

INTERAÇÕES ENTRE O NEMATOIDE ENTOMOPATOGÊNICO
Heterorhabditis indica LPP30 (RHABDITIDA:
HETERORHABDITIDAE) COM FUNGOS NEMATÓFAGOS EM
POMARES DE GOIABEIRAS

LILIANA PARENTE RIBEIRO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE

DARCY RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ

ABRIL – 2013

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do CCTA / UENF 073/2013

Ribeiro, Liliana Parente

Interações entre o nematoide entomopatogênico *Heterorhabditis indica* LLPP30 (Rhabditida: Heterorhabditidae) com fungos nematófagos em pomares de goiabeiras / Liliana Parente Ribeiro. – 2013.

109 f.

Orientador: Cláudia de Melo Dolinski.

Tese (Doutorado - Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Campos dos Goytacazes, RJ, 2013.

Bibliografia: f. 88 – 106.

1. *Arthrobotrys* sp 2. Grupos tróficos 3. Nematoides do solo I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. II. Título.

CDD – 632.6257

INTERAÇÕES ENTRE O NEMATOIDE ENTOMOPATOGÊNICO
Heterorhabditis indica LPP30 (RHABDITIDA:
HETERORHABDITIDAE) COM FUNGOS NEMATÓFAGOS EM
POMARES DE GOIABEIRAS

LILIANA PARENTE RIBEIRO

Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Produção Vegetal.

Orientadora: Prof.^a Cláudia de Melo Dolinski

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
ABRIL - 2013

INTERAÇÕES ENTRE O NEMATOIDE ENTOMOPATOGENICO
Heterorhabditis indica LPP30 (RHABDITIDA:
HETERORHABDITIDAE) COM FUNGOS NEMATÓFAGOS EM
POMARES DE GOIABEIRAS

LILIANA PARENTE RIBEIRO

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Produção Vegetal”.

Aprovada em 23 de abril de 2013

Comissão Examinadora:

Dr. Vicente Mussi Dias (D.Sc., Produção Vegetal) - UENF

Dr. Ramon Santos de Minas (D.Sc., Produção Vegetal) - UFES

Prof. Ricardo Moreira de Souza (Ph.D., Fitopatologia) - UENF

Prof.^a Claudia de Melo Dolinski (Ph.D., Fitopatologia) - UENF
Orientadora

DEDICO E OFEREÇO

A Deus, pela sua Onipresença na minha vida e, principalmente, durante a conquista dos resultados desta tese;

Aos meus pais e às irmãs e a todos aqueles que um dia acreditaram em mim e me deram forças para superar os desafios para o desenvolvimento deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter concedido a graça de está perto de terminar o doutorado;

Aos meus pais e à minha família, que sempre estiveram ao meu lado, me dando incentivo e carinho, o meu eterno amor e gratidão. Em especial, ao meu irmão Eraldo, que sempre me ajudou, muito obrigada;

A UENF, pela oportunidade de realização do curso e pela concessão da bolsa;

Aos meus orientadores, Professora Cláudia Dolinski e Professor Ricardo Moreira, pela excelente orientação, com quem aprendi a buscar a perfeição no meu trabalho;

Aos meus amigos e colegas de doutorado, pelos anos maravilhosos que passamos juntos, em especial a Maria Kellen, Joyce Cleide, Anna Christina, Inês, Shênia, Carla, Luciano, Ramon, Sheila, José Hildefonso, Fabíola, Victor, Gabriela Tatagiba Araujo e Suelen Alvarenga;

À minha amiga Marília Grasiela, pelo incentivo durante todo o período da graduação e mestrado;

À minha amiga Maria Kellen, pelo grande auxílio para a concretização deste trabalho;

A Inês Ribeiro Machado, pelos mais de 10 anos de amizade e cumplicidade durante a nossa caminhada na UENF;

Aos meus amigos, que sempre rezaram por mim e estiveram ao meu lado nos momentos mais difíceis de minha vida: Danielle, Soraia, Wiara, Shênia, Sheila, Paula Bortot, Lília, Roberta, Amaro Neto e tantas outras pessoas;

Aos meus amigos e colegas de laboratório, Anália, Felipe, Ramon, Inês, Renata, Thiago, Karla, Vicente, Denise, Rafael, Lívia, Yara, Eliana e Luciano por todo o auxílio, carinho e amizade;

Ao técnico de campo Francisco Luiz Rangel Manhães, pela colaboração no campo e no laboratório e pela agradável convivência;

À secretária do Laboratório de Entomologia e Fitopatologia Rita Maria G. da Silva, pelo auxílio em todas as etapas do meu trabalho;

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para concretização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1. Goiabeira e suas pragas.....	17
2.2. Cultivo orgânico.....	18
2.3. Nematoides entomopatogênicos.....	20
2.4. Breve histórico sobre <i>Heterorhabditis indica</i> linhagem LLP30.....	23
2.4.1. Obtenção da linhagem <i>Heterorhabditis indica</i> linhagem LLP30.....	23
2.5. Fungos Nematófagos.....	23
2.5.2. Fungos endoparasitas.....	24
2.5.3. Fungos predadores.....	26
2.5.4. Fungos ovicidas ou oportunistas.....	30
2.5.5. Fungos produtores de metabólitos tóxicos.....	31

2.5.6. Formas de atuação.....	32
2.6. Fungos nematófagos X nematoides entomopatogênicos.....	34
2.7. Outros inimigos naturais X nematoides entomopatogênicos.....	35
3. TRABALHOS.....	37
3.1. Nematode Community and nematophagous fungi associated to entomopathogenic nematode <i>Heterorhabditis indica</i> LPP 30 in a guava orchard.....	37
1. Introducion.....	40
2. Materials and Methods.....	41
3. Results and discussion.....	44
5. Literature Cited.....	53
3.2. Entomopathogenic nematode post application effect on nematophagous fungi in a guava orchard.....	60
1. Introduction.....	62
2. Materials and Methods.....	65
3. Results.....	70
4. Discussion.....	75
5. References.....	78
4. RESUMOS E CONCLUSÕES.....	87
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	88

RESUMO

RIBEIRO, Liliana Parente; D.Sc. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Abril de 2013. Interações entre o Nematóide entomopatogênico *Heterorhabditis indica* LPP 30 (Rhabditida: Heterorhabditidae) com fungos nematófagos em pomares de goiabeiras. Orientadora: Cláudia de Melo Dolinski.

Um dos métodos para controle alternativo de pragas é a aplicação de nematoides entomopatogênicos. Entretanto, a eficiência desses nematoides pode ser influenciada por fatores abióticos e bióticos, como os fungos nematófagos. Sendo assim, os objetivos desse estudo foram identificar os fungos nematófagos e a comunidade de nematoides do solo, a qual o nematoide entomopatogênico *Heterorhabditis indica* LPP 30 pertence, em dois tipos diferentes de pomares no norte do estado do Rio de Janeiro: cultivo em conversão para orgânico e cultivo convencional de goiabeiras. Além disso, foi possível verificar a permanência dos nematoides entomopatogênicos, dos fungos nematófagos e da comunidade geral de nematoides após a eliminação do goiabal, bem como o efeito da aplicação aumentativa do nematoide entomopatogênico nativo *H. indica* LPP 30 sobre a população de fungos nematófagos em pomar tipicamente tropical. Os

experimentos foram realizados em uma propriedade comercial e na unidade experimental da Universidade Estadual Norte Fluminense, ambos na cidade de Campos dos Goytacazes. No primeiro experimento, a área em conversão para orgânico e convencional consistiu de dez árvores, cada uma com duas linhas de bordadura. Em cada área, dez amostras de 500 g de solo foram coletadas aleatoriamente sob a copa das árvores, a 0-20 cm de profundidade, com o auxílio de um trado. As amostragens para coleta do NEP *H. indica* foram realizadas pelo método inseto-armadilha. O isolamento dos fungos nematófagos foi realizado pelo método do espalhamento do solo e a comunidade de nematoides do solo foi extraída pelo método da flutuação centrífuga em solução de sacarose. A identificação dos fungos nematófagos e dos nematoides do solo foi realizada através de chaves de identificação. Foram calculados a abundância absoluta e o índice de Shannon. No segundo experimento, foi realizada a aplicação de *H. indica* LPP 30 e avaliações pré e pós-aplicação dos fungos nematófagos, comunidade de nematoides e do NEP *H. indica* LPP 30. Foi realizada a identificação molecular, análise de PCR em tempo real, para quantificação dos fungos nematófagos e do NEP *H. indica* LPP 30, e identificação morfológica para a comunidade de nematoides do solo. Os resultados mostraram a presença de duas espécies de fungos predadores, *Arthrobotrys* sp. e *Arthrobotrys musiformis*. Dentre os nematoides, podem-se destacar os gêneros *Hemicycliophora* (42.4%), *Helicotylenchus* (21.9%), *Rhabditis* (12.0%) and *Aporcelaimus* (8.7%), ao longo dos 17 meses de avaliação. Dois meses após a eliminação do goiabal, em fevereiro de 2012, foi observada somente a presença do fungo *A. musiformis* e não foi possível encontrar o NEP *H. indica* LPP 30 e, em geral, ocorreu queda na população de nematoides no solo. No segundo trabalho, o pomar apresentou redução no número de NEPs, com ausência de juvenis infectantes, após uma semana de sua aplicação. Além disso, foi possível observar mudanças na quantidade de fungos nematófagos apresentando queda na população de *A. dactyloides*, *Catenaria* sp. e *Paecilomyces lilacinus*, em comparação com a quantificação do período de pré-aplicação. Diante disso, pode-se concluir que a eliminação do goiabal proporcionou maior exposição do solo às intempéries, que desencadeou rapidamente a eliminação dos NEPs presentes na área e a diminuição da quantidade de nematoides do solo. A aplicação aumentativa de *H. indica* LPP 30 proporcionou um rápido consumo dos NEPs aplicados e queda da

quantidade de fungos nematófagos presentes no local, indicando a tendência de entrar no equilíbrio dinâmico. Sendo assim, no Brasil com as características típicas de clima tropical, é necessário a aplicação periódica de NEPs, devido à presença e rápida ação de fungos nematófagos.

Palavras-chave: *Arthrobotrys* sp., grupos tróficos, nematoides do solo.

ABSTRACT

RIBEIRO, Liliana Parente. D.Sc. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. April, 2013. Interactions between the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis indica* LPP 30 (Rhabditida: Heterorhabditidae) with nematophagous fungi in guava orchard. Advisor: Cláudia de Melo Dolinski.

One of the alternative methods for pest control is the application of entomopathogenic nematodes. However, the efficiency of these nematodes can be influenced by abiotic and biotic factors, such as nematophagous fungi. Thus, the objectives of this study were to identify the nematophagous fungi and soil nematodes community, which the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis indica* LPP 30 belongs in two different orchards in the northern state of Rio de Janeiro: in conversion to organic farming and conventional cultivation of guava. Moreover, it was possible to verify the permanence of entomopathogenic nematodes, nematophagous fungi and nematodes general community after elimination guava orchard, as well as the effect of augmentative native entomopathogenic nematode *H. indica* LPP 30 on the population of nematophagous fungi in orchard typically tropical. The experiments were performed on a property comercial and unity experiences part of Rio de Janeiro State University, both in the city of Goytacazes. In the first experiment, the area

under conversion to organic and conventional consisted of ten trees, each with two lines of embroidery. In each area, ten samples of 500 g of soil were collected randomly under the canopy of trees, at 0-20 cm depth, with the aid of an auger. Sampling for collection of NEP states was performed by insect-trap. The isolation of nematophagous fungi was performed by the method of scattering the soil and the soil nematode community was extracted by the method of centrifugal flotation in a sucrose solution. The identification of nematophagous fungi and soil nematodes was performed using identification keys. We calculated the absolute abundance and the Shannon index. The second experiment, was performed applying *H. indica* LPP 30 and pre-and post-application of nematophagous fungi, nematodes and community NEP *H. indica* LPP 30. Identification was performed molecular analysis of real-time PCR to quantify the NEP *H. indica* LPP 30 and nematophagous fungi, and morphological identification for soil nematode community. The results showed the presence of two species of fungi predators, *Arthrobotrys* sp. and *Arthrobotrys musiformis*. Among the nematodes, can highlight the genera *Hemicycliophora* (42.4%), *Helicotylenchus* (21.9%), *Rhabditis* (12.0%) and *Aporcelaimus* (8.7%). Over the 17-month evaluation. Two months after the elimination of guava orchard, in February 2012, was only observed in the presence of the fungus *Arthrobotrys musiformis* and could not find the NEP and it shows in general there was a decrease in the population of nematodes in soil. In the second study, the orchard decreased the number of NEPs, with absence of infective juveniles, after a week of application. Furthermore, we observed changes in the amount of nematophagous fungi showing a drop in the population of *Arthrobotrys dactyloides*, *Catenaria* sp. and *Paecilomyces lilacinus*, as compared to quantify the pre-application. Therefore, we conclude that the elimination of guava orchard provided greater soil exposure that triggered the weather quickly eliminate NEPs present in the area and decrease the amount of soil nematodes. The application augmentative of *H. indica* LPP 30 shows provided a rapid consumption of NEPs applied and decline of the amount of nematophagous fungi on site, indicating a tendency to enter the dynamic equilibrium. Thus, in Brazil with characteristics make typical tropical climate, it is necessary for the periodic application of NEPs due to the presence and rapid action nematophagous fungi.

Keywords: *Arthrobotrys* sp. groups trophic, soil nematode

1. INTRODUÇÃO

O cultivo da goiabeira no Brasil permite considerá-la atualmente como uma espécie plenamente adaptada ao clima subtropical. Atualmente, alguns dos principais centros produtores são o Brasil, México, Índia, China, Paquistão e África do Sul (Pereira e Kavati, 2011). Esta produção poderia ser maior se não houvesse tantas pragas e doenças incidindo sobre a cultura. Dentre as pragas, as principais que atacam os frutos são o gorgulho da goiaba *Conotrachelus psidii* Marshall, 1922 (Coleoptera: Curculionidae) e as moscas-das-frutas *Anastrepha* sp. e *Ceratitis capitata* Wied. (Diptera: Tephritidae) (Dolinski e Lacey, 2007).

A aplicação dos nematoides entomopatogênicos (NEPs) no controle biológico de pragas é um dos métodos que podem ser incorporados ao manejo integrado de pragas (MIP) ou aos cultivos orgânicos, que vêm crescendo nos últimos anos. O cultivo orgânico de alimentos é a produção sem a utilização de produtos químicos e respeitando o meio ambiente (Brasil, 2003).

As aplicações de NEPs vêm sendo utilizadas com sucesso nos Estados Unidos, Europa e Austrália (Dolinski et al., 2006). Os NEPs estão amplamente distribuídos pelo mundo (Hominick, 2002), e têm sido isolados de vários tipos de

habitats naturais e manejados de uma ampla variedade de solos (Kaya e Gaugler, 1993). São caracterizados como agentes de controle biológico de artrópodes (Greenwood, 2004) e pertencem às famílias Steinernematidae Chitwood e Chitwood, 1937 e Heterorhabditidae Poinar, 1976 (Adams e Nguyen, 2002). Eles são parasitas letais de insetos, e possuem apenas uma única fase de vida livre no solo, quando são chamados de juvenis infectantes (JIs). Estes JIs penetram no hospedeiro pelas aberturas naturais do corpo (boca, ânus e espiráculo) ou diretamente pela cutícula do inseto, para posteriormente penetração na hemocele. Esses nematoides possuem bactérias simbiotes: *Xenorhabdus* Thomas e Poinar 1979, em *Steinernema* Travassos ou *Photorhabdus* Boemare et al. 1993, em *Heterorhabditis* Poinar, 1976 que são liberadas dentro do hospedeiro, e geralmente causam morte no mesmo de 24 a 48h após a infecção (Gaugler et al., 1997).

Os fatores que podem afetar a sobrevivência dos NEPs podem ser intrínsecos (genéticos, fisiológicos e características comportamentais dos JIs) ou extrínsecos (abióticos e bióticos) (Curran, 1993; Kaya, 2002). Os abióticos incluem temperatura, umidade, textura do solo, raios ultravioleta e pesticidas químicos (Kaya, 2002; Smits, 1996). Os bióticos favoráveis incluem a presença de hospedeiros e de plantas que moderam os fatores físicos, isto é, a umidade do solo, temperatura, porosidade dentre outros, e cria um ambiente favorável à sobrevivência dos NEPs. Contudo, os fatores bióticos também podem ser antagonísticos ou desfavoráveis e afetam a sobrevivência dos NEPs (Kaya e Koppenhöfer, 1996; Kaya et al., 1998; Kaya, 2002). Esses fatores antagonistas podem ser antibioses, competição, inimigos naturais e “scavengers” (que se alimentam de animais mortos) (Baur et al., 1998). A antibiose ocorre pela liberação de compostos químicos pelas raízes das plantas no solo que podem afetar o comportamento de encontro do hospedeiro pelos JIs (Kaya e Koppenhofer, 1996), ou a presença destes químicos nos insetos hospedeiros pode afetar negativamente a reprodução dos NEPS (Barbercheck et al, 1995; Kaya, 2002).

Contudo, em relação ao controle biológico, falhas do biocontrole podem ser resultados dessa combinação de fatores bióticos e abióticos que limitam o estabelecimento, persistência e/ou reciclagem. E dentre os fatores abióticos a estrutura do solo e a umidade disponível afetam a persistência dos NEPs. No

grupo dos fatores bióticos, a variação em qualidade e abundância de hospedeiros afeta a reprodução e a persistência por um longo tempo (Ram et al, 2008).

Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi identificar os fungos nemátófagos e a comunidade de nematoides do solo, à [a] qual o nematoide entomopatogênico *Heterorhabditis indica* LPP 30 pertence, em duas áreas distintas de plantio de goiabeiras no norte do estado do Rio de Janeiro: uma de cultivo em conversão para orgânico e a outra convencional, ao longo de 17 meses de cultivo, bem como a sucessão e permanência desses organismos nesses locais.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A goiabeira e suas pragas

A goiabeira é nativa da América e amplamente cultivada em países tropicais e subtropicais (Gomes, 2007). No Brasil, pode ser cultivada em todo o território nacional, em quase todos os tipos de clima e solo. A goiabeira é considerada uma planta rústica e pouco exigente nutricionalmente (Pereira e Martinez Júnior, 1986). A área plantada e colhida, no Brasil, em 2011 foi de 1083 hectares, com rendimento médio de 14.080 kg.ha⁻¹ (IBGE, 2011). Os principais estados produtores são Pernambuco, São Paulo, Brasília, Rio de Janeiro e Bahia (Pereira e Kavati, 2011).

Por ser uma fruta saborosa e rica em licopeno, a goiaba tem recebido grande atenção pela possível capacidade de atuar na prevenção e combate a diferentes tipos de câncer. Outras características importantes dessa fruta incluem a presença de nutrientes tais como zinco, fibras, niacina e vitamina E, apresentando em sua composição três a quatro vezes o teor de vitamina C encontrado na laranja, além de possuir teores elevados de selênio, cobre, fósforo, magnésio, cálcio, ferro, ácido fólico e vitaminas A, B1, B2 e B6 (Luximon-Ramma et al., 2003; Soares et al., 2004; Cardoso et al., 2002).

O fruto da goiabeira é muito apreciado, tanto para o consumo como para industrialização. No consumo *in natura*, para o mercado interno e para exportação, sua qualidade é relacionada aos atributos físicos da fruta, como aparência, tamanho, forma, cor, textura e composição química (Freire et al., 2009).

A exploração comercial da goiabeira iniciou-se ao final da década de 50, com produção de goiabas para mesa e para processamento industrial. No Brasil, com o desenvolvimento de novas variedades e técnicas especiais de cultivo houve grande expansão desta cultura. Segundo o IBGE – IBRAF, em 2009, o Brasil produziu 297.377 t em uma área plantada de 15.048 ha. Pernambuco, São Paulo, Brasília, Rio de Janeiro e Bahia são os principais estados produtores. O estado de São Paulo se destaca na produção de goiabas para mesa (50.000 t) que devido à alta qualidade dos frutos é exportado com sucesso (Pereira e Kavati, 2011).

As diferentes pragas que atacam os frutos, folhas e troncos podem causar maiores ou menores perdas dependendo das condições de cultivo, região produtora ou país. Nas folhas, a principal praga é psilídeo, *Triozoidea limbata* Enderlein (Hemiptera: Psyllidae), que causa danos principalmente após a poda, quando novas folhas começam a brotar e crescer (Souza et al., 2003). Nos frutos o gorgulho da goiaba *Conotrachelus psidii* Marshall, 1922 (Coleoptera: Curculionidae) e as moscas-das-frutas *Anastrepha* sp. e *Ceratitidis capitata* Wied. (Diptera: Tephritidae) são as principais pragas e podem ser encontradas praticamente em todos os pomares de goiaba do Brasil, durante todo o ano (Dolinski et al., 2006).

2.2. Cultivo orgânico

Com a possibilidade de se obter alimentos mais saudáveis, de alta qualidade e sem o emprego dos agroquímicos convencionais, os produtos orgânicos vêm crescendo no mercado. As principais diferenças entre o cultivo orgânico e o convencional são as seguintes:

- produtos sem agrotóxicos e adubos químicos solúveis, para a produção de alimentos saudáveis, sem resíduos de contaminantes;

- compromisso com o produtor e o consumidor, preservação da produção de alimentos saudáveis e de qualidade (Penteado, 2004).

A lei Federal nº 10.831 de 23 de dezembro de 2003 estabelece como sistema orgânico de produção agropecuária todo aquele em que se adotam técnicas específicas, mediante a otimização do uso dos recursos naturais e socioeconômicos disponíveis e o respeito à integridade cultural das comunidades rurais, tendo por objetivo sustentabilidade econômica e ecológica, a maximização dos benefícios sociais, a minimização da dependência de energia não renovável, empregando-se, sempre que possível, métodos culturais, biológicos e mecânicos, em contraposição ao uso de materiais sintéticos, a eliminação do uso de organismos geneticamente modificados e de radiações ionizantes em qualquer fase do processo de produção, processamento, armazenamento, distribuição e comercialização, e a proteção do meio ambiente (Brasil, 2003).

Desta forma, segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, as finalidades dos sistemas de produção orgânica são: a oferta de produtos saudáveis, isentos de contaminantes intencionais; a preservação da diversidade biológica dos ecossistemas naturais e a recomposição ou o incremento da diversidade biológica dos ecossistemas modificados em que se insere o sistema de produção; o incremento da atividade biológica do solo; o uso sustentável do solo, da água e do ar; a redução ao mínimo de todas as formas de contaminação desses elementos que possam resultar das práticas agrícolas; a manutenção ou o incremento da fertilidade do solo em longo prazo; a reciclagem de resíduos de origem orgânica, reduzindo ao mínimo o emprego de recursos não renováveis; o uso de recursos renováveis e de sistemas agrícolas organizados localmente; o incentivo à integração entre os diferentes segmentos da cadeia produtiva e de consumo de produtos orgânicos; a regionalização da produção e do comércio desses produtos; e a manipulação dos produtos agrícolas com base no uso de métodos de elaboração cuidadosos, com o propósito de manter a integridade orgânica e as qualidades vitais do produto em todas as etapas.

O desenvolvimento do mercado de orgânicos está diretamente relacionado à confiança dos consumidores quanto à autenticidade dos produtos, a qual somente pode ser assegurada por meio de programas eficientes de certificação. Além disso, essa certificação é importante para a manutenção de

padrões éticos do movimento orgânico, devendo estar desvinculada de interesses econômicos.

A certificação consiste em um conjunto de regras e procedimentos adotados por uma entidade certificadora auditora, que deve assegurar por escrito que determinado produto, processo ou serviço obedece às normas e às práticas da produção orgânica. A certificação, assim, é geralmente apresentada sob a forma de um selo afixado ou impresso no rótulo ou na embalagem do produto orgânico.

Poderão ser certificadas as unidades produtoras ou processadoras e comerciantes de frutas, sejam pessoas físicas ou jurídicas que cumprirem as normas de produção, os regulamentos, contratos e estatutos das certificadoras orgânicas (Penteado, 2004).

Segundo Oliveira et al. (2010), a certificação assegura ao produtor um diferencial de mercado para os seus produtos e, ao consumidor, a garantia da origem do mesmo, das boas práticas agrícolas adotadas no sistema produtivo e da isenção de contaminação química do alimento.

Ainda, a certificação de produtos orgânicos exige uma série de cuidados, tais como: a desintoxicação do solo; o não uso de adubos químicos e agrotóxicos, a recomposição de matas ciliares; a preservação de espécies nativas e de mananciais; o respeito às normas sociais baseadas nos acordos internacionais do trabalho; e, o envolvimento do produtor com projetos sociais e com a preservação do meio ambiente (Oliveira et al., 2010).

2.3. Nematoides Entomopatogênicos

Pela classificação os nematoides entomopatogênicos da família Steinernematidae pertencem à ordem Tylenchida, à família *Heterorhabditidae* à ordem Rhabditida. A família Steinernematidae possui dois gêneros: *Steinernema* Travassos, 1927 e *Neosteinernema* Nguyen e Smart, 1994 e a família *Heterorhabditidae* possui apenas o gênero *Heterorhabditis* Poinar, 1976 (Adams et al., 2006).

O ciclo de vida dos NEPs é composto pelas fases de ovo, juvenil e adulto. A fase juvenil possui quatro estádios (J1, J2, J3 e J4). A fase juvenil 3 também é

conhecida como juvenil infectante (JI), que corresponde à fase em que o nematoide se encontra no solo (Adams e Nguven, 2002).

No caso, do gênero *Steinernema*, os JIs carregam as bactérias simbiotes *Xenorhabdus* Thomas and Poinar 1979, em uma vesícula localizada na região anterior do intestino. Uma vez que o hospedeiro suscetível é encontrado, os JIs penetram no mesmo pelas aberturas naturais (boca, ânus ou espiráculos) e atingem a hemocele (Kaya e Gaugler, 1993).

Na hemocele liberam suas bactérias simbiotes, que rapidamente se multiplicam e após um curto período, desencadeiam um processo de infecção generalizada (septicemia) levando à morte o inseto. O cadáver fica então tomado por uma “sopa bacteriana”, constituída por um meio rico em nutrientes, bactérias e tecidos do inseto já desorganizados, dos quais os nematoides se alimentam e se desenvolvem, passando pelo último estágio de juvenil (J4) e se tornando adultos da primeira geração (machos e fêmeas). Em geral, os juvenis originados por esses adultos ainda têm ao seu dispor, dentro do corpo do hospedeiro, apreciável quantidade de alimento, e conseguem completar seu ciclo e formar os adultos da segunda geração. Após o surgimento e acasalamento dos adultos da segunda geração, têm-se a formação de uma população de juvenis que se alimentam do resto do cadáver e depois o abandonam, passando para o solo em busca de novos hospedeiros. Antes dos JIs deixarem o cadáver, as bactérias simbiotes são apreendidas na vesícula especializada (Adams e Nguyen, 2002).

Para as espécies do gênero *Heterorhabditis* o ciclo de vida é similar ao descrito para o gênero *Steinernema*, com a diferença de que a primeira geração de adultos, no inseto morto, compõe-se unicamente de hermafroditas, surgindo machos e fêmeas anfimíticos na segunda geração e, eventualmente, nas seguintes. Essas bactérias simbiotes são apreendidas e armazenadas na região anterior do intestino dos JIs, pois não possuem vesículas (Adams e Nguyen, 2002). Além disso, esses JIs do gênero *Heterorhabditis* utilizam um “dente” quitinoso presente em sua parte anterior para perfurar a cutícula do hospedeiro (Ciche e Ensign, 2003).

Entre o nematoide e a bactéria ocorre a simbiose, pois os dois se beneficiam dessa associação. O nematoide depende da bactéria para matar o inseto hospedeiro, por intermédio de enzimas para a degradação dos tecidos do inseto e de outros compostos antimicrobianos que, conseqüentemente, conferem

proteção ao cadáver contra os invasores. Além disso, os tecidos degradados ainda servem como alimento aos nematoides. Já as bactérias precisam do nematoide como proteção ao ambiente externo e como veículo de transporte e disseminação para a hemocele do hospedeiro (Kaya e Gaugler, 1993; Chaston e Goodrich-Blair, 2010).

Durante o estágio de juvenil infectante, os NEPs não se alimentam e dependem de suas reservas internas até encontrarem um novo hospedeiro. Estas reservas se encontram no intestino, principalmente na forma de glicogênio (Glazer, 2002). Nessa fase, os NEPs são mais resistentes às condições ambientais adversas, o que permite a persistência deles no solo por um determinado tempo. A resistência se dá devido à existência de dupla cutícula, sendo uma do terceiro estágio e a outra do segundo estágio, que ficou retida. Esta proteção auxilia contra a dessecação e o ataque de antagonistas (Timper e Kaya, 1989). Um exemplo de antagonistas são os fungos nematófagos.

O comportamento de busca dos NEPs pelos hospedeiros é variável entre as espécies, existindo duas formas classificadas como “ambusher” e “cruiser”. A estratégia “ambusher” se dá quando os JIs esperam seu hospedeiro fazendo nictação, isto é, ficando eretos e apoiados em suas caudas, aguardando para saltar em direção ao hospedeiro quando ele se aproxima. Como acontece com *S. carpocapsae* Weiser, 1955, que são adaptados a infectar hospedeiros que ficam ou vivem próximos ou na superfície do solo (Koppenhöfer et al., 1997; Kaya, 2002). Já, os JIs com estratégia “cruiser” procuram ativamente seus hospedeiros, movimentando-se pelo solo, provavelmente atraídos por dióxido de carbono, fezes e outras substâncias químicas liberadas pelos hospedeiros (Lewis, 2002) Como acontece com *S. glaseri* (Steiner, 1929) Wouts et al., 1982 e *H. bacteriophora* Poinar, 1976. Esses últimos são mais efetivos contra insetos de pouca mobilidade no solo, enquanto que os primeiros, com estratégia “ambusher”, são mais efetivos contra alvos móveis. Existem também algumas espécies com comportamento intermediário aos descritos anteriormente, fazendo nictação por algum tempo e também se movimentando no solo, como por exemplo, *S. feltiae* (Filipjev, 1934) Wouts, Mracek, Gerdin & Bedding, 1982 (Campbell e Gaugler, 1997; Lewis et al., 1992).

2.4. Breve histórico sobre *Heterorhabditis indica* linhagem LPP30

Dentre os nematoides entomopatogênicos da espécie *Heterorhabditis indica* Poinar, Karunakar & David, 1992, a linhagem *H. indica* LPP 30 foi identificada e caracterizada por Minas, 2012. Os estudos com várias linhagens de *H. indica* têm mostrado que eles causam altas taxas de mortalidade, tanto em laboratório quanto no campo, a diferentes espécies de insetos. Com isso, *H. indica* tornou-se uma das espécies de NEPs comercializadas e utilizadas pelos agricultores para controle de insetos pragas nos Estados Unidos.

Diversos trabalhos têm mostrado o controle biológico de *Diaprepes abbreviatus* Hustache, A., 1929 (nome provisório), considerada praga agrícola dos pomares de citros nos Estados Unidos, com o nematoide *H. indica* Hom1 (Duncan et al., 2007; El-Borai et al., 2009; McCoy et al., 2000; Stuart et al., 2008) e para controle do gorgulho da goiaba *Conotrachelus psidii* (nome provisório) com a linhagem *H. indica* LPP1, no Brasil, (Dolinski et al., 2006).

2.4.1. Obtenção da linhagem *Heterorhabditis indica* LPP 30

A linhagem *H. indica* LPP 30 foi isolada de uma propriedade localizada no município de Campos dos Goytacazes, estado do Rio de Janeiro, utilizando-se como armadilha lagartas vivas de *Galleria mellonella* L. de 6º instar (Lepidoptera: Pyralidae) (Kaya e Stok, 1997; Minas, 2012).

2.5. Fungos Nematófagos

Os fungos nematófagos são encontrados em uma ampla gama de habitats do solo em todas as partes do mundo e ocorrem de duas formas básicas (Kaya, 2002). Em uma delas, os fungos predadores capturam os nematoides usando hifas especializadas (trapping), na outra, fungos são endoparasitas obrigatórios. Em ambas as formas, as hifas consomem o conteúdo do corpo dos nematoides e esporulam interna ou externamente. Alguns fungos nematófagos mostram especificidade ao hospedeiro e outros parecem ser generalistas. Contudo, um fungo generalista pode mostrar maior virulência contra uma espécie de nematoide em relação à outra (Jaffe e Muldoon, 1995; Kaya, 2002).

Os fungos nematófagos possuem diferentes mecanismos de ação, o que permite agrupá-los em diferentes grupos: endoparasitas, predadores e ovícidas ou oportunistas, que são parasitas de ovos, cistos e fêmeas. Existe ainda um quarto grupo conhecido como fungos produtores de metabólitos tóxicos, que também são classificados como fungos nematófagos (Graminha et al., 2001, Gray 1988; Jatala, 1986) (Tabela 1).

Tabela 1. Espécies de fungos nematófagos agrupados de acordo com as diferentes estratégias de captura de nematoides.

Estruturas	Espécies
Redes adesivas	<i>Arthrobotrys oligospora</i> , <i>A. conoides</i> , <i>A. musiformis</i> , <i>A. superba</i> , <i>Duddingtonia flagrans</i>
Ramos adesivos	<i>Monacrosporium gephyropagum</i>
Botões adesivos	<i>M. ellipsosporum</i> , <i>M. haptotylum</i>
Anéis constritores	<i>A. dactyloides</i> , <i>A. brochopaga</i>
Botões adesivos e esporos adesivos	<i>Nematoctonus concurrens</i>
Esporos adesivos	<i>N. leiosporus</i> , <i>Drechmeria coniospora</i> , <i>Hirsutella rhossiliensis</i>
Esporos ingeridos	<i>Podocrella harposporifera</i> (sin. <i>Harposporium anguillulae</i>)
Zoósporo	<i>Catenaria anguillulae</i> , <i>Haptoglossa dickii</i>
Hifas adesivas	<i>Stylopage hadra</i>
Gotas tóxicas	<i>Pleurotus ostreatus</i>
Apressório	<i>Pochonia chlamydosporia</i>

Fonte: adaptado de Nordbring-Hertz et al., (2006).

2.5.1. Fungos endoparasitas

Os fungos endoparasitas são capazes de infectar os nematoides por meio de esporos, que podem ser ingeridos (Mota et al., 2003) ou se aderir à cutícula do nematoide. Em seguida, os esporos germinam e emitem hifas que atravessam a

cutícula do nematoide e usam o conteúdo pseudocelômico para nutrição (Ferraz et al., 2010).

Os fungos endoparasitas não produzem micélio extenso, mas são capazes de infectar os nematoides através da produção de tubos de liberação de esporos, conidióforos ou conídios (Araújo et al. 2004; Mota et al., 2003). A maioria dos fungos endoparasitas é parasita obrigatório e por isso possuem uma faixa restrita de hospedeiros. Por essa razão, a sua utilização e produção *in vitro*, para uso no controle biológico de nematoides são menores, tendendo a uma limitação de mercado e produção em escala industrial onerosa (Braga, 2008).

