.

HEWLETT, T. E. Evaluation of *Paecilomyces lilacinus* as a biocontrol agent of *Meloidogyne javanica* on tobacco. **Journal of Nematology**, Lakeland, v.20, n. 4, p.578-584, 1988.

HOLLAND, R. J.; WILLIAMS, K. L.; KHAN, A. Infection of *Meloidogyne javanica* by *Paecilomyces lilacinus*. **Nematology** v.1, p.131–139. 1999

HOLMSTRUP, M. Drought tolerance in *Folsomia candida* Willem (Collembola) after exposure to sublethal concentrations of three soil-polluting chemicals. **Pedobiologia**, v.41, p.361–368. 1997.

HOPKIN, S. P. 1997. Biology of springtails. Insecta: Collembola. Oxford University Press, Oxford, UK. pp. 330.

HORNE, J. K.; SCHNEIDER, D. C. Spatial variance in ecology. **Oikos** v.74, p.18-26. 1995.

HOWARD, R. J.; FERRARI, M. A.; ROACH, D. H.; MONEY, N. P. Penetration of hard substrates by a fungus employing enormous turgor pressures. **Proceedings of the National Academy of Science**, USA v.88, p.11281-11284. 1991.

HUFFAKER, C. Experimental studies on predation: dispersion factors and predator-prey oscillations. **Hilgardia** v.27, p.343-383. 1958.

HUHTA, V. The role of the fauna in soil processes: techniques using simulated forest floor. **Agric. Ecosyst. Environ., Amsterdam**, v. 34, n. 1-4, p. 223-229, 1991.

HUND-RINKE, K.; KÖRDEL, W.; HEIDEN, S.; ERB, R. Ökotoxikologische Testbatterien. Ergebnisse eines DBU-geförderten Ringtests. Initiativen zum Umweltschutz 45. Erich Schmidt-Verlag, Berlin, Germany. pp. 241. 2002a.

HUSSEY, R. S.; GRUNDLER, F. M. W. Nematode parasitism of plants. In: Perry RN, Wright DJ, (eds), **Physiology and biochemistry of free-living and plant parasitic nematodes**, pp.213-243. CAB International Press, England. (1998)

HUTSON, B. R. Influence of pH, temperature and salinity on the fecundity and longevity of four species of Collembola. **Pedobiologia**, v.18, p.163–179. 1978.

ISO. 1998. **Soil Quality — effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction**. ISO, Geneva, Switzerland. No. 11268–2.

ISO. 1999a. **Soil Quality — inhibition of reproduction of Collembola (*Folsomia candida*) by soil pollutants**. ISO, Geneva, Switzerland. No. 11267.

ISO. 2003a. **Soil quality — effects of pollutants on Enchytraeidae (*Enchytraeus sp.*). Determination of effects on reproduction**. ISO, Geneva, Switzerland. No. 16387.

JAFFEE, B. A.; MULDOON, A. E.; DIDDEN, W. A. M. Enchytraeids and nematophagous fungi in soil microcosms. **Biology Fertility Soils**. v.25, p.382:388. 1997.

JAFFEE, B. A. Augmentation of soil with the nematophagous fungi *Hirsutella rhossiliensis* and *Arthrobotrys haptotyla*. **Phytopathology** v.90, p.498–504. 2000.

JÄNSCH, S.; RÖMBKE, J. Ecological characterisation of selected enchytraeid species (Enchytraeidae, Oligochaeta) — a literature research. **Newsl. Enchytraeidae**, v.8, p. 57–68. 2003.

JÄNSCH, S.; AMORIM, M. J.; RÖMBKE, J. Identification of the ecological requirements of important terrestrial ecotoxicological test species. **Environmental Review**. v.13, p.51-83. 2005.

JATALA, P.; KAELTENBACH, M.; BOCANGEL, D. A. J. Field application *Paecilomyces lilacinus* for controlling *Meloidogyne arenaria* in potatoes. **Journal of Nematology**. v.12, p.226-227 (Abstract). 1980.

JATALA, P.; SALAS, R.; KAELTENBACH, M.; BOCANGEL, D. A. J. Multiple application and long-term effect of *Paecilomyces lilacinus* in controlling *Meloidogyne incognita* under fields conditions. **Journal of Nematology**. p.13-445. 1981.

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

JENKINS, N. E.; HEVIEFO, G.; LANGEWALD, J.; CHERRY, A. J.; LOMER, C. J. Development of mass production technology for aerial conidia for use as mycopesticides. **Biocontrol. News Inf.** v.19, p.21N–31N. 1998.

JOHNSON, A. W.; BURTON, G. W.; SUMNER, D. R.; HANDOO, Z. Coastal bermudagrass rotation and fallow for management of nematodes and soilborne fungi on vegetable crops. **Journal of Nematology** v.29, p.710–716. 1997.

JONATHAN, E. I.; RAJENDRAN, G. Biocontrol potential of the parasitic fungus *Paecilomyces lilacinus* against root-knot nematode *Meloidogyne incognita* in banana. **Journal Biological Control** v.14, p.67 – 69. 2000.

JOOSSE, E. N. G.; BUKER, J. B. Uptake and excretion of lead by litter dwelling Collembola. **Environmental Pollution.** v.18, p. 235–240. 1979.

JUVONEN, R.; MARTIKAINEN, E.; SCHULTZ, E.; JOUTTI, A.; AHTIAINEN, J.; LEHTOKARI, M. A battery of toxicity tests as indicators of decontamination in composting oily waste. **Ecotoxicological. Environment Safety.** v.47, p.156–166. 2000.

KAUR, D. J.; MAHAJAN, R. Effect of two temperature regimes on the expression of resistance to *Meloidogyne incognita* in resistant tomato cultivars. **Nematologia Mediterrânea**, Bari. v.20. n.2. p.221-222. 1992.

KERRY, B. R. Nematophagous fungi and the regulation of nematode populations in soil. **Helminthological Abstracts**, Series B, v.53, p.1–14. 1984.

KERRY, B. R. Na assessment of progress toward microbial control of plant parasitic nematodes. **Journal of Nematology**, Lakeland, FL. v.22, p.621-631, 1990.

KERRY, B.R., EVANS, K. 1996. New strategies for the management of plant parasitic nematodes. In: Hall, R. (Ed.), **Principles and Practice of Managing Soilborne Plant Pathogens**. APS Press, St. Paul, MN, pp. 134–152.

KERRY, B.; HIDALGO-DIAZ, L. Application of *Pochonia chlamydosporia* in the integrated control of rootknot nematodes on organically grown vegetable crops in Cuba. In: Sikora, R.A., Gowen, S., Hauschild, R. & Kiewnick, S. (Eds). **Multitrophic interactions in soil**. IOBC/wprs Bulletin v.27, p.123-126. 2004.

KHAN, T. A.; SAXENA, S. K. Comparative efficacy of *Paecilomyces lilacinus* in the control of *Meloidogyne* spp. and *Rotylenchulus reniformis* on tomato. **Pakistan Journal Nematology** v.14, p.111 – 116. 1996.

KHAN, T. A.; SAXENA, S. K. Effect of root-dip treatment with fungal filtrates on root penetration, development and reproduction of *Meloidogyne javanica* on tomato. **International Journal Nematology**. v.7, p.85 – 88. 1997.

KHAN, A.; WILLIAMS, K. L.; NEVALAINEN, H. K. M. Control of plant-parasitic nematodes by *Paecilomyces lilacinus* and *Monacrosporium lysipagum* in pot trials. **BioControl** this issue, DOI 10.1007/s10526-005-4241-y. 2006.

KIEWNICK, S. Advanced fermentation and formulation technologies for fungal antagonists. In: Sikora, R.A. (Ed.), **Tri-trophic interactions in the rhizosphere and root health**. IOBC/wprs Bulletin 24, 77–79. 2001.

KIEWNICK, S. 2004. Biological control of plant-parasitic nematodes with *Paecilomyces lilacinus*, strain 251. In: Sikora, R.A., Gowen, S., Hauschild, R., Kiewnick, S. (Eds.), **Multitrophic interactions in soil**. IOBC/wprs Bull. v.27, pp. 133–136.

KIEWNICK, S.; SIKORA, R. A. Efficacy of *Paecilomyces lilacinus* (strain 251) for the control of root-knot nematodes. **Comm. Appl. Biol. Sci.** v.68, p.123–128. 2003.

KIEWNICK, S.; SIKORA, R. A. Optimizing the biological control of plant-parasitic nematodes with *Paecilomyces lilacinus* strain 251. **Phytopathology** v.94, p.S51. 2004.

KISS, I.; BAKONYI, G. Guideline for testing the effects of pesticides on *Folsomia candida* Willem (Collembola): laboratory test. Bulletin of the International Organization for Biological and Integrated Control of Noxious Animals and Plants, West Palaearctic Regional Section (IOBC/WPRS). v.15, p.131–137. 1992.

KLIRONOMOS, J. N.; WIDDEN, P.; DESLANDES, I. Feeding preferences of the collembolan *Folsomia candida* in relation to microfungal successions on decaying litter. **Soil Biology Biochemistry**. v.24, p.685–692. 1992.

KORAB, J. J. Results of a study of the nematode *Heterodera schachtii* at the nematode laboratory of the Belaya Tserkov Research Station. Sbornik sartovogo, semenovod Kogo upr, v.8, p.29-67, 1929.

KRATOCHVIL, R. J.; SARDANELLI, S.; EVERTS, K.; GALLAGHER, E. Evaluation of crop rotation and other cultural practices for management of root-knot and lesion nematodes. **Agronomy Journal** v.96, p.1419–1428. 2004.

KRIŠTŮFEK, V.; HALLMANN, M.; WESTHEIDE, W.; SCHREMPF, H. Selection of various *Streptomyces* species by *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta). **Pedobiologia** v.39, p.547–554. 1995.

KROGH, P. H. Does a heterogeneous distribution of food or pesticide affect the outcome of toxicity tests with Collembola. **Ecotoxicological Environment Safety**. v.30, p.158–163. 1995.

KRZYŻANOWSKI, A. A. **Controle biológico de nematóides de galha do cafeeiro com fungos nematófagos**. (Tese de Doutorado) Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. Junho de 2006. p.60.

KUPERMAN, R. G.; CHECKAI, R. T.; SIMINI, M.; PHILLIPS, C. T.; KOLAKOWSKI, J. E.; KURNAS, C. W.; SUNAHARA, G. I. Survival and reproduction of *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta, Enchytraeidae) in a natural sandy loam soil amended with the nitro-heterocyclic explosives RDX and HMX. **Pedobiologia**, v.47, p. 651–656. 2003b.