O fungo *Podocrella harposporifera* (Samuels) P. Chaverri & Samuels (sin. *Harposporium anguillulae* Lohde, 1874), é um endoparasita que produz uma grande quantidade de pequenos conídios em forma de meia-lua. Para infectar os nematoides, os conídios têm que ser ingeridos por ele quando este está se alimentando de bactérias ou de pequenas partículas orgânicas. Os conídios, devido ao seu formato, geralmente se alojam na porção anterior do canal alimentar dos nematoides onde germinam, originam hifas e assim conseguem invadir os tecidos do hospedeiro, destruindo seus órgãos internos. Nesse caso, o crescimento do fungo se dá de dentro para fora, e é durante este crescimento que ocorre a formação dos conidióforos que rompem a cutícula do nematoide e alcançam o exterior do corpo. Ao chegarem ao exterior, várias células conidiogênicas esféricas são produzidas. *P. harposporifera* também produz clamidósporos, geralmente após a conidiogênese, quando parte da hifa assimilativa desenvolve estas estruturas de parede espessa. Estes clamidósporos têm capacidade de produzir conidióforos secundários (Charles et al., 1996).

Estudos mostram que quando a cutícula do segundo estágio de alguns nematoides é mantida, os fungos endoparasitas não conseguem infectar esses nematoides. Jansson et al., (1985) tentaram infectar, sem sucesso, larvas de *Ostertagia ostertagi* Stiles, 1892, *Ostertagia circumcincta* Stadelmann, 1894, *Haemonchus contortus* Rudolphi, 1803 e *Trichostrongylus colubriformis* Giles, 1892 com o fungo *Drechmeria coniospora* (Drechsler) W. Gams & H.-B. Jansson. Contudo, quando a cutícula da larva de segundo estágio foi removida, o fungo foi capaz de infectar.

Estudos com nematoides entomopatogênicos, mostraram que o *Sterneinema* sp. é mais susceptível a à infecção por conídios de dois fungos

endoparasitas (*Hirsutella rhossiliensis* Minter & B.L. Brady e *D. coniospora*) do que *Heterorhabditis* sp., uma vez que os JIs deste último tendem a manter a cutícula do segundo estágio como uma capa protetora. Neste caso, com esses resultados, os autores puderam sugerir que o nematoide entomopatogênico *Heterorhabditis* sp. tende a ser melhor agente biológico de controle de pragas (Timper e Kaya, 1989).

2.5.2. Fungos predadores

Os fungos nematófagos predadores são os organismos antagonistas de nematoides mais pesquisados por se mostrarem capazes de reduzir efetivamente a população de nematoides, tanto em condições de laboratório quanto no campo (Larsen, 1999).

Os fungos predadores permanecem no solo mesmo na ausência do nematoide, apresentam pouca especificidade pelo nematoide, são facilmente produzidos em meio de cultura e produzem estruturas de captura ao longo de suas hifas, denominadas armadilhas (Ferraz et al., 2010). Após apreenderem o nematoide, o fungo penetra com suas hifas pela cutícula do mesmo, crescendo e digerindo seu conteúdo interno.

As armadilhas formadas pelos fungos predadores apresentam características particulares, conforme a espécie, podendo ser: hifas adesivas não modificadas outridimensionais, nódulos adesivos, anéis constritores e não constritores (Figura 1) (Ferraz, et al., 2010).

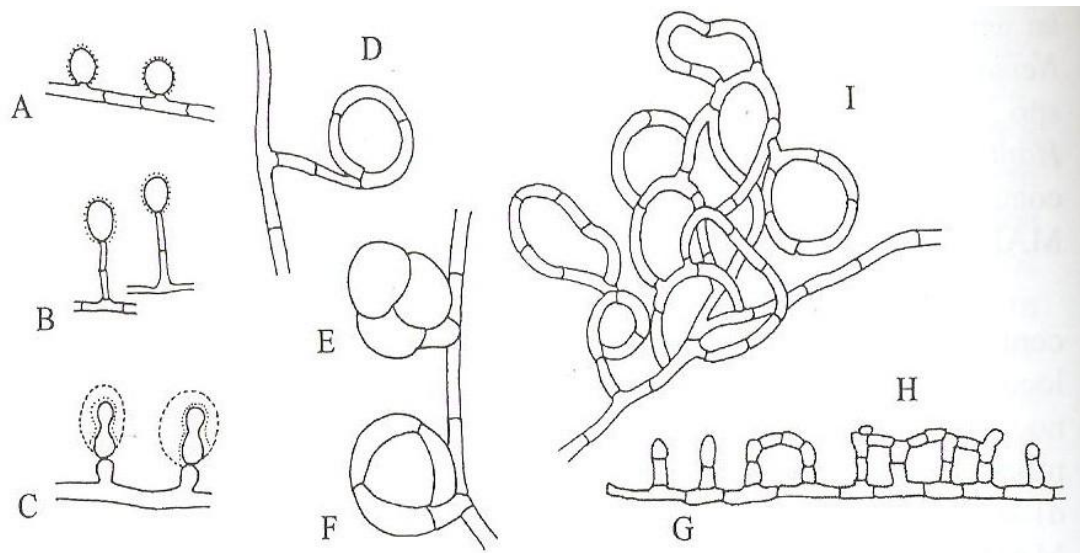


Figura 1. Hifas de fungos predadores especializadas na captura de nematóides nematoides: nódulos adesivos sésseis (A); nódulos adesivos em talos (B); nódulos adesivos com formato de ampulheta (C); anel não constritor (D); anel constritor fechado (E); e aberto (F); ramificações adesivas (G); rede adesiva bidimensional (H); e rede adesiva tridimensional (I) (Ferraz, et al., 2010).

Além das hifas, os conídios também podem produzir armadilhas. Essas armadilhas ocorrem possivelmente em resposta a substâncias estimulantes que se difundem das fezes, com relação aos nematoides parasitos de animais.

As armadilhas mais comuns em fungos predadores são as redes adesivas, encontradas em várias espécies como *Arthrobotrys musiformis* Drechsler, *Arthrobotrys oligospora* Fresen e *Arthrobotrys thaumasia* (Drechsler) S. Schenck, W.B. Kendr. & Pramer (sin. *Monacrosporium thaumasium* (Drechsler) de Hoog & Oorschot). Os nódulos adesivos são células morfológicamente distintas, cobertas por uma substância adesiva, sendo encontradas em *Gamsylella phymatopaga* (Drechsler) M. Scholler, Hagedorn & A. Rubner (sin. *M. phymatopagum* (Drechsler) Subram.) e *Dactylellina ellipsospora* (Preuss) M. Scholler, Hagedorn & A. Rubner (sin. *M. ellipsosporum* Preuss). Anéis não constritores são raros e ficam passivamente alojados no corpo do nematoide. Na tentativa de se livrar do anel, o nematoide agita o seu corpo, ficando cada vez mais preso a ele. Exemplos desse tipo de armadilha são observados em *Dactylella leptospora* Drechsler (sin. *M. leptosporum* (Drechsler) A. Rubner e

Dactylellina candida (Nees) Yan Li (sin. *Arthrobotrys candida* (Nees) S. Schenck, W.B. Kendr. & Pramer). Os anéis constritores são considerados os esquemas de armadilhas mais grosseiros e são constituídos por três células arcadas ou arqueadas unidas à hifa por um talo com aproximadamente de 20 a 40 µm de diâmetro interno. Ocorre em *Arthrobotrys dactyloides* Drechsler, *A. brochopaga* (Drechsler) S. Schenck, W.B. Kendr. & Pramer e *Monacrosporium bembicodes* (Drechsler) Subram. (Ferraz et al., 2010).

A divisão dos fungos predadores foi proposta por Cooke em 1963, baseando-se na velocidade do crescimento micelial. Sendo assim, os fungos de crescimento mais rápido formarão armadilhas tipo redes tridimensionais; já os fungos de crescimento intermediário formarão as armadilhas tipo nódulos; e aqueles com crescimento mais lento formarão anéis constritores. Os fungos formadores de redes são reconhecidos como os mais competitivos em relação à microbiota do solo (Braga, 2008).

Há mais de 50 espécies de fungos predadores que capturam e matam nematoides no solo, sendo *Arthrobotrys* Corda, *Duddingtonia* R.C. Cooke e *Monacrosporium* Oudem os gêneros mais importantes estudados em programas de controle biológico de nematoides parasitos de animais (Araújo et al. 2004; Dimander et al., 2003). Atualmente estes dois últimos gêneros foram reclassificados e passaram a ser sinônimas do gênero *Arthrobotrys* (Index Fungorum, 2013).

2.5.2.1. Gênero *Duddingtonia*

O gênero *Duddingtonia* foi descrito em 1969 por Cooke. A espécie *D. flagrans* (Dudd.) R.C. Cooke. preda nematoides por meio de hifas adesivas tridimensionais produzidas pelo micélio após o contato físico com larvas de nematoides (Grønvold et al., 1996). É a espécie mais estudada no controle dos nematoides gastrintestinais de animais domésticos (Mota et al., 2003). É importante ressaltar ainda, que este fungo tem capacidade de sobreviver à passagem pelo trato gastrointestinal de ruminantes, sendo uma característica importante na condição de um controlador biológico (Waller et al., 2001), além da praticidade de utilização. Dessa forma, o fungo seria empregado via oral e após passagem pelo trato digestivo, se desenvolveria nas fezes juntamente com as

larvas atingindo-as e como consequência, ocasionando a redução da carga parasitária no bolo fecal (Nordbring-Hertz et al., 2006; Larsen, 1999).

De acordo com Sanyal et al. (2004), *D. flagrans* é empregado com sucesso no controle biológico em razão da grande produção de clamidosporos e à sua resistência a condições adversas e isto tem atraído muito a atenção e se tornado foco de pesquisas para viabilizar sua utilização no controle biológico de zooparasitas em diversos animais (Braga et al., 2010; Chandrawathani et al., 2004; Sanyal et al., 2004).

2.5.2.2. Gênero *Arthrobotrys*

O gênero *Arthrobotrys* reúne um grande número de espécies de fungos nematófagos e foi descrito por Corda em 1839, originário de amostras de solo. Porém, naquela época, a capacidade de predação de nematoides não foi mencionada. As espécies pertencentes ao gênero formam conídios blásticos de até três septos, com formato ovoide, proliferando-se na extremidade dos conidióforos (Mota et al., 2003) que são produzidos de forma simpodial em abundância sobre os conidióforos (Zhang et al., 1996b).

Espécies do gênero *Arthrobotrys* têm sido encontradas em solos com alto conteúdo de matéria orgânica, em substratos para cultivo de cogumelos e em solos próximos às excreções de gado estabulado (Kanitkar e Kanitkar, 2003).

A. oligospora é um dos fungos mais comumente detectados nos solos de todo o mundo (Ribeiro et al., 1999). Foi relatado pela primeira vez no Irã em amostras de solos e de fezes de ovinos (Ghahfarokhi et al. 2004).

2.5.2.3. Gênero *Monacrosporium*

Este gênero *Monacrosporium* foi primeiramente descrito por Oudemans em 1885. As espécies deste gênero são caracterizadas por produzirem apenas um conídio na extremidade do conidióforo. Os conídios são hialinos, fusiformes, com dois a quatro septos transversais, sendo que a célula intermediária é maior que as das extremidades. A espécie *M. thaumasium* (atualmente *Arthrobotrys thaumasia*) preda nematoides por meio de redes adesivas, produz conídios medindo entre 27-49 µm de comprimento por 15-23 µm de largura. O conidióforo

é ramificado próximo à extremidade, na qual cada uma carrega um conídio (Zhang et al., 1996a).

2.5.3. Fungos ovicidas ou oportunistas

Os fungos ovicidas ou oportunistas são parasitas de ovos, cistos e fêmeas de nematoides parasitos de plantas e de animais. Além disso, são saprofíticos e por essa razão, não dependem da presença do nematoide no solo para sua sobrevivência, sendo por isso facilmente cultivados em laboratório (Braga, 2008). Estes fungos colonizam fêmeas e ovos de fitonematoides, principalmente dos gêneros *Meloidogyne* spp., *Heterodera* spp. e *Globodera* spp., não exercendo parasitismo sobre as formas móveis do patógeno (Ferraz et al., 2010).

As hifas penetram do ovo, através dos pequenos poros existentes na camada vitelínica, causando alteração na permeabilidade da casca e expandindo seu volume. Aumentam de tamanho e atravessam a camada quitínica e lipídica adjacente. Como consequência desse processo, a camada vitelínica se divide, a camada de quitina se torna vacuolizada e a de lipídios dispersa. Hifas endógenas emergem do ovo e produzem conidióforos, funcionando como fonte de conídios (Mota et al., 2003).

Utilizando ovos de *Meloidogyne javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949, Lopez-Llorca et al. (2002) verificaram a formação de apressório, uma estrutura de penetração em superfícies hidrofóbicas e o envolvimento de uma enzima do tipo protease nos eventos iniciais que antecedem a penetração do fungo.

No controle biológico dos fitonematoides, os fungos nematófagos considerados mais promissores por muitos pesquisadores, são os fungos: *Metacordyceps chlamydosporia* (H.C. Evans) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora (sin. *Pochonia chlamydosporia* (Goddard) Zare & W. Gams) e *Purpureocillium lilacinum* (Thom) Luangsa-ard, Hywel-Jones & Samson (sin. *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson) (Chen e Dickson, 2004; Jatala, 1986; Siddiqui e Mahmood, 1996) (Figura 2). Os fungos oportunistas têm grande potencial como agente de controle biológico, pois reduzem 70 a 90% os níveis de ovos viáveis no solo (Ciarmela et al., 2002).

No entanto, nos estudos que envolvem o controle dos nematoides parasitos de animais, a maioria desses nematoides produz ovos que rapidamente darão origem a larvas, dificultando o processo de interação dos fungos com os ovos (Braga, 2008). Um exemplo são os ovos de nematoides trichostrongilídeos que se desenvolvem rapidamente após a deposição do bolo fecal nas pastagens (menos de 24 horas) podendo, portanto, limitar a atuação dos fungos que utilizam desta estratégia (Lýsek e Krajsí, 1987).

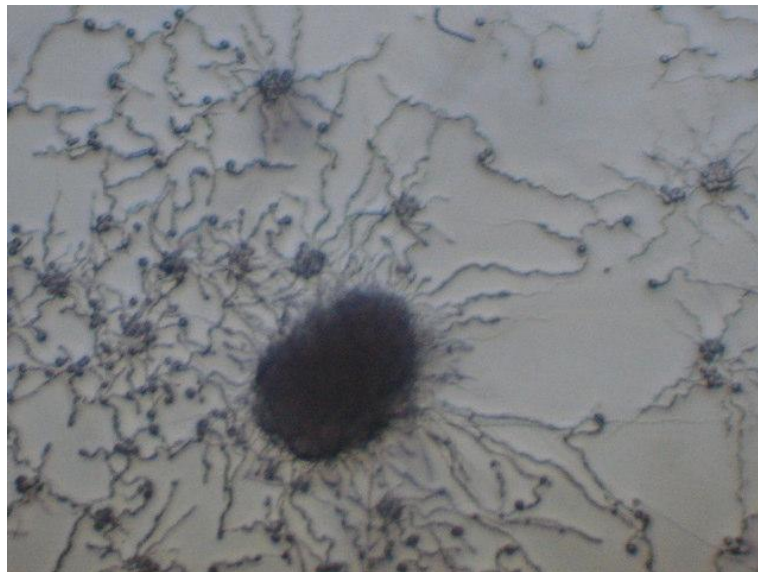


Figura 2. Ovo do nematoide *Meloidogyne incognita* colonizado pelo fungo *Metacordyceps chlamydosporia* (sin. *Pochonia chlamydosporia*) (Fonte: Nunes, 2008).

2.5.4. Fungos produtores de metabólitos tóxicos

Os metabólitos tóxicos produzidos por fungos podem exercer efeito sobre a eclosão, mobilidade e capacidade de penetração dos nematoides no hospedeiro, ou ainda alterar a fisiologia da planta, tornando-a menos atrativa aos nematoides (Khan et al., 1984). Nos estudos envolvendo filtrados de fungos dos gêneros *Pochonia* Bat. & O.M. Fonseca, *Aspergillus* P. Micheli, *Pleurotus* (Fr.) P. Kumm., *Penicillium* Link, *Paecilomyces* Bainier, *Trichoderma* Pers., *Myrothecium*

Tode e *Fusarium* Link apresentaram efeito nematotóxico (Ameen, 1991; Ayatollahy et al., 2008; Chen et al., 2000; Costa et al., 2001; Nitão et al., 1999). O conhecimento sobre o efeito de possíveis micotoxinas no controle de nematoides ainda é limitado, carecendo de investigações mais detalhadas. Extratos purificados de *Penicillium* sp., *P. oxalicum* Currie & Thom, *P. anaticum* Stolk e *Aspergillus niger* Tiegh., a 100 e 200 ppm (Molina e Da Vide, 1986), de *Fusarium* spp. (Ciancio et al., 1988) apresentaram elevada atividade nematicida contra *M. incognita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1949. *Trichoderma* spp. produz substâncias capazes de inibir a eclosão e a mobilidade de juvenis de *M. incognita* (Meyer et al., 2000).

A prospecção por substâncias nematicidas produzidas por fungos é uma abordagem que deve ser encorajada e que pode resultar em produtos eficientes e menos tóxicos (Kerry, 1990) ao meio ambiente.

2.5.5. Formas de atuação

A infecção de nematoides por fungos nematófagos envolve uma sequência de eventos: o contato e adesão das estruturas de infecção na superfície do nematoide e penetração da cutícula, seguido de digestão e assimilação dos tecidos internos (Ahman et al., 1996).