KUPERMAN, R. G.; CHECKAI, R. T.; SIMINI, M.; PHILLIPS, C. T. Manganese toxicity in soil for *Eisenia fetida*, *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta), and *Folsomia candida* (Collembola). **Ecotoxicological. Environment. Safety**. v.57, p. 48–53. 2004.

LAAKSO, J.; SETÄLÄ, H. Sensitivity of primary production to changes in the architecture of belowground food webs. **Oikos**, v.87, p.57–64. 1999.

LARA, J.; ACOSTA, N.; BETANCOURT, C.; VINCENTE, N.; RODRÍGUEZ, R. Biological control of *Meloidogyne incognita* in tomato in Puerto Rico. **Nematropica** v.26, p.143-152. 1996.

LAVELLE, P. The impact of soil fauna on the properties of soils in the Humid Tropics. In: LAL, R.; SANCHEZ, P. (Ed.). Myths and science of soils of the tropics. Washington, D.C.: **Soil Science Society of America**, p. 157-185. (SSSA special publication, 29). 1992.

LAVELLE, P.; BIGNELL, D.; LEPAGE, M. Soil function in a changing world: the role of invertebrate ecosystem engineers. **European Journal Soil Biology**. v.33, p. 159–193. 1997.

LAVELLE, P.; SPAIN, A. V. Dordrecht: Kluwer Academic, 2001.

LAY, E. C.; LARA, J.; JATALA, P.; GONZALES, F. Preliminary evaluation of *Paecilomyces lilacinus* as a biological control of root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*, in industrial tomatoes. **Nematropica** v.12, p. 154. 1982.

LEE, Q.; WIDDEN, P. *Folsomia candida*, a “fungivorous” collembolan, feeds preferentially on nematodes rather than soil fungi. **Soil Biology Biochemistry**. v.28, p.689–690. 1996.

LEIJ, F. A.; DE, A. M.; KERRY, B. R.; DENNEHY, J. A. *Verticillium chlamydosporium* as a biological control agent for *Meloidogyne incognita* and *M. hapla* in pot and microplot tests. **Nematologica** v.39, p.115 – 126. 1993.

LEVIN, S. A. The problem of pattern and scale in ecology. **Ecology** v.73, p.1943-1967. 1992.

LEVINS, R. Coexistence in a variable environment. **American Naturalist** v.114, p.765-783. 1979.

LI, I.; REYNOLDS, J. F. On definition and qualification of heterogeneity. **Oikos** v.73, p.280-284. 1995.

LOCK, K.; JANSSEN, C. R. Ecotoxicity of chromium (III) to *Eisenia fetida*, *Enchytraeus albidus*, and *Folsomia candida*. **Ecotoxicological Environment Safety**. v.51, p.203–205. 2002.

LØKKE, H. (*Editor*). Effects of pesticides on meso and microfauna in soil. Danish Environmental Protection Agency, Report No. 8. pp. 185 [ISBN 87-7810-305-3]. 1995.

LORDELLO, L. G. E. **Nematóides das plantas cultivadas**. 8 ed. São Paulo: Nobel, 1984. 314p.

LORDELLO, L. G. E.; CARNEIRO FILHO, I.; REBEL, E. K.; GUIDOLIN, J. A.; LORDELLO, R. R. A. Identificação de nematóides em cafezais do estado do Paraná. **Nematologia Brasileira**. v.1, p.16-24, 1974.

LOUREIRO, E. S.; MOINO JUNIOR, A.; ARNOSTI, A.; SOUZA, G. C. Efeito de produtos fitossanitários químicos utilizados em alface e crisântemo sobre fungos entomopatogênicos. **Neotropical Entomology**, v.31, n.2, p.263-269, 2002.

LUSSENHOP J. Mechanisms of microarthropod-microbial interactions in soil. **Advanced Ecological Res** v.23, p.1-33. 1992.

MACLEAN, S. F.; DOUCE, G. K.; MORGAN, E. A.; SKEEL, M. A. Community organisation in the soil invertebrates of Alaskan arctic tundra. **Ecol. Bull.** (Stockholm), v.25, p.90–101. 1977.

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

MANKAU R. Nematicidal activity of *Aspergillus niger* culture filtrates. **Phytopathology** v.59, p.1170 – 1172. 1969.

MARCHISIO, V. F.; COLLA, A. Su alcuni micromicetis ad attivita antibiotica di un terreno agrario. **Allionia**. v.18, p.97-102, 1972.

MARSHALL, V. G.; KEVAN, K. M. Preliminary observations on the biology of *Folsomia candida* Willem, 1902 (Collembola: Isotomidae). **Can. Entomol.** v.94, p.575–586. 1962.

MARTIKAINEN, E.; RANTALAINEN, M. L. Temperature-time relationship in collembolan response to chemical exposure. **Ecotoxicological Environment Safety**. v.42, p.236–244. 1999.

MCGEOCH, M. A. The selection, testing and application of terrestrial insects as bioindicators. **Biology Review**, v.73, p.181-201, 1998.

MCINNIS, T. M.; JAFFEE, B. A. An assay for *Hirsutella rhossiliensis* spores and the importance of phialides for nematode inoculation. **Journal Nematology** v.21, p.229–234. 1989.

MCKENRY, M.; BUZO, T.; KRETSCH, J.; KALU, S.; OTOMO, E.; ASHCROFT, R.; LANGE, A.; KELLEY, K. Soil fumigants provide multiple benefits: alternatives give mixed results. **California Agriculture**. v.48, p.22–28. 1994.

MENGE, B. A.; SUTHERLAND, J. P. Species diversity gradients: synthesis of the roles of predation, competition, and temporal heterogeneity. **American Naturalist** v.110, p.351-369. 1976.

MERCANTE, F. M.; SILVA, R. F.; FRANCELINO, C. S. F.; CAVALHEIRO, J. C. T.; OTSUBO, A. A. et al. Biomassa microbiana, em um Argissolo Vermelho, em diferentes coberturas vegetais, em área cultivada com mandioca. **Acta Science Agronomy**. Maringa, v. 30, n. 4, p. 479-485, 2008.

MERT, H. H.; DIZBAY, M. The effect of osmotic pressure and salinity of the medium on the growth and sporulation of *Aspergillus niger* and *Paecilomyces lilacinus* species. **Mycopathologia**. v.1, p125-127, 1977.

MEYER, S. L. F. Efficacy of the fungus *Verticillium lecanii* for suppressing root-knot nematode egg numbers on Cantaloupe roots. **HortTechnology** v.9, p.443–447. 1999.

MIKLÓS, A. A. W. Papel de cupins e formigas na organização e na dinâmica da cobertura pedológica. In: FONTES, L.R.; BERTI FILHO, E. **Cupins: o desafio do conhecimento**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 227-241.

MITCHELL, R.; ALLEXANDER, M. Lysis of soil fungi and bacteria. **Canadian Journal Microbiology**. v.9, p.169-177. 1963.

MIZOBUTSI, E. H.; FERRAZ, S.; RIBEIRO, R. C. F. Avaliação do parasitismo de diversos isolados fúngicos em ovos de *Heterodera glycines* e *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**. v.24, n.2, p.167-172, 2000.

MOODY, S. A.; BRIONES, M. J. I.; PEARCE, T. G.; DIGHTON, J. Selective consumption of decomposing wheat straw by earthworms. **Soil Biology Biochemistry** v.27, p.1209–1213. 1995.

MORGAN-JONES, G.; WHITE, J. F.; RODRIGUEZ-KÁBANA, R. Phytonematode pathology: ultrastructural studies, II parasitism of *Meloidogyne arenaria* eggs and larvae by *Paecilomyces lilacinus*. **Nematropica**. v.14, p.57-71, 1984.

MORGAN-JONES, G.; WHITE, J.F.; RODRIGUEZ-KABANA, R. Phytonematode pathology: ultrastructural studies II. Parasitism of *Meloidogyne arenaria* eggs and larvae by *Paecilomyces lilacinus*. **Nematropica** v.14, p. 57–71. 1984.

MORGAN-JONES, G.; RODRIGUEZ-KÁBANA, R. Phytonematode pathology fungal modes of action: a perspective. **Nematropica**, v.15, p.107-114, 1985.

MUYS, B.; GRANVAL, P. H. Earthworms as bioindicators of forest site quality. **Soil Biology Biochemistry**. Oxford, v. 29, n. 3-4, p. 323-328, 1997.

NAKAT, R. V.; ACHARYA, A.; RAO, D. V. S.; JONATHAN, E. I.; WASHNIKAR, R.; JHA, S.; SINGH, U. S.; REDDY, P. P.; KUMAR, N. K. K.; VERGHESE, A. **Evaluation of *Paecilomyces lilacinus* for the management of root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) on betelvine.** **Advances in IPM for horticultural crops.** Proceedings of the first national symposium on pest management in horticultural crops: Environmental implications and thrusts. Bangalore, India, 15 – 17 October, 1997. pp 308 – 311. 1998.

NIELSEN, C. O.; CHRISTENSEN, B. The Enchytraeidae. Critical revision and taxonomy of European species. **Natura Jutlandica**, v.8–9, p.1–160. 1959.

NOE, J. P.; SASSER, J. N. Efficacy of *Paecilomyces lilacinus* in reducing yield loss due to *Meloidogyne incognita*. In International Congress of Nematology, 1., 1984, Guelph, Canada. Abstracts, pp.69-70. 1984.

NOLING, J. W.; BECKER, J. O. The challenge of research and extension to define and implement alternatives to methyl bromide. **Suppl. Journal of Nematology**. v.26 (4S), p.573–586. 1994.

NOLING, J. W.; DICKSON, D. W. The face of methyl bromide within Florida agriculture. **Citrus Vegetable Magazine**. p.19–24. 1992.

NORDBRING-HERTZ, B. Nematophagous fungi: strategies for nematode exploitation and for survival. **Microbiological Sciences**. v.5, p.108-114, 1968.

NOVARETTI, W. R. T. ; DINARDO-MIRANDA, L. L.; TOTINO, L. C.; STRABELLI. Efeito da aplicação conjunta do fungo *Paecilomyces lilacinus* e do nematicida Furadan 5 G no controle de nematóides em cana-de-açúcar. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v.10, p.133-144, 1986.

O'CONNOR, F. B. The Enchytraeidae. In: Burges A, Raw F (eds) Soil biology. Academic Press, London, pp 213–257. 1967.

OECD. 1984. **Earthworm, acute toxicity tests.** Guideline for Testing Chemicals No. 207. Paris, France.

OECD. 2000. Draft Document. **OECD Guideline for the testing of chemicals. Proposals for a new guideline. Earthworm Reproduction Test (*Eisenia fetida/andrei*).** pp. 1–17.