Segundo Nordbring-Hertz et al., (2006), em *A. oligospora*, as redes tridimensionais são rodeadas por uma camada de fibrilas extracelulares mesmo antes da interação com os nematoides. Após o contato as fibrilas começam a se dirigir para a superfície do hospedeiro, provavelmente para facilitar a adesão e a futura invasão fúngica dos nematoides. O fungo endoparasita *D. coniospora* possui um tipo completamente diferente de adesão que mostra ser composto por fibrilas que irradiam independente do contato com os nematoides. Além disso, os esporos de *D. coniospora* aderem especificamente a órgãos sensoriais na região anterior dos nematoides. A composição química da superfície das fibrilas dos fungos nematófagos não é conhecida em detalhes, mas ambos possuem proteínas e polímeros de carboidratos.

Atividades enzimáticas hidrolíticas provavelmente estão envolvidas durante a penetração do fungo na cutícula do nematoide. Essas enzimas atuam solubilizando as macromoléculas da cutícula. Além disso, a atividade de pressão

mecânica também é gerada pela penetração do fungo. A cutícula do nematoide é composta principalmente de proteína, incluindo colágeno. Diversas proteases que podem hidrolisar essas proteínas da cutícula têm sido isoladas dos fungos nematófagos. Essas proteases pertencem à família de serino proteinases e após obter dados do sequenciamento, tem sido demonstrado a alta homologia com um tipo de protease de serina, a subtilisina (Ahman et al., 1996; Bonants et al., 1995). No endoparasita *D. coniospora*, uma das proteases, a quimiotripsina parece estar envolvida no processo de penetração. Estudos detalhados da produção da subtilisina PII por *A. oligospora* indicaram que este tipo de protease pode ter numerosas funções (Ahman et al., 2002). Assim, além de estar envolvida na penetração e digestão da cutícula e tecidos dos nematoides infectados, PII parece ter uma atividade nematóxica (Nordbring-Hertz, et al., 2006).

Dentro do nematoide, o tubo de penetração de *A. oligospora* se expande para formar um grande bulbo de infecção. Nessa fase, ocorre o desenvolvimento do bulbo e das hifas tróficas em paralelo com mudanças na ultraestrutura e fisiologia do fungo. O processo de penetração está associado à presença de corpos densos, ricos em enzimas, encontrados apenas nas armadilhas, e ausentes nas hifas vegetativas comuns. Os corpos densos são organelas citoplasmáticas, que possuem um núcleo denso rodeado por uma única membrana, com propriedades comuns aos peroxissomos, contendo ácido oxidase e catalase D-aminoácidos, que são enzimas peroxissomais. Em *A. oligospora*, os corpos densos se desenvolvem a partir de regiões especializadas do retículo endoplasmático (Veenhuis et al., 1984) e desaparecem das armadilhas invasoras no momento da penetração no nematoide. Foi sugerido que eles têm uma função específica durante a formação do tubo de penetração no nematoide. O bulbo e as hifas tróficas, tipicamente, contêm células normais, organelas e retículo endoplasmático, sendo particularmente bem-desenvolvido (Nordbring-Hertz, et al., 2006).

Em fases posteriores as gotículas de lipídios são acumuladas nas hifas tróficas, as quais estão provavelmente envolvidas na assimilação e armazenagem de nutrientes obtidos do nematoide infectado. Juntamente com a formação de gotículas de lipídios, outra forma que *A. oligospora* utiliza para armazenar nutrientes derivados do hospedeiro é a produção de grandes quantidades de lectina no citoplasma, designada *Arthrobotrys oligospora* lectina (AOL) (Rosén et

al., 1997). Durante a infecção dos nematoides, AOL é rapidamente sintetizada em *A. oligospora*, uma vez que já tenha começado a penetração e a digestão. Grandes quantidades dessa proteína são acumuladas nas hifas tróficas crescendo dentro do nematoide. Mais tarde, a lectina é transportada do nematoide infectado para outras partes do micélio, onde pode ser degradado e disponibilizado para crescimento dos fungos. Em contraste com a formação das armadilhas, o fungo endoparasita *D. coniospora* não forma um bulbo de infecção sobre a penetração e não tem corpos densos, os quais são tipicamente formados pelos fungos predadores (Nordbring-Hertz, et al., 2006).

No processo que envolve a formação dos anéis constritores, quando um nematoide se move para o anel, o fungo dispara uma resposta na qual as três células que compõem o anel, rapidamente se expandem para dentro e se fecham em volta do nematoide. Outros estímulos, tais como, toque de uma agulha na superfície de um anel ou calor, também podem acionar o fechamento da armadilha. A reação é rápida (0,1 segundo), irreversível, e é acompanhada de um grande aumento no volume da célula, levando a armadilha ao fechamento quase total do anel (Nordbring-Hertz et al., 2006).

2.6. Fungos nematófagos X Nematoides entomopatogênicos

Estudos com NEPs mostraram que a suscetibilidade aos fungos pode variar entre as espécies (Timper et al., 1991). Conídios do fungo endoparasita, *Hirsutella rhossiliensis* aderiram mais a cutícula de *S. glaseri* e *H. bacteriophora* do que a de *S. carpocapsae*, demonstrando adesão diferencial e, portanto diferente susceptibilidade fúngica. Esta observação foi realizada tanto artificial quanto naturalmente em solos infestados com este fungo. Assim, observaram-se maior mortalidade em JIs de *S. glaseri* do que de *H. bacteriophora* e *S. carpocapsae*, provavelmente devido à ausência da cutícula do segundo estágio e ao comportamento de busca pelo hospedeiro, “cruiser”. *S. carpocapsae* foi menos susceptível ao fungo *H. rhossiliensis* devido ao comportamento de busca “ambusher” (Kaya, 2002).

Em experimentos realizados na Flórida por Duncan et al., (2007), foram identificados os fungos *A. oligospora*, *A. musiformis* e *Gamsylella gephyropaga* (Drechsler) M. Scholler, Hagedorn & A. Rubner que mataram os NEPs *S. riobrave*

Cabanillas, Poinar & Raulston, 1994. Contudo, o dobro de NEPs foi morto pelo fungo *Catenaria* Sorokin, nos bioensaios realizados com o intuito de verificar se o aumento de NEPs desencadearia mudanças na cadeia alimentar, que poderia diminuir a eficácia dos NEPs no controle do bicudo do citros *Diaprepes abbreviatus*, uma importante praga dos pomares de citros na Flórida, onde diversos estudos vêm sendo realizados sobre o comportamento e as interações dos nematoides entomopatogênicos e os fungos nematófagos (Duncan et al., 2013; El-Borai et al., 2007; El-Borai et al., 2009; El-Borai et al., 2011; Pathak et al., 2012).

Os fungos nematófagos têm potencial como agentes de controle biológico de nematoides fitoparasitas (Kerry, 2000), mas podem também afetar nematoides entomopatogênicos. O fungo *H. rhouliensis*, tem recebido considerável atenção porque responde a densidade de nematoides (Jaffe, 1992), possuindo potencial para controle de nematoides fitoparasitas. No entanto, a sua gama de hospedeiros é ampla e incluem nematoides entomopatogênicos e de vida-livre (Kaya, 2002).

Além dos fungos nematófagos, também existe a competição com certos nematoides bacteriófagos de vida-livre que invadem os cadáveres hospedeiros (Campos-Herrera et al., 2012; Duncan et al., 2007; Marti e Timper, 1999).

2.7. Outros inimigos naturais X Nematoides Entomopatogênicos

Dentre os predadores invertebrados dos nematoides existem os ácaros e colêmbolas. Estudos mostram ácaros do gênero *Macrocheles* Latreille, 1829 alimentando-se de JIs de *S. carpocapsae* e outros trabalhos revelam que especialmente os ácaros mesostigmatas alimentam-se de nematoides (Kaya, 2002). Esses ácaros podem acessar os pequenos poros do solo que têm alto potencial reprodutivo e predam preferencialmente nematoides. Um estudo mostrou que o ácaro mesoestignata *Alycus roseus* Koch, 1842 e uma espécie de colêmbola, *Hypogastrura scotti* Yosii, completaram seu desenvolvimento, do último instar de ninfa para adulto, e produziram ovos viáveis alimentando-se de JIs de *S. carpocapsae* (Epsky et al., 1988). Outras duas espécies de colêmbolas *Folsomia candida* Willem, 1902 e *Sinella caeca* Schott 1896, foram observadas se

alimentando de JIs de *S. carpocapsae*, *S. feltiae* e *S. glaseri* (Gilmore e Potter, 1993; Kaya, 2002).

Onívoros e “scavengers” podem desempenhar um papel importante no dinamismo das populações de NEPs. Os hospedeiros mortos pelos NEPs permanecem no solo por 7-15 dias ou mais (dependendo da espécie de nematoide e das condições ambientais). Durante este período, os cadáveres podem ser consumidos por onívoros ou “scavengers”. Estudos realizados por Baur et al., (1998) no campo mostram que diversas espécies de formigas alimentam-se mais de insetos mortos por *Steinernema* do que por insetos mortos por *Heterorhabditis*. Experimentos com a formiga argentina *Linepithema bumile* Mayr, 1868 foram realizados colocando cadáveres perto de trilhas da formiga, e a maior alimentação foi observada nos cadáveres mortos por *Steinernerma*. A não preferência pelos insetos mortos por *Heterorhabditis* foi atribuída a um fator de impedimento, associado à bactéria simbiote *Photorhabdus luminescens* (Thomas e Poinar 1979) Boemare et al. 1993, associada a *H. bacteriophora*.

Em experimento realizado em pomar de goiabeiras na área experimental do campus da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro foram observadas duas espécies de formiga do gênero *Ectatomma* removendo insetos cadáveres, infectados por *H. baujardi* Phan, Subbotin, Nguyen & Moens, 2003, linhagem LPP7, localizados a 5 cm de profundidade da superfície do solo (Del Valle et al., 2009).

3. TRABALHOS

3.1. Nematode Community and nematophagous fungi associated to entomopathogenic nematode *Heterorhabditis indica* LPP 30 in a guava orchard

Liliana P. Ribeiro, Anália Arêdes e Cláudia Dolinski*

LEF/CCTA/Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,

Av. Alberto Lamego, 2000, 29013-602

* Corresponding author Claudia Dolinski, claudia.dolinski@censanet.com.br

Submitted to Nematologia Brasileira

Summary - Ribeiro, L.P., Arêdes, A. & Dolinski, C. 2013. Nematode Community and nematophagous fungi associated to entomopathogenic nematode *Heterorhabditis indica* LPP 30 in a guava orchard.

Survival of entomopathogenic nematodes can be affected by nematophagous fungi. In this sense, the aim of this study was to identify the community of nematophagous fungi and nematodes associated with soil *Heterorhabditis indica* LPP30 under two different types of crops, conventional and organic conversion, in a commercial guava orchard, where this species was originally found. Also, evaluate that the nematophagous fungi and nematodes community suffer changes after the elimination of guava orchard. The experiment was conducted from August 2010 to February 2012 and consisted of two sub-areas, in conversion to organic and conventional management, divided into two periods of evaluation: when collections of samples were done during the cultivation of culture and in February 2012, two months after the removal of culture. The samples for the observation of the presence of NEP *H. indica* LPP 30, were performed using the technique insect trap with *G. mellonella*. For nematode community and isolation of nematophagous fungi were collected 500 g of soil from each area. The method for the isolation of nematophagous fungi was spreading soil and extraction of nematodes by the method of sucrose centrifugation. The identification was carried out on the genus level in 100 specimens collected randomly. The identifications were made with identification keys in optical microscope. We calculated the absolute abundance and Shannon diversity index. The identified fungi belong to the genera *Arthrobotrys* predators, in three isolated area in conversion to organic and three conventional area. In the last collection of the soil samples, in February 2012, found *Arthrobotrys musiformis*. Were identified 24,012 soil nematodes. The nematode community data showed variability over the 17-month evaluation. In general, it was observed that significantly decreases the community, two months after the removal of culture in both systems. However, with the withdrawal of the number of plant

nematodes decreases considerably and could not find the NEP *H. indica* LPP 30, during this period. Only the nematophagous fungi remained in place.

Keywords: organic cultivate, *Arthrobotrys*, throphic groups.

Resumo - Ribeiro, L.P., Arêdes, A. & Dolinski, C. 2013. Comunidade de nematoides e fungos nematófagos associada ao nematoide entomopatogênico *Heterorhabditis indica* LPP 30 em um pomar de goiaba.

A sobrevivência dos nematoides entomopatogênicos pode ser afetada pelos fungos nematófagos. Neste sentido, o objetivo deste estudo foi identificar os fungos nematófagos e comunidade de nematoides do solo associada à *Heterorhabditis indica* LPP30, sob dois diferentes tipos de cultivo, convencional e em conversão para orgânico, em um pomar comercial de goiaba, onde esta espécie foi originalmente encontrada. Além disso, avaliar os fungos nematófagos e se a comunidade de nematoides sofreria mudanças, após a eliminação do goiabal. O experimento foi realizado entre agosto de 2010 a fevereiro de 2012 e consistiu de duas subáreas; em conversão para manejo orgânico e convencional, dividido em dois períodos de avaliação: quando as coletas das amostras foram realizadas durante o cultivo da cultura e em fevereiro de 2012, dois meses após a remoção da cultura. As amostras para a observação da presença do NEP *H. indica* LPP 30, foram realizadas utilizando a técnica inseto-armadilha com *G. mellonella*. Para comunidade de nematoides e isolamento dos fungos nematófagos, foram coletados 500 g de solo de cada área. O método para o isolamento dos fungos nematófagos foi espalhamento de solo e a extração dos nematoides pelo método da flutação-centrifuga em solução de sacarose. A identificação foi realizada em nível de gênero em 100 espécimes coletados de forma aleatória. As identificações foram realizadas com chaves de identificação em microscópio óptico. Calculou-se a abundância absoluta e o índice de diversidade de Shannon. Os fungos identificados pertencem ao grupo predador do gênero *Arthrobotrys*, três na área isolada em

conversão para orgânico e três da área convencional. Na última coleta das amostras de solo, em Fevereiro de 2012, foi encontrado *Arthrobotrys musiformis*. Foram identificadas 24.012 nematoides do solo. Os dados da comunidade de nematoides apresentaram variabilidade ao longo dos 17 meses de avaliação. Em geral, observou-se que a comunidade diminui significativamente, dois meses após a retirada da cultura, em ambos os sistemas. No entanto, com a retirada das plantas o número de nematoides diminui consideravelmente e não foi possível encontrar o NEP *H. indica* LPP 30, nesse período. Apenas, os fungos nematófagos permaneceram no local.

Palavra-chave: conversion to organic cultivate, *Arthrobotrys*, grupos tróficos.

Introduction

Entomopathogenic nematodes (EPNs) are promising non-chemical alternatives for managing insect pests in a number of crops worldwide (Kaya *et al.*, 2006). The EPNs belonging to the families Heterorhabditidae and Steinernematidae are widely distributed in natural and agricultural soils throughout the world (Adams *et al.*, 2006). These nematodes have great potential in Integrated Pest Management programs (IPM) as shown in studies in guava orchards (Dolinski *et al.*, 2006; Del Valle *et al.*, 2009; Dolinski *et al.*, 2012; Minas, 2012).

The efficacy of these nematodes as pest control agents depends not only on environmental factors such as soil characteristics and agricultural management, but also on competition with other organisms in the soil (Duncan *et al.*, 2007). As such, nematodes participate in different niches of the food web, since they interact with many organisms, consuming and being consumed by soil fauna (Sánchez-Moreno & Ferris, 2007). As natural enemies we could cite mention bacteria, protozoa, Turbellaria, other nematodes,

Collembola, Acarine, Tardigrada, earthworms, fungi, and insects omnivores or scavengers (Kaya, *et al.*, 1998; Kaya, 2002; Karagoz *et al.*, 2007).

Florida, some of the organisms studied in association with EPNs include free-living bacterivorous nematodes. In (FLBN) that compete with EPNs in the weevil cadavers (Duncan *et al.*, 2003; Campos–Herrera *et al.*, 2012), nematophagous fungi (NF) that prey on EPNs, especially in the vicinity of the infected insect cadaver (Farrell *et al.*, 2006; Duncan *et al.*, 2007; Pathak *et al.*, 2012) and *Paenibacillus* bacterial ectoparasites of EPNs that reproduce in cadavers and impair EPN motility in soil (El-Borai *et al.*, 2005; Duncan *et al.*, 2007; Campos–Herrera *et al.*, 2011). Nematophagous fungi may be considered one of the most important groups of natural enemies that can affect the EPNs community (Timper *et al.*, 1991, Duncan *et al.*, 2007; El-Borai *et al.*, 2009). These fungi can inhabit different habitats (Gray, 1988) and have been found in all regions of the world, from the tropics to Antarctica (Nordbring-Hertz, *et al.*, 2006).

The aim of this study was to identify the nematophagous fungi and soil nematode community associated to *Heterorhabditis indica* Poinar, Karunakar & David LPP30, a promising species for biological control. We investigated the EPN food web under two different types of cultivation; conventional and in conversion to organic, at a commercial guava orchard where this EPN species was originally found (Minas, 2012). We also wanted to check the hypothesis that the nematophagous fungi and nematode community would change after eliminating the guava orchard.

Materials and Methods

Characterization of conventional and in conversion to organic areas

The experiment was conducted in a commercial guava orchard located at km 51 of BR 101 (21° 40' South latitude, 41° 18' West longitude) highway in Campos dos Goytacazes,

Rio de Janeiro, Brazil, where the process of conversion to organic cultivation began in 2008 (Minas, 2012). This experiment was conducted from August, 2010 to February, 2012. The space between lines used was 5 x 5 m with a variety of red guava 'Paluma'. The soil texture was 85% sand, 4% silt and 10% clay. The areas in conversion to organic and conventional were the pH 5.8 and 5.9 and OM 1.2 and 1.1%, respectively. The area was divided into two sub areas; in conversion to organic and conventional management, and each sub area had ten guava trees. The experiment consisted of two evaluation periods: when collections of samples were made in the cultivation of culture and when the collection was made in February 2012, two months after the removal of culture.

Soil sampling for nematode native *H. indica* LPP 30.

The samples for observation of the presence of NEP *H. indica* LPP 30, were performed using the technique of insect trap with caterpillars on the 6th instar *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) (Kaya & Stock, 1997). The EPNs was identified morphologically by optical microscope. These identifications were made at intervals of six months from the beginning to the end of the experiment.

Collection of soil samples

The area in conversion to organic and conventional consisted of ten trees each with two lines of embroidery. In each area, ten samples of 500 g of soil were taken randomly in rows growing under the canopy of trees, the depth 0-20 cm, with the aid of an auger. The samples were brought to the laboratory of Entomology and Plant Pathology at Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, being performed the isolated fungi and nematodes community.

Isolation and identification of nematophagous fungi

The method for isolation of nematophagous fungi has been the method of scattering the soil (Barron, 1977), modified by Santos *et al.* (1991) consists of using Petri dishes containing 2% agar water, in which were placed 2 g of soil samples in the center of Petri dishes. Then was added approximately 5000 JIs of *H. indica* LPP30 to attract fungi. The plates were incubated in BOD camera germination at 25 ° C in continuous dark. The observations were carried out daily, with the aid of an inverted microscope with an increase of 40 x (Biovera), from two days of the onset of incubation. After a week, weekly observations were made during two months. The detected fungi were transferred to Petri dishes containing agar-corn (2%), which was maintained for 15 days. Then we observed the growth of fungi and slides were prepared for observation and identification of the species. This observation was necessary to identify the FN with the aid of identification keys (Rubner, 1996) that take into account the types of body capture, shape and size of conidia and kinds of conidiophores formed. Subsequently, fungi were transferred to agar-agar (2%) where added after a period of seven days, approximately 1000 IJs of *H. indica* LPP 30, to observe the types of traps.

Nematode community

The nematodes were extracted from soil samples by flotation-centrifugation in sucrose solution, according to Jenkins (1964). The identification was carried out at the genus level in 100 specimens collected at random, the optical microscope with 40x magnification (Zeiss) (Mattos *et al.*, 2006). The identification was performed by identification keys of each trophic group (Mohammad, 1986; Jairajpuri & Ahmad, 1992; Hunt, 1993; De Ley *et*

al., 2003). The nematode *H. indica* LPP 30 was morphologically identified based on Minas (2012).

Ecological characterization and statistical analysis

Were collected and processed 340 soil samples. We calculated the absolute abundance (number of nematodes identified) and Shannon diversity indices of each sampled area.

The Shannon diversity index (H) takes into account the group richness and abundance, defined by: $H = - \sum p_i \cdot \log p_i$, where: $p_i = n_i / N$, n_i = importance value of each group, N = total importance values (Odum, 1983).

The data were tested for normality (Lilliefors) and homogeneity of variances (Bartlett). In treatments in which the difference of the deviations characterizing a sample of non-normal distribution was used to test non-parametric Wilcoxon test for the analyzes with only two units. The Kruskal-Wallis was tested for data with more than one sample, both with a significance level of 5%. The Shannon index was subjected to analysis of variance (ANOVA) and t test Hutcheson (Hutcheson, 1970) with the help of the application Past (Hammer *et al.*, 2003).

Results and Discussion

Nematophagous fungi

We found eight different isolates of nematophagous fungi in soil sample. The identified fungi belong to the group of predatory fungi of the genus *Arthrobotrys*, three isolated area in conversion to organic (CO1, CO2 and CO3) and three isolates from conventional area (CC1, CC2 and CC6). In the last collection of the soil samples, in February 2012, held when the orchard was cleared two months, we verified the presence of both isolates of the

genus *Arthrobotrys* (CC9 and CO7). These last two were classified as *Arthrobotrys musiformis* Drechsler.

The relationship nematophagous fungi and NEPs have been studied in citrus orchards in Florida (USA) where the application is made for NEPs biological control of *Diaprepes abbreviatus* Linnaeus (El-Borai *et al.*, 2007; El-Borai *et al.*, 2009 , El-Borai *et al.*, 2011; Pathak *et al.*, 2012, Duncan *et al.*, 2013). These studies have shown the potential of nematophagous fungi and the need for periodic applications of NEPs due to consumption by the nematophagous fungi (Duncan *et al.*, 2007; El-Borai *et al.*, 2009; Duncan *et al.*, 2013). In this study it was possible to evaluate the community nematophagous fungi and entomopathogenic nematodes, as assessed by Duncan *et al.* (2007), who identified the reduction of plant parasites and omnivores after augmentative application of *S. riobrave*. In previous studies, we observed differences in the responses to the application of exotic and native species, as was the case of the exotic species *S. riobrave* orchards in Florida. This species showed a neutral response to NF natives, only NEPs natives were attracted by native NF in agar. However, in the sand columns responses were different for all tested fungi, and the author noted the potential complexity in the responses of EPNs to NF, between the agar and sand columns (El-Borai *et al.*, 2011).

Community nematode

Our results, showed that were identified 24,012 soil nematodes. In the area in conversion to organic were identified to genus 10,521 nematodes classified into their respective trophic groups such as bacterial feeders (15%), plant parasitic (71%), predators plus omnivorous (14%) and fungal feeders (0.01%). In the conventional found 13,491 nematodes, separate into bacterial feeders (13%), plant parasitic (66%) predators plus omnivorous (21%) and fungal feeders (0%). Overall, the most abundant genera were

Hemicycliophora (42.4%), *Helicotylenchus* (21.9%), *Rhabditis* (12.0%) and *Aporcelaimus* (8.7%). The nematode community data showed population variability over the 17-months evaluation. In general, it was observed that the community decreases significantly two months after guava orchard be eliminated in both cropping systems, only plant parasitic showed no significant decrease in the number of individuals (Figure 1 and 2). By test nonparametric Wilcoxon there was significant difference between the areas among genus and trophic groups, except for *Rhabditis*. Moreover, to genus between collecting periods there was significant difference in the area under conversion to organic only *Rhabditis* and *Aporcelaimus*. However, in the conventional area there was significant difference to *Hemicicylophora*, *Rhabditis*, *Aporcelaimus* and *Mesodorylaimida*.

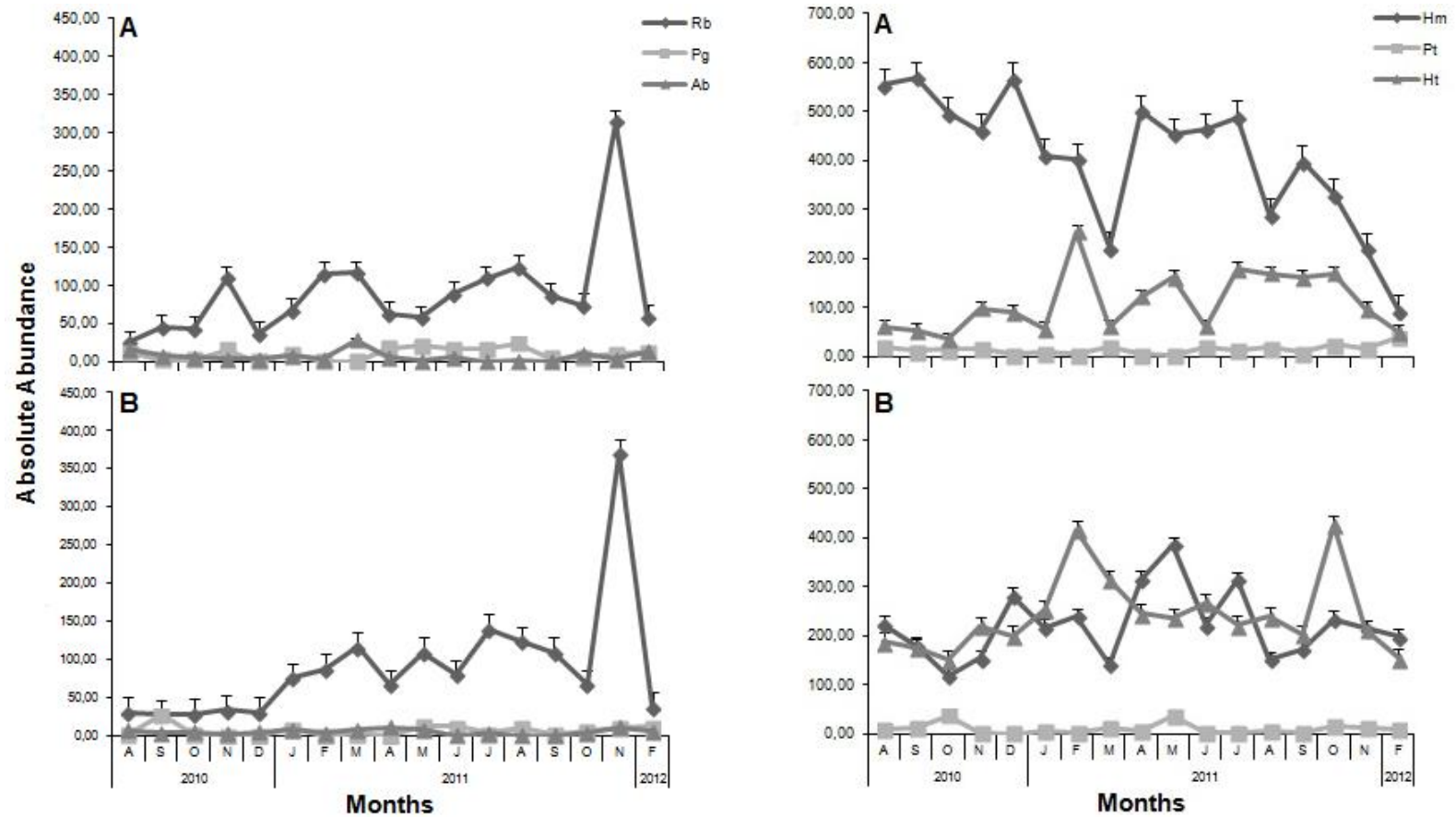


Figure 1 - Genera found in the conventional orchard (A) and in the conversion to organic orchard (B), separated into trophic groups. Bacterial feeders: *Rhabditis* sp. (Rb), *Panagrellus* sp. (Pg) *Acrobeloides* sp. (Ab); Plant parasites: *Hemicycliophora* sp. (Hm), *Pratylenchus* sp. (Pt) and *Helicotylenchus* sp. (Ht).

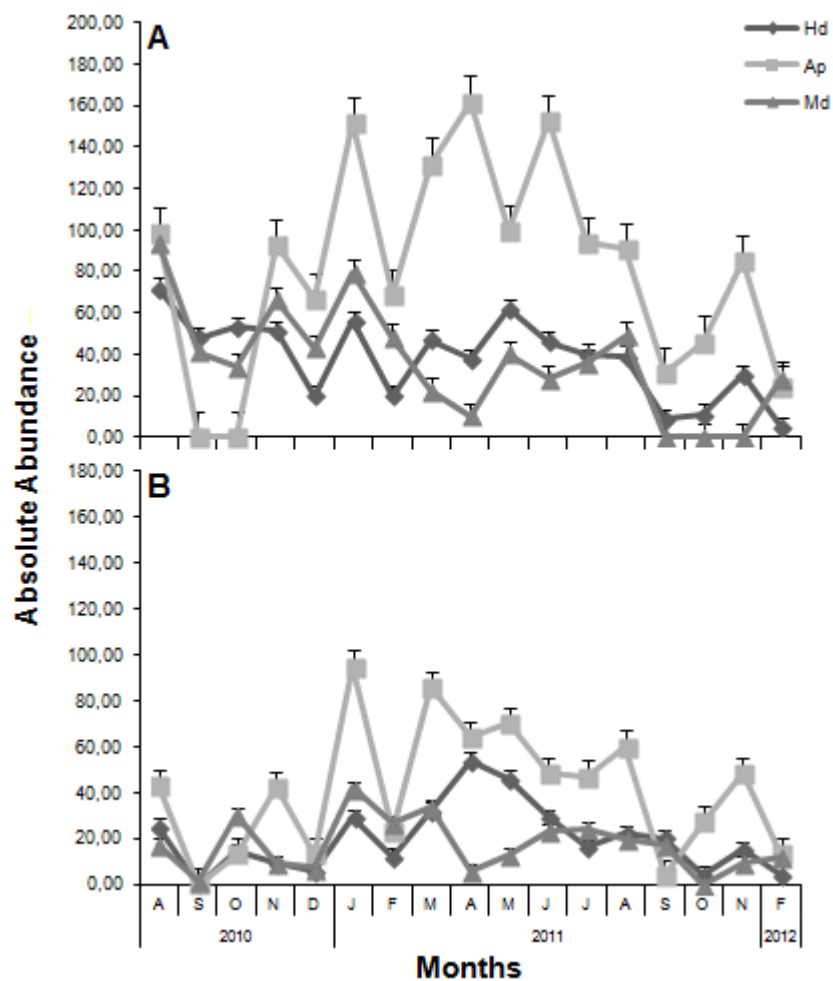


Figure 2 - Genera found in the conventional orchard (A) and in the conversion to organic orchard (B), separated into trophic groups. Predators plus Omnivores: *Handrocooides* sp. (Hd), *Aporcelaimus* sp. (Ap), *Mesodorylaimida* sp. (Md).

The largest absolute abundance of *Hemicycliophora* may indicate that probably the genus developed a relationship of parasitism on guava or some weed present in orchards evaluated. Regarding the higher absolute abundance of *Helicotylenchus* is probably due to the history of the area and proximity to crops cane sugar. This relationship was observed in some studies that reported having *Helicotylenchus* high degree of adaptation to the conditions of certain monocultures (Goulart *et al.*, 2003; Gomes *et al.*, 2003).

After about two months of elimination guava orchard, there was absence of entomopathogenic nematodes and decreased absolute abundance of soil nematodes. This

behavior is probably due to the fact that predatory nematophagous fungi have the ability to live as saprophytes, not requiring the presence of the host (Nordbring-Hertz *et al.*, 2006).

Duncan *et al.* (2007) showed that some of the dates were consistent with hypothesis that EPN augmentation can initiate cascades with successive bottom-up (population growth by natural enemies of nematodes) and top-down (greater predation of EPN) non-target effects that result in fewer EPN and reduced biological control. Furthermore, showed that one month following *S. riobrave* application, the EPN prevalence and non-target effects were also evident among omnivorous and plant parasitic nematodes. Some differences were observed between *Steinernema* sp. and *Heterorhabditis* sp., because nematode genus *Steinernema* sp. was more susceptible to infection with conidia of two endoparasitic fungi (*Hirsutella rhossiliensis* Minter and Brady and *Drechmeria coniospora*) than *Heterorhabditis* sp.. Since the IJs of *Heterorhabditis* tend to keep the second stage cuticle as a protective cover. In this case, this result suggests that the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis* sp. biological agent can be better pest control (Timper & Kaya, 1989).

The Shannon index showed greater diversity of nematodes in September 2011 for organic cultivation, despite the low rainfall during this period (Figure 3). However, in the conventional crops higher diversity was observed in February 2012 (Table 1). This result is probably related to a higher incidence of rainfall that occurred in January 2012 (Figure 3). In general, indices of shannon showed significantly different, between the areas in periods of higher rainfall incidence.

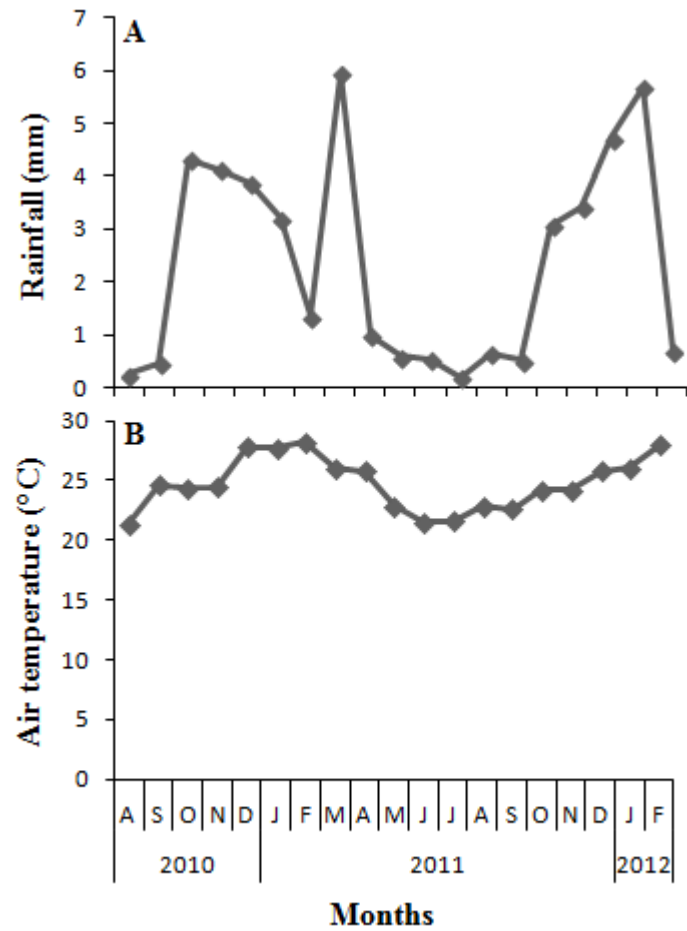


Figure 3 - Average of the rainfall (mm) and air temperature (°C) between August/2010 and February/2012. Data provided by the Meteorological Station Campus Dr. Leonel Miranda (UFRRJ).