OECD. 2003. **Enchytraeidae reproduction test.** Guideline for testing of chemicals No. 220. Paris, France.

OKADA, H.; HARADA, H.; KADOTA, I. Fungal-feeding habits of six nematode isolates in the genus *Filenchus*. **Soil Biology Biochemistry**. v.37, p.1113–1120. 2005.

OKAFOR, N. Decomposition of chitin by microorganisms isolated from a temperate and tropical soil. **Nova Hedwigia**. v.13, p.209-26, 1967.

PANDEY, R.; KALRA, A.; TANDON, S.; MEHROTRA, N.; SINGH, H.N.; KUMAR, S. Essential oils as potent sources of nematocidal compounds. **Journal of Phytopathology**. v.148, p.501–502. 2000.

PAOLETTI, M. G. Using bioindicators based on biodiversity to assess landscape sustainability. **Agriculture. Ecosystems. Environment.**, Amsterdam, v. 74, n. 1-3, p. 1-18, 1999.

PETERSEN, H.; LUXTON, M. A comparative analysis of soil fauna populations and their role in decomposition processes. **Oikos**, v.39, p. 287–388. 1982.

PHILIPS, E.; WALKER, T. K. Mycological formation of fat 5 factors with influence the formation of fat surface cultures of *Penicillium lilacinum* (Thom). **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v.9, p.223-237, 1958.

PHILLIPS, C. T.; KUPERMAN, R. G.; CHECKAI, R. T. Toxicity of chemical-warfare agent HD to *Folsomia candida* in different soil types. **European Journal Soil Biology**. v.38, p. 281–285. 2002.

PITT, J. I. An appraisal of identification methods for *Penicillium* species novel taxonomic criteria based on temperature and water relations. **Mycologia**. v.65, p.1135-1137, 1973.

PLOEG, A. T. Effects of selected marigold varieties on root-knot nematodes and tomato and melon yields. **Plant Disease**. v.86, p.505–508. 2002.

PONGE, J. F.; GILLET, S.; DUBS, F.; FEDOROFF, E.; HAESE, L.; SOUSA, J. P., LAVELLE, P. Collembolan communities as bioindicators of land use intensification. **Soil Biology Biochemistry**. v.35, p.813-826, 2003.

RADEMACHER, B.; SCHMIDT, O. Die bisherigen Erfahrungen in der Bekämpfung des Rubennematoden (*Heterodera schachtii*) SCHN auf dem Wege der Reizbeeinflussung. **Archiv Pflanzentb**, Berlin. v.10, p.237-296, 1933.

RAO, M. S.; REDDY, R. P. A method for conveying *Paecilomyces lilacinus* to soil for the management of root-knot nematodes on eggplant. **Nematol. medit.**, v.22, p.265 – 267. 1994.

REDDY, P. P.; KHAN, R. M.; RAO, M. S. Integrated management of the citrus nematode *Tylenchulus semipenetrans* using oil-cakes and *Paecilomyces lilacinus*. **Afro Asian Journal of Nematology.**, v.1, p.221–222. 1991.

REYNOLDS, L. B.; POTTER, J. W.; BALL-COELHO, B. R. Crop rotation with *Tagetes* sp. is an alternative to chemical fumigation for control of root-lesion nematodes. **Agronomy Journal** v.92, p.957–966. 2000.

RIBEIRO, R. C. F.; FERRAZ, S.; MIZOBUTSI, E. H. Avaliação da eficiência de isolados de *Monacrosporium* spp. no controle de *Meloidogyne javanica* e *Heterodera glycines*. **Nematologia Brasileira.** v.23, p. 48-61. 1999.

RITZINGER, C. H. S. P.; FANCELLI, M. Manejo Integrado de Nematóides na Cultura da Bananeira. **Revista Brasileira de Fruticultura.** Jaboticabal - SP, v. 28, n. 2, p. 331-338, Agosto 2006.

RODRIGUEZ-KÁBANA, R.; MORGAN-JONES, G.; OWNLEY GINTIS, B. Effect of chitin amendments to soil on *Heterodera glycines*, microbial populations and colonization of cysts by fungi. **Nematropica** v.14, p.10-25. 1984.

RODRIGUEZ-KÁBANA, R.; MORGAN-JONES, G. Potencial for nematode control by microflora endemic in the tropics. **Journal of nematology.** v.20, n.2, p.191-203. 1988.

RÖMBKE, J. 1991. Entwicklung eines Reproduktionstests an Bodenorganismen – Enchytraeen. 2 ed. Report of the Battelle-Institut e.V. Frankfurt for the German Federal Environmental Agency (UBA), Project No. 106 03 051/01. (ECT Oekotoxikologie GmbH, Böttgerstr. 2–14, D-65439 Flörsheim, Germany).

RÖMBKE, J. Ecotoxicological laboratory tests with enchytraeids: A review. **Pedobiologia**, v.47, p. 607–616. 2003.

RÖMBKE, J.; BECK, L.; FÖRSTER, B.; FRÜND, H. C.; HORAK, F.; RUF, A.; ROSCICZEWSKI, K.; SCHEURIG, M.; WOAS, S. 1997. Boden als Lebensraum für Bodenorganismen und die bodenbiologische Standortklassifikation: Eine Literaturstudie. Texte und Berichte zum Bodenschutz **4/97**. Landesanstalt für Umweltschutz Baden-Württemberg, Karlsruhe, Germany. pp. 390.