Table 1 - Indices of Shannon (H') for nematode diversity between cropping system in conversion to organic and conventional for 17 month evaluation of soil in guava orchards in Northern Rio de Janeiro, RJ. Results of the t test at 5% probability. ns - not significant.

Evaluation period	Collection period	Organic	Conventional	t (p)
with guava orchard	August/10	1,45	1,46	ns
	September/10	1,04	0,98	ns
	October/10	1,58	1,23	1,763 (0,08)
	November/10	1,28	1,56	1,558 (0,123)
	December/10	1,05	1,10	ns
	January/11	1,72	1, 53	1,326 (0,187)
	February/11	1,24	1,45	1,511 (0,133)
	March/11	1,60	1,72	0,968 (0,333)
	Apr/11	1,44	1,37	ns
	May/11	1,62	1,47	1,021 (0,309)
	June/11	1,59	1, 59	ns
	July/11	1,53	1, 58	ns
	August/11	1,80	1,90	0,896 (0,372)
	September/11	1,87	1,71	1,524 (0,134)
	October/11	1,22	1,73	3,273 (0,001)
	November/11	1,50	1,76	1,488 (0,139)
	without guava orchard	February/12	1, 60	2,33

* Index calculated based on the formula presented by Odum, 1983.

According to Yeates (1999) factors such as crop management, soil type and climate affect the soil community. Pastures in New Zealand, it was observed that in the region with higher rainfall, there were a higher proportion of bacterial feeders. Experiments conducted in citrus orchards in the rain and dry season in the Distrito Federal of Brazil, showed higher numbers of bacterial feeders, fungal feeders, predators and plant parasites during the dry. Omnivores and predators dominated during the rain period (Freitas *et al.*, 2008). Similar behavior observed in this experiment from February 2011. However, treatment 2 conducted in the rainy season (February / 2012), showed, in general, fewer numbers of the individuals. In an experiment, conducted in Scottish pine forest, we observed a positive correlation between moisture and abundance of trophic groups of nematodes, although the effects of temperature and humidity have been different variables when analyzing organic soil layers. This variation may be due to environmental conditions or physical structure of the different layers and also depend on the specific composition of the different trophic groups horizons (Schouten *et al.* 1998). These factors, which were not analyzed in this experiment and that can affect the abundance of nematodes.

With respect to NEPs, it is also possible that the migration occurred seasonal soil column, as noted by Ram *et al.* (2008) during the summer period. In deep soils, lower temperatures and increased soil moisture may allow NEPs conserve their energy reserves yet conducive to return the upper layers and thus the search for hosts. However, it is possible that with the summer period, the population did not survive the high temperatures of the region, since the soil was exposed to the elements after the withdrawal of guava.

Conclusion

In conclusion, found *Arthrobotrys* sp. and *Arthrobotrys musiformis*. The nematofauna of both areas showed high amount of plant parasites, predators and bacterial feeders. Among them, *Rhabditis* sp., *Panagrellus* sp., *Acrobeloides* sp. and plant parasites,

Hemicycliophora sp., *Pratylenchus* sp., and *Helicotylenchus* sp. Predators and plus Omnivore, *Handrocoides* sp., *Aporcelaimus* sp., *Mesodorylaimida* sp. However, with the elimination of guava cultivate the number of individuals decreases considerably and could not find the entomopathogenic nematode *H. indica* LPP 30. Only nematophagous fungi remained in place.

Literature cited

ADAMS, B.J., A. FODOR, H.S. KOPPENHÖFER, E. STACKEBRANDT, S.P. STOCK, & M.G. KLEIN. 2006. Biodiversity and systematics of nematode-bacterium entomopathogens. *Biological Control*, 37:32-49.

CAMPOS-HERRERA, R., F.E. EL-BORAI, R.J. STUART, J.H. GRAHAM, L.W. & DUNCAN. 2011. Entomopathogenic nematodes, phoretic *Paenibacillus* spp., and the use of real time quantitative PCR to explore soil food webs in Florida citrus groves. *Journal of Invertebrate Pathology*, 108: 30-39.

CAMPOS-HERRERA, R., F.E. EL-BORAI & L.W. DUNCAN. 2012. Wide interguild relationships among entomopathogenic and free-living nematodes in soil as measured by real time qPCR. *Journal of Invertebrate Pathology*, 111: 126-135.

DE LEY, P., M. MUNDO-OCAMPO & I.T. DE LEY. 2003. Identification of Free living nematodes (Secernentea). University of California, Riverside. University Extension.

DEL VALLE, E.E., C. DOLINSKI, E.L.S. BARRETO & R.M. SOUZA. 2009. Effect of cadaver coatings on emergence and infectivity of the entomopathogenic nematode

Heterorhabditis baujardi LPP7 (Rhabditida: Heterorhabditidae) and the removal of cadavers by ants. *Biological Control*, 500: 21-24.

DOLINSKI, C., E.E. DEL VALLE, & R.J. STUART. 2006. Virulence of entomopathogenic nematodes to larvae of the guava weevil, *Conotrachelus psidii* (Coleoptera: Curculionidae), in laboratory and greenhouse experiments. *Biological Control*, 38: 422-427.

DOLINSKI, C., H.Y. CHOO & L.W. DUNCAN. 2012. Grower Acceptance of Entomopathogenic Nematodes: Case Studies on Three Continents. *Journal of Nematology*, 44 (2): 226-235.

DUNCAN, L.W., J.H. GRAHAM, D.C. DUNN, J. ZELLERS, C.W. MCCOY & K. NGUYEN. 2003. Incidence of endemic entomopathogenic nematodes following application of *Steinernema riobrave* for control of *Diaprepes abbreviatus*. *Journal of Nematology*, 35:178–186.

DUNCAN L.W., R.J. STUART, F.E. EL-BORAI, R. CAMPOS-HERRERA, E. PATHAK, M. GIURCANU & J.H. GRAHAM. 2013. Modifying orchard planting sites conserves entomopathogenic nematodes, reduces weevil herbivory and increases citrus tree growth, survival and fruit yield. *Biological Control*, 64: 26-36.

DUNCAN, L.W., J.H. GRAHAM, J. ZELLERS, D. BRIGHT, D.C. DUNN, F.E. EL-BORAI & D.L. PORAZINSKA. 2007. Food Web Responses to Augmenting the Entomopathogenic Nematodes in Bare and Animal Manure-Mulched Soil. *Journal of Nematology*, 39: 176-189.

- EL-BORAI, F.E., L.W. DUNCAN & J.F. PRESTON. 2005. Bionomics of a phoretic association between *Paenibacillus* sp. and the entomopathogenic nematode *Steinernema diaprepesi*. *Journal of Nematology*, 37: 18-25.
- EL-BORAI F.E, D, BRIGHT, J.H. GRAHAM, R.J. STUART & L.W. DUNCAN. 2009. Differential susceptibility of entomopathogenic nematodes to nematophagous fungi from Florida citrus orchards. *Nematology*, 11: 233-243.
- EL-BORAI, F.E., C.F. BRENTU & L.W. DUNCAN. 2007. Augmenting entomopathogenic nematodes in soil from a Florida citrus orchard: non-target effects of a trophic cascade. *Journal of Nematology*, 39: 203-210.
- EL-BORAI, F.E., R. CAMPOS-HERRERA, R.J. STUART & L.W. DUNCAN. 2011. Substrate modulation, group effects and the behavioral responses of entomopathogenic nematodes to nematophagous fungi. *Journal of Invertebrate Pathology*, 106: 347-356.
- FARRELL, F.C., B.A. JAFFEE & D.R. STRONG. 2006. The nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora* in soil of the Bodega marine reserve: distribution and dependence on nematode-parasitized moth larvae. *Soil Biology and Biochemistry*, 38:1422–1429.
- FREITAS, V.M., J.E. CARES, E.P. ANDRADE, & S.P. HUANG. 2008. The Influence of Citrus spp. on the Community of Soil Nematodes in the Dry and Rainy Seasons in Distrito Federal of Brazil. *Nematologia Brasileira*, 32: 20-32.

- GOMES, S.G., S.P. HUANG & J.E. CARES. 2003. Nematode Community, Trophic Structure and Population Fluctuation in Soybean Fields. *Fitopatologia Brasileira*, 28: 258-265.
- GOULART, A.M.C., A.R. MONTEIRO, & L.C.C.B. FERRAZ. 2003. Comunidades de nematoides em Cerrado com vegetação original preservada ou substituída por culturas. 2. Diversidade Taxionômica. *Nematologia Brasileira*, 27: 129-137.
- GRAY, N.F. 1988. Fungi attacking vermiform nematodes. In: Poinar GO, Jansson HB (eds), *Diseases of Nematodes*, vol. II. CRC Press, Boca Raton, p. 3-38.
- HAMMER, O., D.A. HARPER & P.D. RYAN. 2003. PAST – Paleontological Statistics ver. 1.12. Disponível em: <http://www.folk.uio.no/ohammer/past>.
- HUNT, D.J. 1993. Aphelenchida, Longidoridae and Trichodoridae: their systematics and bionomies. International Institute of Parasitology. CABI Publishing, Wallingford, 352 p.
- HUTCHESON, K. 1970. A test for comparing diversities based on the Shannon formula. *Journal of Theoretical Biology*, 29: 151-154.
- JAIRAJPURI, M.S. & W. AHMAD. 1992. Dorylamida free living predaceous and plant-parasitic nematodes. E.J. Brill-Leiden, New York. Kobenhavn. Koln, 458 p.
- JENKINS, W.R. 1964. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. *Plant Disease Reporter*, 48: 692-95.

- KARAGOZ, M., B. GULCU, I.CAKMAK, H.K. KAYA & S. HAZIR. 2007. Predation of entomopathogenic nematodes by *Sancassania* sp. (Acari: Acaridae). *Experimental and Applied Acarology*, 43: 85-95.
- KAYA, H.K. & P. STOCK. 1997. Techniques in insect nematology. In: LACEY, L. *Manual of Techniques in Insect Pathology*. San Diego: Academic Press. p. 281-324.
- KAYA, H.K. 2002. Natural enemies and other antagonists. In: Gaugler R (ed) *Entomopathogenic nematology*. CABI Publishing, Wallingford, p 169–203.
- KAYA, H.K., A.M. KOPPENHÖFER & M. JOHNOSON. 1998. Natural enemies of entomopathogenic nematodes. *Japanese Journal of Nematology* 28: 13-21.
- KAYA, H.K., M.M. AGUILLERA, A. ALUMAI, H.Y. CHOO, M. DE LA TORRE, A. FODOR, S. GANGULY, S. HAZIR, T. LAKATOS, A. PYE., M. WILSON, S. YAMANAKA, H. YANG & R.-U. EHLERS. 2006. Status of entomopathogenic nematodes and their symbiotic bacteria from selected countries or regions of the world. *Biological Control* 38, 134-155.
- MATTOS, J.K.A., S.P HUANG & C.M.M. PIMENTEL. 2006. Grupos tróficos da comunidade de nematoides do solo em oito sistemas de uso da terra nos cerrados do Brasil central. *Nematologia Brasileira*, 30: 267-273.
- MINAS, R.S. 2012. Caracterização biológica de uma linhagem de nematoide entomopatogênico visando o controle do gorgulho da goiaba (*Conotrachelus psidii*)

em dois sistemas de cultivo. (Tese de Doutorado). Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes RJ, 137 p.

MOHAMMAD, R.S. 1986. Tylenchida Parasites of plants and insects. 2nd Edition. CABI Publishing, Wallingford, 864 p.

NORDBRING-HERTZ, B., H. JANSSON, & A. TUNLID. 2006. Nematophagous Fungi. In: Encyclopedia of Life Sciences. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester. <
<http://www.ua.es/personal/hb.jansson/Reprints/NHertz%20et%20al%20ELS%202006.pdf> > acesso em 09 de abril de 2013.

ODUM, E.P. 1983. Ecologia. Rio de Janeiro, Guanabara. 434p.

PATHAK, E., F.E. EL-BORAI, R. CAMPOS-HERRERA, E.G. JOHNSON, R.J. STUART, J.H. GRAHAM & L.W. DUNCAN. 2012. Use of real-time PCR to discriminate parasitic and saprophagous behavior by nematophagous fungi. *Fungal Biology*, 115: 563-573.

RAM, K., D.S. GRUNER, J.P. MCLAUGHLIN, E.L. PREISSER & D.R. STRONG. 2008. Dynamics of a Subterranean Trophic Cascade in Space and Time. *Journal of Nematology*, 40 (2):85–92.

RUBNER, A. 1996. Revision of predacious Hyphomycetes in the *Dactylella-Monacrosporium* complex. *Studies in Mycology*, Berlin, 39:1–134.

- SÁNCHEZ-MORENO, S. & H. FERRIS, 2007. Suppressive service of the soil food web: Effects of environmental management. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 119: 75-87.
- SANTOS, M.A. DOS, S. FERRAZ & F.F. MUCHOVEJ. 1991. Detection and ecology of nematophagous fungi from Brazilian soils. *Nematologia Brasileira*, 15: 121-134.
- SCHOUTEN, A.J., M.L.P. VAN ESBROEK, J.R.M. ALKEMADE. 1998. Dynamics and stratification of functional groups of nematodes in the organic layer of a Scots pine forest in relation to temperature and moisture. *Biology and Fertility of Soils*, 26:293–304.
- TIMPER, P. & H.K. KAYA. 1989. Role of the 2nd-stage cuticle of entomogenous nematode preventing infection by Nematophagous fungi. *Journal of Invertebrate Pathology*, 54: 314-321.
- TIMPER, P., K.K. KAYA & B.A. JAFFEE. 1991. Survival of entomogenous nematodes in soil infested with the nematode-parasitic fungus *Hirsutella rhossiliensis* (Deuteromycotina: Hyphomycetes). *Biological Control*, 1: 42-50.
- YEATES, G.W. 1999. Effects of plants on nematode community structure. *Annual Review of Phytopathology*, 37:127-49.

**3.2. AUGMENTATIVE APPLICATION OF *Heterorhabditis indica* LPP
30: EFFECT ON NEMATOPHAGOUS FUNGI IN A GUAVA ORCHARD**

Liliana P. Ribeiro¹, Fahiem E. El-Borai,² Raquel Campos-Herrera,^{2,3} Larry W.
Duncan,² and Claudia Dolinski^{1*}

¹LEF/CCTA/Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
Av. Alberto Lamego, 2000, 29013-602

²Citrus research and Education Center, University of Florida, Lake Alfred FL 33850,
USA

³Instituto de Ciências Agrárias, CSIC, Serrano 115 dpdo, Madrid 28006 Spain

* Corresponding author: Claudia Dolinski, Claudia.dolinski@censanet.com.br

Abstract

Brazil is a leading producer of guava (*Psidium guajava* L.) in the world. However, this production is strongly affected by pests, such as the guave weevil *Conotrachelus psidii* (Coleoptera: Curculionidae). The damage on the guave fruits by this pest reduces considerably the production of this crop. One of the non-chemical alternative methods for pest control is the application of entomopathogenic nematodes (EPNs). The efficiency of the EPN application might be influenced by abiotic and biotic factors, such as natural enemies. Information about EPN post-application impact of the natural enemies is scarce, despite is vital to successfully implement biocontrol measurements. Therefore, the objective of this study was to evaluate the impact of typically tropical orchard population of target natural enemies after the augmentative application of native EPN population *Heterorhabditis indica* LPP 30. Target organisms (2 EPNs, 7 nematophagous fungi –NF– and two phoretic bacteria, *Paenibacillus* spp) were assessed by real-time qPCR in a guava orchard in the state of Rio de Janeiro (Brasil) at pre-application and postapplication (1 week) time. Additionally, soil properties (% sand, silt, clay and pH, CEC, OM, P, K, Mg, Ca, Zn, Mn, Fe and Cu) were evaluated. Number of nematodes were significantly reduced from the inoculums, after application of EPNs *H. indica* LPP 30. Found *Arthrobotrys dactyloides*, *Paecilomyces lilacinus* and *Catenaria* sp.. No entomopathogenic nematodes or bacteria phoretic (*Paenibacillus* sp. and *P. nematophilus*), were found in the period pre-application in the experimental area. Only, the abundant presence of nematodes mainly plant parasitic, predators+omnivores, bacterial feeders and fungal feeders. In the post-application few EPNs and soil nematodes were found in the field. In addition, the data showed a significant lower of *A. dactyloides*, *P. lilacinus* and *Catenaria* sp. However, it was possible to assess that there was the tendency of the population to be below its dynamic equilibrium. For it was assessed that the orchard had a large reduction in the number of NEPs, with almost absence of infective juvenil applied, after a week of application. In addition, there was a decrease of the population of fungi present in the area, in this case, *A. dactyloides*, *Catenaria* sp., *P. lilacinus*. These results suggest the occurrence of a rapid reaction of the soil biota and the short duration of action of EPNs, indicating the need for periodic reviews to ensure biological control.

Keywords: entomopathogenic nematode, nematophagous fungi, post-application biology, qPCR

1. Introduction

Brazil is the principal red guava producer followed by Mexico, whereas India is the major producer of white guava (Gould and Raga, 2002). The main pests of fruits are guava weevil *Conotrachelus psidii* Marshall (Coleoptera: Curculionidae) and fruit flies *Anastrepha* spp. (Diptera: Tephritidae) and *Ceratitis capitata* Wiedemann. (Diptera: Tephritidae), being weevil the major pest of the crop (Bailez et al. 2003; Dolinski et al., 2012). The amount of fruit attacked has been increasing over the past three years possibly due to the development of insecticide resistance (Dolinski et al., 2012). The weevil in their larval stage is difficult to control using conventional chemical methods due to its location within the fruit and soil. The adults are present in orchards during summer, appearing in September-October and remaining until March. This insect is a small beetle (Coleoptera: Curculionidae) of approximately 6.0 mm long by 4.0 mm wide staining dark-brown, with mouthparts elongated and cylindrical. The larva is yellowish white, head brown, transversely wrinkled body measuring when fully developed, 12.0 mm long by 4.0 mm wide. Females, when they start laying, look for small fruits (3-4 cm) and green, digging channels where the rostral deposited in general one egg cavity. This site does not accompany the development of the rest of the fruit, staying with a circular scar, depressed black coloring. After hatching, larvae penetrate the fruit and feeds the pulp and seeds, leaving these partially destroyed, dark colored, typical deterioration (Manica et al. 2000). The larvae develop inside the fruit passing through four instars. The fruits ripen, fall and fourth instar larvae migrate to the soil, where they become prepupal, remaining at this stage for about three to four months. After this period the adults emerge, leaving the soil starting a new cycle (Bailez et al., 2003). Entomopathogenic nematodes (EPN) are controlling agents alternative to the use of insecticides with potential to control the weevil guava, whose use might trigger a more rational strategy to combat this pest (Dolinski et al., 2006).

NEPs belong the families Heterorhabditidae and Steinernematidae are promising for pest control agents for many cultures (Kaya et al., 2006). The free-living, infective juvenile (IJ) stage of EPNs search for hosts and enter the insect through natural openings or by puncturing the cuticle (Kaya and Gaugler, 1993; Chaston and Goodrich-Blair, 2010). IJs release symbiotic bacteria carried in the anterior intestine (*Photorhabdus* Boemare et al. in Heterorhabditids) or in an intestinal vesicle (*Xenorhabdus* Thomas and Poinar in Steinernematids) (Gaugler et al., 1997). These bacteria are highly effective insect pathogens that kill the host within 48 h and produce antibiotics that prevent secondary infections (Kaya and Gaugler, 1993; Chaston and Goodrich-Blair, 2010). The bacteria and insect tissues support IJ development into egg laying adults. Two to three generations of ENPs development arrests at the third stage in order to reinstate the infection cycle (Adams and Nguyen, 2002).

However, EPN spatial patterns, population density, and insecticidal efficacy vary by soil characteristics, agricultural management (Campos-Herrera et al, 2008; Kaspi et al., 2010; Lawrence et al., 2006), prey availability, soil moisture and soil temperature (Duncan et al., 2007; Mraček et al. 2005; Puza and Mraček, 2005), moreover pressure from competitors, predators and pathogens (Duncan et al., 2007; Glazer, 2002).

Nematophagous fungi (NF) are an important group of natural enemies of EPNs (Duncan et al., 2007; El-Borai et al. 2009; Timper et al., 1991). A NF in the environment can coexist in two forms, as a parasite, and can feed on a variety of free-living nematodes can live or on organic matter, feeding as saprophytes (Larsen, 1999; Waller and Faedo, 1996). While the fungi predators and parasites of eggs can survive saprophytes, endoparasites mostly are dependent on such nutrient nematodes, therefore, are obligate parasites (Nordbring-Hertz et al., 2006).

Previous research showed an organism that lives an association phoretic with the EPNs a bacterial of the genus *Paenibacillus*. The association was related involving spindle-shaped swollen sporangia of a *Paenibacillus* sp. adhering to the surface of *H. megidis* EU17 nematode IJs. The *Paenibacillus* sp. reproduces within the dead insect despite the *Photorhabdus*-produced antibiotics cadaver. IJs bearing sporangia then infect new insect hosts. Other *Heterorhabditis* spp. strains have also been found in similar association with endospore-forming bacteria.

(Enright et al., 2003). Concomitant infection by EPNs and *Paenibacillus* spp. had little measurable effects on nematode reproduction or energy reserves but spore-encumbered IJs were less motile and infected fewer insects (El-Borai et al., 2005; Enright and Griffin, 2005) compared to spore-free IJs.

There are few studies, regarding the interactions between EPNs and natural enemies (Duncan et al., 2013; Jabbour and Barbercheck, 2011; Jabbour et al., 2011; Jaffee and Strong, 2005). In Brazil, there are no studies linking EPNs and their natural enemies.

EPNs of the family Heterorhabditidae are easily found in tropical soils, who suffer the direct action of weather as solar radiation, rainfall, have low cation exchange capacity (CEC), are more acidic, rapidly decomposes the organic matter (Primavesi, 2006). Studies with various isolates of the specie *Heterorhabditis indica* have demonstrated that they cause high mortality rates, as well as in the laboratory and in the field to different insect species. *H. indica* is a species of NEPs commercialized and used by farmers to control insect pests nearly worldwide (Kaya et al. 2006). There are a few studies, in Brazil, involving biological control weevil guava (*Conotrachelus psidii*), with the strain *H. indica* LPP1 (Del Valle et al., 2009; Dolinski et al., 2006; Minas, 2012).

Currently, researchers have been searching for new techniques for identification and quantification of EPNs, NF and phoretic bacteria *Paenibacillus* sp. in soil samples. The direct detection and quantification of fungal and the bacteria *Paenibacillus* sp. from soil samples should provide the importance as parasites better than methods that cultivate NF and bacteria (Campos-Herrera et al. 2011a; Pathak et al., 2012). Especially, the technique quantitative real-time PCR (qPCR) has been used for the detection and quantification of fungi from soil (Cullen et al. 2002; Fillion et al., 2003; Landeweert et al., 2003; Lees et al., 2002; Lueders et al., 2004; Pathak et al., 2012).

A reliable quantitative assay specific for NF would facilitate understanding the impact of these natural enemies on the survival and efficacy of EPNs in soil (Pathak et al. 2012). However, in this study a native isolated from *H. indica* was found in 2008, in a guava orchard in Campos dos Goytacazes, RJ, Brazil (Minas, 2012). In that sense, the hypothesis in this study was in a typical tropical grove and the population of NF is affected by augmentative application of native EPN and in orchard there is the presence of bacteria phoretic *Paenibacillus* sp.

associated with native entomopathogenic nematode *H. indica* LPP 30. However, the objective of our study was to evaluate if augmentative application of native affected the population NF EPN in a groves of the guava and if there is the presence of phoretic bacteria *Paenibacillus* sp. and *P. nemathophilus*. The technique quantitative real-time PCR to identification and quantification nemathopagous fungi and quantification of the *H. indica* is more sensitive and provide a more accurate in identification and quantification.

2. Methods and materials

2.1. Experimental area, sampling methods and chemical analysis

The experiment was conducted in a guava orchard belonging to the Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF, Rio do Janeiro, Brasil). This guava field is located at 21° 48' South latitude, 41° 20' West longitude and altitude of 11 masl. Trees of the variety Paluma of red guave were planted with spacing of 7.0 between rows and 7.0 between trees. In the guava field, two experimental areas were defined, each with ten repetitions (areas comprising 1 tree). In both plots was performed regular grove care with following cultural practices: regular mowing of the weeds and a pruning maintenance was performed in March 2012. The grove was not irrigation and received no treatment for pest or disease management except application of nematodes. One plot was fertilized with bovine manure (10 kg/plant) and the other plot was with mineral fertilized NPK (300 g/plant) in 04/2012, however, no significant difference was observed between the areas.

Soil samples were randomly taken with the aid of an auger from lines with five samples (500 g) of each layer of 0 to 20 cm and 20 to 40 cm, thus ten simple samples will form one composite sample in each plot (n = 10 per plot). The samples were brought to the laboratory of Entomology and Plant Pathology at the Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, where the samples were prepared to be sent for chemical analysis (following section).

Soil physics and chemistry were analysed for all the soil samples in the Center of Analysis of the Universidade Federal do Rio de Janeiro (Brazil). Soil properties include pH (water 1:2.5) and percentage of organic matter. Moreover, fertility

parameters such as content of P, K (extractable by Mehlich -1), Ca, Mg and Al (exchangeable for KCL 1 mol L⁻¹) (Defelipo and Ribeiro, 1981), and organic C (oxidation with potassium dichromate in an acidic medium) (Embrapa, 1979) were assessed. Data rainfall and air temperature were obtained from Meteorological Station Campus Dr. Leonel Miranda (UFRRJ).

2.2. Native entomopathogenic nematode maintenance and field application procedures

A native entomopathogenic nematode population isolated originally from a guava orchard in Campos dos Goytacazes city- RJ (Minas, 2012), Brazil was maintained under laboratory conditions for further studies. This new populations belonged to the species *H. indica* and was coded as LPP 30. For producing the nematodes for aquatic suspension application, IJs were reared in laboratory by infecting last instar *G. mellonella* larvae. Groups of five larvae were placed in Petri dishes (90 mm diam.r) containing a filter paper disk (Whatman N° 1) on the dish base and nematodes were applied in the concentration of 1000 IJs/mL. Petri dishes were incubated in an incubation chamber at 25°C and RH 80% without photoperiod. After 4 days, the cadavers were transferred to modified White traps (White, 1927). IJs were collected from traps during 6 consecutive days and stored in distilled water for a maximum period of 1 week at 16°C before utilization in experiments. Additionally, the larvae for cadaver application were obtained from last instar larvae of *Galleria mellonella* that were infected with EPN as described above.

The first collection of soil samples were carried out in July 23rd 2012 (time 0) in the 10 areas of the 2 plots (n = 20). The first application was performed thereafter in all the blocks defined in the two areas (n = 20). Firstly using a backpack sprayer were applied 2 L of solution per plant, at a concentration of 5,000 IJs/ml per plant (August, 13th 2012). A week later, a re-inoculation was performed, in which insect cadavers were buried (5 cm depth) 10 insect cadavers per tree (August, 20th 2012). The insect cadavers were covered with talc (Granado, Rio de Janeiro, RJ, Brazil) formulated as a powder, to prevent its capture by ants of the genus *Ectatomma* sp., in this region (Del Valle et al., 2009). The estimated number of EPNs to be applied in treatment, was performed with the

aid of camera Peters, which was removed from 1 ml of the initial solution in 3 replications. Then, according to the mean was made of how many calculations IJs per ml to be applied per plant. The total number of *H. indica* LPP 30 applied were 180 000 000 in the combination of cadavers and sprayed, in all guava orchard. On August, 29th 2012 soil samples were collected and processed for target organisms detection and quantification (time 1).

2.3. Soil organisms extraction and quantification

In each tree, ten composed samples of five simple samples, 500 g each, the samples were taken from beneath the trees, in the 0 to 20 cm, with the aid of an auger. The nematode community was extracted by the method of floating-centrifugation in sucrose solution (Jenkins, 1964) modified. The samples were placed in plastic buckets which were covered by water, mixed vigorously. The resulting solution was poured into a sieve of 100 mesh (0.150 mm) and then on another sieve of 500 mesh (0.025 mm). The resulting liquid was collected in a 100 mL tube, completing the volume to 40 mL final suspension, which was centrifuged at 555.56 g for 3 minutes. After removal of the supernatant, the sucrose solution (454 g/L) was added and centrifuged for 1 minute at 138.89 g (Tihohod, 2000). The sucrose solution was passed through a sieve of 500 mesh where it was washed with a little water, yielding 15 mL of final sample (Jenkins, 1964). The other soil nematodes was identified the level of genus by morphological characteristics with the aid identification keys (De Ley et al., 2003; Hunt, 1993; Jairajpuri and Ahmad, 1992; Mohammad, 1986).

Samples were concentrated to an Eppendorf tube 1.5 mL and liophilized by L 101 Liotop (Liobras Ind. Com. e Serv. de liofilizadores Ltda) for further analysis at the Citrus Research and Education Center, University of Florida (Lake Alfred, Florida, US). DNA was resuspended in 100 μL of di-distilled water and kept in ice for 2 hours before DNA extraction protocol (UltraCleanTM Soil DNA Extraction Kit, MoBio) following Campos-Herrera et al. (2011a, 2011b). Quality and quantity of duplicate DNA samples were measured using the Nanodrop System 1000 v.3.3.0 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). Then, each sample was adjusted to the appropriate quantity for EPNs ($0.2 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$) or NF ($10 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$) (Campos-Herrera et al., 2011a; 2011b; Pathak et al., 2012).

The DNA extraction and development of standard curves were performed according to Campos-Herrera *et al.* (2011a, 2011b) and Pathak *et al.* (2012) for the target organisms (Table 1). Briefly, two EPN were selected to be measured, *H. indica* (which was augmented in the plots at time 1) and *H. bacteriophora* that might co-occur with this other EPN species in the area (authors, unpublished?). Pure cultures of both nematodes were used to obtain the DNA for the standard curves as described Campos-Herrera *et al.* (2011a, 2011b). The quantification of these EPN species was expressed as IJs. Seven NF were selected to be assessed in this study (Table 1), and standard curves were performed from extraction of genomic DNA isolated from pure cultures following Pathak *et al.* (2012) procedures, with the exception of *Catenaria* sp. for which a plasmid construction including the ITS rDNA section was employed (Campos-Herrera *et al.*, in press). The quantification of these NF were divided by the total DNA from each sample to provide the “infection/infestio rate” as described Duncan *et al.* (2013). Phoretic bacteria *Paenibacillus* sp. and *Paenibacillus nematophilus* were assessed by using plasmid-constructions including the 16S rDNA region from the corresponding bacteria as described Campos-Herrera *et al.* (2011b), and final quantification was expressed as copy numbers.

All the primers and probes were synthesized by Integrated DNA Technologies Inc. (IDT, San Diego, CA). TaqMan[®] PCR probes were labeled at the 5' end with the fluorogenic reporter dye FAM, and the 3' end with the quencher Iowa Black[™] FG. The ZEN molecule was included in the middle of the oligonucleotide to provide greater stability (IDT, San Diego, CA). Real-time PCR was performed in optical 96-well reaction plates (Applied Biosystem) on an ABI Prism 7500 (Applied Biosystem). All reactions were performed in a final volume of 20 μ L, using the reagents, materials and combination of primers/probe concentration, annealing temperature and number of cycles as described previously (Campos-Herrera *et al.*, 2011a; 2011b; Pathak *et al.*, 2012). In all the reactions, Bovine Serum Albumin (BSA) (PROMEGA) was added at a final concentration of 400 nM to reduce the possible interference of some remaining humic acids and other soil compounds (Torr *et al.*, 2007). Positive (standard curve) and negative (sterile de-ionized water) controls were included in all runs. All unknowns and controls were performed in duplicate. Data from the standard curves were used to

estimate the efficiency and accuracy of the qPCR assay. A correction factor based on dilution adjusted all the qPCR results.

Table 1. Entomopathogenic nematodes (EPN) , nematophagous fungi (NF) and ectoparasitic bacteria used for developing standard curves for real-time qPCR experiments.

Organism, Species	Population	Source	Material
Entomopathogenic nematodes			
<i>Heterorhabditis indica</i>	Ker1	Authors	Live, infective juveniles
<i>Heterorhabditisbacteriophora</i>	Hb	David Shapira-Ilan, USDA-ARS Byron, GA (US)	Live, infective juveniles
Nematophagous fungi			
<i>Arthrobotrys dactyloides</i>	H22	Authors	Genomic DNA from pure culture
<i>Arthrobotrys musiformis</i>	Am-11	Authors	Genomic DNA from pure culture
<i>Arthrobotrys oligospora</i>	Ao-H55	Authors	Genomic DNA from pure culture
<i>Catenaria</i> sp.	-	Authors	ITS rDNA sequence + pDrive
<i>Gamsylella gephyropagum</i>	Mg-37	Authors	Genomic DNA from pure culture
<i>Paecylomices lilacinus</i>	-	Richard A. Humber, USDA-ARS Ithaca, NY (US)	Genomic DNA from pure culture
<i>Hirsutella rhossilensis</i>	-	USDA-ARS Ithaca, NY (US)	Genomic DNA from pure culture
Phoretic bacteria			
<i>Paenibacillus nematophilus</i>	NEM2	Genbank: AY480936	16S rDNA sequence of 490 bp + pUC57
<i>Paenibacillus</i> sp.	SdTc1FEE1	Authors and Genbank: JF317562	16S rDNA sequence of 1515 bp + pDrive

2.4. Statistical analysis

The Shannon–Wiener diversity index was selected as ecological indice, calculated as $H' = \sum p_i \ln p_i$, (where “ p_i ” is the proportion of individuals of the i -species). The difference in diversity was evaluated by "t" test of Hutcheson (Hutcheson, 1970). Comparing the results of estimators were performed by the aid of the Past (Hammer et al., 2003).

The data were tested for normality (Lilliefors) and homogeneity of variances (Bartlett). In treatments in which the difference of deviations characterizing a sample of non-normal distribution, we used non-parametric Wilcoxon tests for the analyzes with only two units. Statistical analyzes were performed with the aid of computer application SAEG (Analysis System Statistics and Genetics) version 8.0, developed by FUNARBE of UFV, Viçosa-MG (Ribeiro Júnior, 2008).

3. Results

3.1. Soil characteristics

The average rainfall values were 0.13 and 2.8 mm and the air temperature was 22.6 and 22.4 °C for July and August of the 2012, respectively. Soil was classified as clayey loam texture. The parameters about percentage of the organic matter (OM), cation exchange capacity (CEC) showed to be homogenous between plots (Table 2). We did not observe significant differences between the two types of the fertilizer.

Table 2. Soil characteristics in the plot 1 and 2 in a guava grove. Collect of soil performed in August 2012.