RÖMBKE, J.; MOSER, T.; KNACKER, T. Enchytraed reproduction test. In: Sheppard, S.; Bembridge, J.; Holmstrup, M.; Posthuma, L. (Eds) **Advances in earthworm toxicology**. SETAC, Pensacola. pp. 83-97. 1998.

RÖMBKE, J.; MOSER, T. Organisation and performance of an international ringtest for the validation of the enchytraeid reproduction test Vol. 1 and 2. UBA-Texte 4/99. 1999.

RÖMBKE, J.; MOSER, T. Validating the Enchytraeid Reproduction Test: organisation and results of an international ringtest. **Chemosphere**, v.46, p. 1117–1140. 2002.

RÖMBKE, J.; JÄNSCH, S.; JUNKER, T.; POHL, B.; SCHEFFCZYK, A.; SCHALLNAß, H.-J. Improvement of the applicability of ecotoxicological tests with earthworms, springtails and plants for the assessment of metals in natural soils. **Environ. Toxicol. Chem.** In press. 2005.

RÖMBKE, J.; MELLER, M. Applied research on Enchytraeidae in Central Amazonia: project approach, methodology and first results. **Newsl. Enchytraeidae**, v.6, p. 69–75. 1999.

RONDAY, R.; HOUX, N. W. H. Suitability of seven species of soil-inhabiting invertebrates for testing toxicity of pesticides in soil pore water. **Pedobiologia** v.40, p.106–12. 1996.

ROZYSPAL, J. Houby na had atky repnem *Heterodera schachtii*. Schmidt v. Morovských pudah. **Vestník Československé Akademie zemědělské**, Prague. v.10, p.412-422, 1934.

SAMSOM, R. A. *Paecilomyces* and some allied hyphomycetes. **Studies in Micology**. v.6, p.1-119. 1974.

SANDIFER, R. D.; HOPKIN, S. P. Effects of pH on the toxicity of cadmium, copper, lead and zinc to *Folsomia candida* Willem, 1902 (Collembola) in a standard laboratory test system. **Chemosphere**, v.33, p. 2475–2486. 1996.

SANDIFER, R. D.; HOPKIN, S. P. Effects of temperature on the relative toxicities of Cd, Cu, Pb, and Zn to *Folsomia candida* (Collembola). **Ecotoxicology Environment. Safety**. v.37, p. 125–130. 1997.

SANTIAGO, D. C.; HOMECHIN, M.; SILVA, J. F. V.; RIBEIRO, E. R.; GOMES, B. C.; SANTORO, P. H. Seleção de isolados de *Paecilomyces lilacinus* (Thom.) Samson para controle de *Meloidogyne paranaensis* em tomateiro. **Ciência Rural**. Santa Maria. v. 36, n. 4, p. 1055-1064, 2006.

SANTOS, J. M.; TRIANTAPHYLLOU, H. H. Determinação dos fenótipos isoenzimáticos e estudos comparativos da morfologia de 88 populações de *Meloidogyne* spp., parasitas do cafeeiro. **Nematologia Brasileira**. v.16, p.88 (Resumos). 1992.

SASSER, J. N. Economic importance of *Meloidogyne* in Tropical countries. In: LAMBERTI, F.; TAYLOR, C. E. (Eds.). **Root-knot nematodes (*Meloidogyne* species)**. Systematics, biology and control. 1979. p.359-374.

SASSER, J. N.; FRECKMAN, D. W. 1987. A world prospective on nematology: The role of the society. In: Veech JA, Dickson DW, editors. *Vistas on nematology*. Hyattsville: Soc Namatologists Inc. p 7 – 14.

SASSER, J. N.; UZZELL, G. Control of the soybean cyst nematode by crop rotation in combination with a nematicide. **Journal of Nematology** v.23, p.344–347. 1991.

SAUTTER, K. D.; SANTOS, H. R. Recuperação de solos degradados pela mineração de xisto, tendo como bioindicadores insetos da Ordem Collembola. **Sci. Agr.**, v.11, p.85-91, 1991.

SAUTTER, K. D.; MOTTA NETO, J. A.; MORAES, A.; SANTOS, H. R.; RIBEIRO JUNIOR, P. J. População de Oribatei e Collembola em pastagens na recuperação de solos degradados pela mineração do xisto. **Pesq. Agropec. Bras.**, v.33, p.1509-1513, 1998.

SCHENK, S. Control of nematodes in tomato with *Paecilomyces lilacinus* strain 251. Hawaii Agricultural Research Center. **Vegetable Reports** v.5, p.1-5. 2004.

SEASTEDT, T. R. The role of microarthropods in decomposition and mineralisation processes. **Annual Review Entomology** v.29, p.25-46. 1984.

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

SIDDIQUI, Z.A.; MAHMOOD, I. Biological control of plant parasitic nematodes by fungi: A review. **Bioresource Technology** v.58, p.229-239. 1996.

SIKORA, R. A.; FERNANDEZ, E., 2005. Nematode parasites of vegetables. In: Luc, M., Sikora, R.A., Bridge, J. (Eds.), **Plant-Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture**, second ed. CABI Publishing, Wallingford, UK, pp. 319–392.

SILVA, J. F. V.; PIZZA, S.; CARNEIRO, R. Ocorrência de *Paecilomyces lilacinus* parasitando ovos de *Meloidogyne* sp. Em amora no noroeste do Paraná. **Nematologia Brasileira**. v.16, p.84. 1992.

SIMBERLOFF, D. S.; WILSON, E. O. Experimental zoogeography of islands: the colonization of empty islands. **Ecology** v.50, p.278-298. 1969.

SINGH, J.; PILLAI, K. S. A study of Soil microarthropod communities in same fields. **Revue Ecologie du Sol**, v.12, n.3, p. 579-590, 1975.

SMIT, C. E. 1997. **Field relevance of the *Folsomia candida* soil toxicity test**. Ph.D thesis, Vrije Universiteit, Utrecht, The Netherlands.

SMIT, C. E.; VAN GESTEL, C. A. M. Effects of soil type, prepercolation, and ageing on bioaccumulation and toxicity of zinc for the springtail *Folsomia candida*. **Environmental Toxicology Chemistry**. v.17, p. 1132–1141. 1998.

SMIT, C. E.; VAN OVERBEEK, I.; VAN GESTEL, C. A. M. The influence of food supply on the toxicity of zinc for *Folsomia candida* (Collembola). **Pedobiologia**, v.42, p. 154–164. 1998.

SNIDER, R.J.; BUTCHER, J. W. The life history of *Folsomia candida* (Willem) (Collembola: Isotomidae) relative to temperature. *Gt. Lakes Entomol.* v.6, p. 97–106. 1973.

SOCARRAS, A. V. La vida del suelo: un indicador de su fertilidad. **Agric. Org.**, La Habana, v.4, n.1, p.12-14, 1998.

SOUSA, J. P.; GAMA, M. M.; PINTO, C.; KEATING, A.; CALHÔA, F.; LEMOS, M.; CASTRO, C.; LUZ, T.; LEITÃO, P.; DIAS, S. Effects of land-use on Collembola diversity patterns in a Mediterranean landscape. **Pedobiologia**, v.48, p.609-622, 2004.

SOUZA, R. M. ; FERRARI, W. A. . Ocorrência de *Paecilomyces lilacinus* parasitando fêmeas de *Meloidogyne javanica* em *Acacia mangium* e *M. incognita* em *Ottonia* sp.. In: XIII Congresso Brasileiro de Nematologia, 1989, Maceió. Resumos, 1989. p. 24-2.

SPIEGEL, Y.; COHN, E. Lectin binding to *Meloidogyne javanica* eggs. **Journal of Nematology**., v.14 , p. 406-407. 1982.

STAM, E. M.; VAN DE LEEMKULE, M. A.; ERSTING, G. Trade-offs in the life history and energy budget on the parthenogenetic collembolan *Folsomia candida*. **Oecologia**, v.107, p. 283–292. 1996.

STANDEN, V.; LATTER, P. M. Distribution of a population of *Cognettia sphagnetorum* (Enchytraeidae) in relation to microhabitats in a blanket bog. **Journal Animal Ecology** v.46, p.213–229. 1977.

STEPHENS, P. M.; DAVOREN, C. W. Effect of the lumbricid earthworm *Aporrectodea trapezoides* on wheat grain yield in the field, in the presence or absence of *Rhizoctonia solani* and *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. **Soil Biology Biochemistry** v.28, p.561–567. 1996.

STIRLING, G. R.; MANKAU, R. Parasitism of *Meloidogyne* eggs by a new fungal parasite. **Journal of Nematology** v.10, n.3, p. 236-240. 1978.

STIRLING, G. R.; MANKAU, R. Mode of parasitism of *Meloidogyne* and other nematode eggs by *Dactylella oviparasitica*. **Journal of Nematology**. v.11, p. 282-288. 1979.

STIRLING, G. R.; WEST, L. M. Fungal Parasites of Root-Knot Nematode Eggs From Tropical and Sub-Tropical Regions of Australia. **Australasian Plant Pathology**. Australia, v.20, n.4, p.149-154, 1991.

STIRLING, A. M.; STIRLING, G. R.; MACRAE, I. C. Microbial degradation of fenamiphos after repeated application to tomato-growing soil. **Nematologica**. v.39, p.245-254. 1992.

STORK, N. E.; EGGLETON, P. Invertebrates as determinants and indicators of soil quality. **American Journal Alternative Agriculture**., Greenbelt, v. 7, n. 1-2, p. 38-45, 1992.

TAMAI, M. A.; ALVES, S. B.; LOPES, R. B.; FAION, M.; PADULLA, L. F. L. Toxicidade de produtos fitossanitários para *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.69, n.3, p.89-96, 2002.

TAPIA-CORAL, S. C. Macrofauna da liteira em sistemas agroflorestais sobre pastagens abandonadas na Amazônia central. **Acta Amazon**., Manaus, v. 29, n. 3, p. 477-495, 1999.

TAVARES, C. M.; PAES, V. DOS S.; CADIOLI, M. C.; HOMECHIN, M.; SANTIAGO, D. C. Desenvolvimento de *Paecilomyces lilacinus* em meio mínimo de cultivo. Anais do XVII EAIC – 06 a 09 de Agosto de 2008 (CD-ROM / Resumo Expandido).

TAYLOR, B. D.; PARKINSON. A new microcosm approach to litter decomposition studies. **Canadian Journal of Botany** v.66, p.1933-1939. 1988.

THOMASON, I. J. Challenges facing nematology: Enviromental risks with nematicides and the need for new approaches. In: VEECH, J. A. & DICKSON, D. W. (Eds.). **Vistas on Nematology**, Hyattsville: Society of Nematologists, 1987. p.469-476.

THOMPSON, A. R.; GORE, F. L. Toxicity of twenty-nine insecticides to *Folsomia candida*: Laboratory studies. **Journal Economic Entomology**. v.65, p. 1255–1260. 1972.

TIGANO-MILANI. M. S. M. R.; FARIA, I.; MARTINS, R.; LECUONA. Ocorrência natural de *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill., *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok e *Paecilomyces* sp. em solos de diferentes regiões do Brasil. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.22, n.2, p. 391-393. 1993.

TOPP, E.; MILLER, S.; BORK, H.; WELSH, M. Effects of marigold (*Tagetes* sp.) roots on soil microorganisms. **Biology Fertility Soils** v.27, p.149–154. 1998.

TRESNER, H. D.; HAYES, J. A. Sodium chloride tolerante of terrestrial fungi. **Applied Microbiology**. v. 22, p. 210-215. 1971.

VAN DER LANN, P. A. Een schimmel als parasite nam de cysteinhoud van het aardappelcystenaaltype (*Heterodera rostochiensis* Wollenw). **Tijdschrift voor planteziekten**. v.59, p.101-113, 1956.

VAN GESTEL, C. A. M.; VAN DIEPEN, A. M. F. The influence of soil moisture content on the bioavailability and toxicity of cadmium for *Folsomia candida* Willem (Collembola: Isotomidae). **Ecotoxicol. Environ. Saf.** v.36, p. 123–132. 1997.

VAN STRAALLEN, N. M.; VAN GESTEL, C. A. M. Soil invertebrates and microorganisms. Pages 25 1-277 In: P. Calow, editor. **Handbook of ecotoxicology**. Volume 1. Blackwell, Oxford, England. 1993.

VIGLIERCHIO, D. R. (Ed.). **The World of Nematodes**: a fascinating component of the animal kingdom. University of California: Davis, CA, 1991. 266p.

VIJVER, M.; JAGER, T.; POSTHUMA, L.; PEIJNENBURG, W. Impact of metal pools and soil properties on metal accumulation in *Folsomia candida* (Collembola). **Environment Toxicology Chemistry**. v.20, p. 712–720. 2001.

VISHNUVARDHAN, D.; JOSEPH, R. A simple method for isolation of high-molecular-weight DNA from *Rhodotorula gracilis*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** v.11, p.291-293. 1995.

WAINWRIGHT, M.; PUGH, G. J. F. The effects of fungicides on certain chemical and microbial properties of soils. **Soil Biology Biochemistry**. v.6, p.263–7. 1974.

WALKER, C. H.; HOPKIN, S. P.; SIBLY, R. M.; PEAKALL, D. B. 2001. **Principles of Ecotoxicology**. London: Taylor & Francis. 309 pp. 2nd ed.

WARDLE, D. A.; LAVELLE, P. Linkages between soil, plant litter quality and decomposition. In: CADISCH, G.; GILLER, K.E. (Ed.). **Driven by nature: plant litter quality and decomposition**. Wallingford: CAB International, 1997. p. 107-124.

WESTHEIDE, W.; BETHGE-BEILFUSS, D. (1991). The sublethal enchytraeid test system: Guidline and some results. In: Esser, G.; Overdieck, D. (Eds) **Modern ecology: Basic and applied aspects**. Elsevier. Amsterdam. pp.497-508.

WILES, J. A.; KROGH, P. H. 1998. Tests with the Collembolans *Isotoma viridis*, *Folsomia candida* and *Folsomia fimetaria*. In: **Handbook of soil invertebrate toxicity tests**. Edited by H. Løkke and C.A.M. Van Gestel. John Wiley and Sons, Ltd, Chichester, UK. pp. 131–156.

WHITEHEAD, A. G. 1998. Sedentary endorarasites of roots and tubers (Meloidogyne and Nacobbus). In: **Plant Nematode Control**. CAB International, Wallingford, UK, pp. 209–260.

WESTHEIDE, W.; GRAEFE, U. Two new terrestrial *Enchytraeus* species (Oligochaeta, Annelida). **Journal Nature History**. v.26, p. 479–488. 1992.

WESTHEIDE, W.; MÜLLER, M. C. Cinematographic documentation of enchytraeid morphology and reproductive biology. **Hydrobiologia**, v.334, p. 263–267. 1996.

WIDMER, T. L.; ABAWI, G. S. Mechanism of suppression of *Meloidogyne hapla* and its damage by a green manure of Sudan grass. **Plant Disease** v.84, p.562-568. 2000.

WILES, J. A.; FRAMPTON, G. K. A field bioassay approach to assess the toxicity of insecticide residues on soil to Collembola. **Pesticide Science**. 47, p. 273–285. 1996.

WILES, J. A.; KROGH, P. H. 1998. Tests with the Collembolans *Isotoma viridis*, *Folsomia candida* and *Folsomia fimetaria*. In: **Handbook of soil invertebrate toxicity tests**. Edited by H. Løkke and C.A.M. Van Gestel. John Wiley and Sons, Ltd, Chichester, UK. pp. 131–156.

YAMANO, T. Lilacinin. Japan Patent. 1971.

ZACHARIAE, G. Spuren tierischer Tätigkeit im Boden des Buchenwalds. Forstwiss. Forschung, v.20, p. 1–68. 1965.

ZEPPELINI FILHO, D.; BELLINI, B. C. **Introdução ao estudo dos Collembola**. João Pessoa, Universidade Federal da Paraíba, 2004. 82p.