General properties	Plot 1	Plot 2
Sand (%)	47.2	45.3
Silt (%)	30.6	31.8
Clay (%)	22.2	22.9
pH	5.2	5.2
CEC (meg 100 cm ⁻³)	18.1	15.5
OM (%)	1.7	1.6
P (mg dm ⁻³)	10.0	11.8
K (mg dm ⁻³)	99.1	126.2
Mg (cmolc dm ⁻³)	5.1	4.2
Ca (cmolc dm ⁻³)	6.3	5.2
Zn (mg dm ⁻³)	4.7	3.8
Mn (mg dm ⁻³)	55.1	47.7
Fe (mg dm ⁻³)	63.4	68.4
Cu (mg dm ⁻³)	5.2	5.1

3.2. Natural Enemies of EPNs

Three types of fungi were found in this study. The trapping fungi *Arthrobotrys dactyloides* Drechsler, the facultative parasite nematode eggs *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson, the endoparasitic fungi *Catenaria* sp. and *Hirsutella rhossiliensis* Minter & B.L. Brady (Fig. 1). No fungi were found and analyzed *Arthrobotrys oligospora* and *Gamsylella gephyropagum*. However, the trapping fungi *Arthrobotrys musiformis*, but also was found in lower quantified and

only at time 0, which corresponds to the time period before application of EPN (data not shown). This time period pre-application of *H. indica* isolated LPP 30, we observed high population of *A. dactyloides*, *Catenaria* sp. and *P. lilacinus*. Also, before of the application, we not found any entomopathogenic nematode, *Paenibacillus* sp. and *P. nematophilus*.

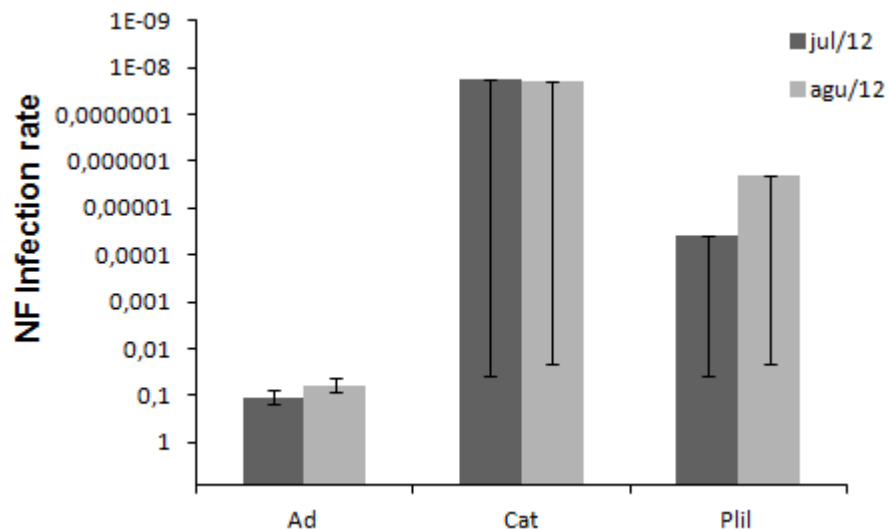


Fig 1. The infection rates of some nematophagous fungi in time 0 (July 2012) and time 1 (August 2012), using real-time PCR. Detection of *Arthrobotrys dactyloides* (Ad), *Catenaria* sp. (Cat) and *Paecilomyces lilacinus* (Plil). Error bars are SEM.

In period post-application of EPNs, was observed high density of *A. dactyloides*. For *Catenaria* and *P. lilacinus*, there was a sharp drop in population. The index diversity Shannon and richness was lower in post-application (august 2012) (Fig. 2).

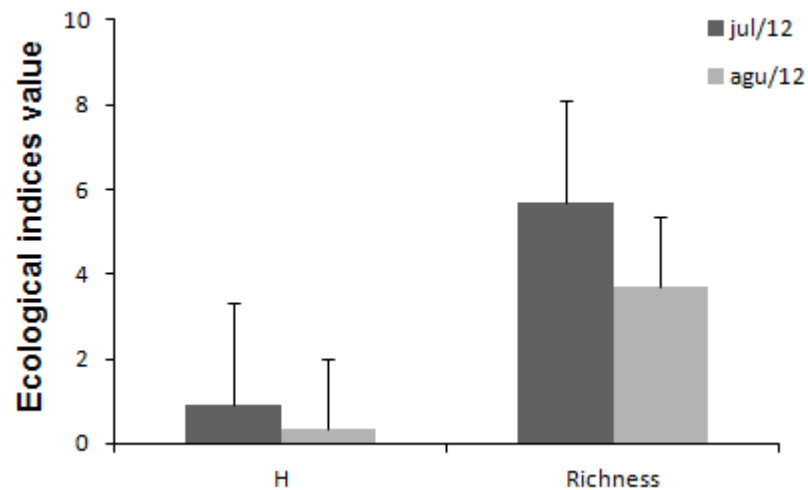


Fig 2. Fungal ecological indices in time 0 (July 2012) and time 1 (August 2012), using real-time PCR. Error bars are SEM.

Moreover, few IJS *H. indica* were found only in six samples, only in 6 samples of 20 collected samples. Another parameter observed was the absence of bacteria phoretic *Paenibacillus* sp. and *P. nematophilus* after application of the EPN.

3.3. Community nematode

The number of soil nematodes found in guava grove was 2220 nematodes. We observe that the community nematodes had basically plant parasitic (84.3 %), bacterial feeders (2.8 %), predators+omnivores (11.5 %) and fungal feeders (1.4 %) (Fig. 3).

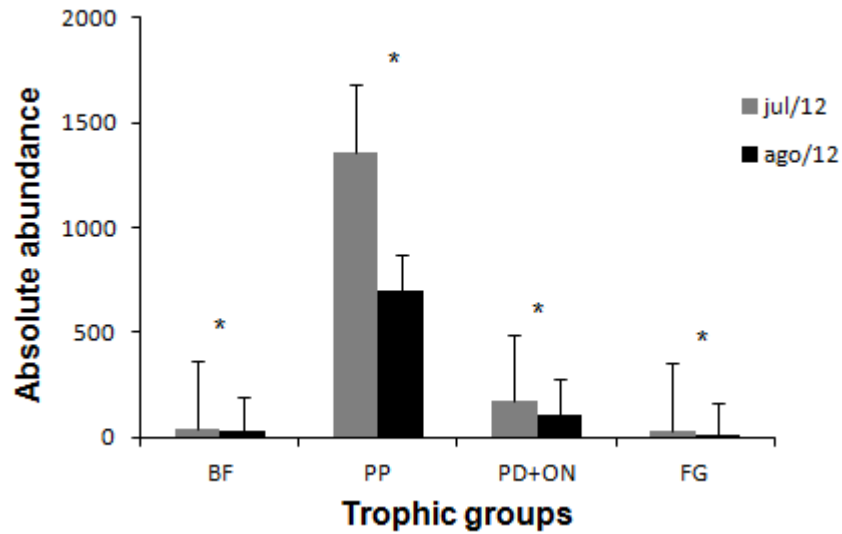


Fig 3. Absolute abundance in time 0 (July 2012) and time 1 (August 2012), using morphological identification. Detection of Bacterial Feeders (BF), Plant Parasites (PP), (Predators and Omnivores), Fungal Feeders (FF). (*) Results of test of Wilcoxon the 5 % of probability. (ns) Not signification.

We found a greater number of plant parasitic, especially of the genus *Helicotylenchus* (74.6 %), followed by *Criconema* (8.9 %) and *Pratylenchus* (7.3%). Trend was observed for both collection times (July 2012 and August 2012). Following was possible to observe the presence of the predator+omnivore (*Aporcelaimus* 6.1%) and bacterial feeders (*Rhabditis*, 0.9 % and *Panagrellus*, 2.2 %) (Fig. 4). The index diversity Shannon not varied significantly between period time of collection (July 2012 and August 2012).

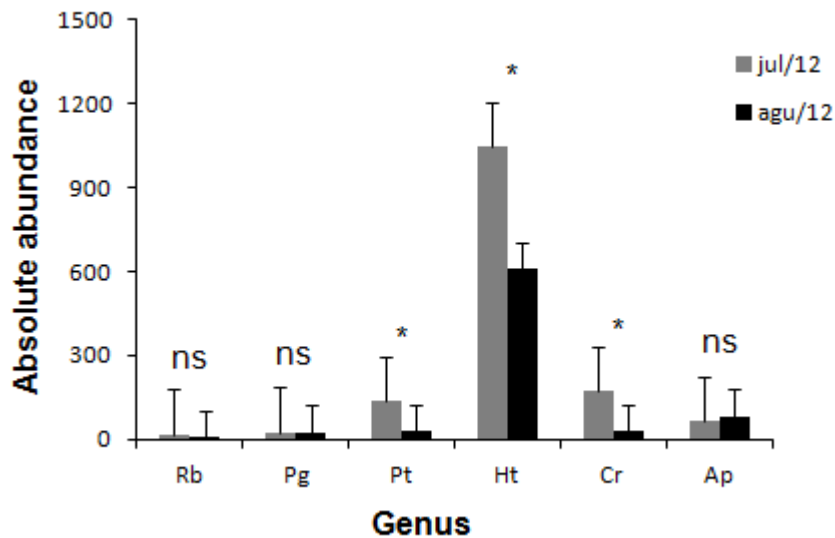


Fig 4. Absolute abundance in time 0 (July 2012) and time 1 (August 2012), using morphological identification. Detection of *Rhabditis* sp. (Rb), *Panagrellus* sp. (Pg), *Pratylenchus* sp. (Pt), *Helicotylenchus* sp. (Ht), *Criconema* sp. (Cr) and *Aporcelaimus* sp. (Ap). (*) Results of test of Wilcoxon the 5 % of probability. (ns) Not signification.

4. Discussion

The data suggest that application of EPNs induced responses in the population of nematophagous fungi. In general, in the pre-application of EPNs were found in greater abundance *A. dactyloides*, *Catenaria* sp. and *P. lilacinus*, no entomopathogenic nematodes or bacteria phoretic. Only, the abundant presence of nematodes mainly plant parasitic. Experiments involving NF and EPNs that were performed in other countries, mainly at Florida and California, both in the laboratory and in the field showed the susceptibility of EPNs to NF. Nevertheless, in Brazil a country totally different due to its tropical climate, where the soils exposed to the weather, has no data correlating the populations of EPNs and NF.

In period post-application of EPN, the number of *A. dactyloides*, *Catenaria* sp. and *P. lilacinus* decreases in time 1 (in august 2012). Moreover, *Catenaria* sp and *P. lilacinus* decrease dramatically in time 1, maybe to have triggered several processes involving rapid consumption of EPNs and declining population of NF, mainly because it has a tropical climate. Apparent, the community of soil nematodes

was not affected by application of EPNs, not observed significant interactions between the investigated variables NF and soil nematodes.

Duncan et al. (2007) showed that some of the dates were consistent with his hypothesis that EPN augmentation can initiate cascades with successive bottom-up (population growth by natural enemies of nematodes) and top-down (greater predation of EPN) non-target effects that result in fewer EPN and reduced biological control. Furthermore, showed that one month following *Steinernema riobrave* application, the EPN prevalence and non-target effects were also evident among omnivorous and plant parasitic nematodes. Some differences were observed between *Sterneinema* sp. and *Heterorhabditis* sp., because nematode genus *Sterneinema* sp. was more susceptible to infection with conidia of two endoparasitic fungi (*Hirsutella rhossiliensis* Minter and Brady and *Drechmeria coniospora*) than *Heterorhabditis* sp. (Timper and Kaya, 1989). Since the IJs of *Heterorhabditis* tend to keep the second stage cuticle as a protective cover (Timper and Kaya, 1989). In this case, this result suggests that the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis* sp. biological agent can be better pest control (Timper and Kaya, 1989). When assessing two cropping systems of citrus orchards in Florida, and pre-and post-application of EPNs, it was observed that the population of some endoparasitic and trapping NF was consistently higher in response to application of augmentative exotic species *S. riobrave* than the native *H. indica* (Campos-Herrera et al., in press).

Other researchers report that *H. indica* might behave less positively (e.g., less attraction, greater repellency or lack of arrestment) toward *Catenaria* sp. compared to the other EPN species tested because these fungi were less effective predators of *H. indica* than of the other EPN species (El-Borai et al., 2009). However, other research showed dates that showing susceptibility *H. indica* the nematophagous fungi, including endoparasitic NF *Catenaria* sp., in experiments with sand columns (El-Borai et al., 2011). In fact, the responses of NF to EPNs are highly specific (El-Borai et al., 2007; 2009; Jaffee and Strong, 2005). However, this experiment could not determine the specific parameter of the each FN to *H. indica*.

The native species *H. indica* LPP 30, in previous experiments showed its high potential to control guava weevil in the laboratory experiments, accounting for 100% mortality at temperatures of 28 °C and 32 °C and the field reached 90% mortality (Minas, 2012). However, is important noteworthy the need of evaluate if the

factors abiotic such as temperature and potential water in tropical soils influence the interaction EPNs and FN.

It is possible that the absence of bacteria *Paenibacillus* area is due to its level of specificity, since the orchard has shown the presence of other soil nematodes. Probably, because the adherence, sporangia adhere to IJs of all *Heterorhabditis* sp. tested and closely related parasites of the order Strongylida but not to any other soil nematodes tested in other studies (Enright et al., 2003). Researchers observed that *Paenibacillus* sp. from *S. diaprepesi* was unable to attach to the cuticles of numerous alternative species of entomopathogenic, plant parasitic or free living nematodes whereas *P. nematophilus* exhibits less species specificity. Moreover, *P. nematophilus* and *Paenibacillus* sp. bacteria enter insects via EPNs, and then develop and reproduce along with the EPNs and their entomopathogenic bacterial symbionts (El-Borai et al., 2005; Enright and Griffin, 2005). *Paenibacillus* sp. showed have the potential to modulate the population dynamics of EPNs because IJs heavily encumbered with spores migrate less readily and infect fewer insects than do spore free IJs (El-Borai et al., 2005; Enright and Griffin, 2004; 2005). Spores of *Paenibacillus nematophilus*, associated with heterorhabditid nematodes, adhere only to the second stage cuticle, which is retained as a sheath by the 3rd stage (infective stage) juvenile (Enright et al., 2003). Infective juvenile (IJ) steinernematids typically do not retain the sheath and *Paenibacillus* sp. associated with *Steinernema diaprepesi* attaches only to the third stage cuticle (El-Borai et al., 2005).

This is the first experiment in a tropical climate country, to assess the interaction between nematophagous fungi and augmentative biological control of NEPs in guava orchards, using a novel molecular technique to identify and quantify members of the EPN soil food web. However, our results are in agreement when it comes to the introduction of large numbers of nematodes in the soil initiates strong responses in the population of nematophagous fungi that help quickly reestablish a given habitat's equilibrium density NEPs, thus requiring periodic treatments to maintain effectiveness (Duncan et al., 1996; 2003; 2007; El-Borai et al., 2007; Ekmen et al., 2010; Greenwood et al, 2011; McCoy et al., 2000). However, it is necessary to continue the research and subsequent evaluations on different times, substrates, other species EPNs and crops with potential for use of entomopathogenic nematodes for biological control of insect pests.

Acknowledgement

The authors thank to Citrus research and Education Center, University of Florida for the analysis of PCR real time. This study is supported by FAPERJ from Brazil and a USDA–CSREES Special Grant (TSTAR). R. Campos–Herrera was supported by a Marie Curie International Outgoing Fellowship within the 7th European Community Framework Program (FP7–PEOPLE–2009–IOF–252980). L. P. Ribeiro was supported by UENF/FAPERJ.

5. References

- Adams, B.J., Nguyen, K.B. (2002) Taxonomy and Systematics. *In*: Gaugler, R. (ed) *Entomopathogenic Nematology*. New York: CABI, p. 311-332.
- Bailez, O.E., Viana-Bailez, A.M., Lima, J.O.G., Moreira, D.D.O. (2003) Lifehistory of the guava weevil, *Conotrachelus psidii* Marshall (Coleoptera:Curculionidae), under laboratory conditions. *Neotropical Entomology*, 32: 203-207.
- Campos-Herrera, R., El-Borai, F.E., Stuart, R.J., Graham, J.H., Duncan, L.W. (2011a) Entomopathogenic nematodes, phoretic *Paenibacillus* spp., and the use of real time quantitative PCR to explore soil food webs in Florida citrus groves. *Journal of Invertebrate Pathology*, 108: 30-39.
- Campos-Herrera, R., Gomez-Ros, J.M., Escuer, M., Cuadra, L., Barrios, L., Gutierrez, C. (2008) Diversity, occurrence, and life characteristics of natural entomopathogenic nematode populations from La Rioja (Northern Spain) under different agricultural management and their relationships with soil factors. *Soil Biology and Biochemistry*, 40: 1474-1484.
- Campos-Herrera, R., Johnson, E.G., El-Borai, F.E., Stuart, R.J., Graham, J.H., Duncan, L.W. (2011b) Long-term stability of entomopathogenic nematode spatial patterns measured by sentinel insects and real-time PCR assays. *Annals of Applied Biology*, 158: 55-68.

- Campos-Herrera, R., Pathak, E., El-Borai, F., Schumann, A., Abd-Elgawad M.M.M., Duncan, L.W. (2013) New citriculture system suppresses native and augmented entomopathogenic nematodes. *Biological Control*, 66: 183-194.
- Chaston, J., Goodrich-Blair, H. (2010) Common trends in mutualism revealed by model associations between invertebrates and bacteria. *FEMS Microbiological Reviews*, 34: 41-58.
- Cullen, D.W., Lees, A.K., Toth, I.K., Duncan, J.M. (2002) Detection of *Colletotrichum coccodes* from soil and potato tubers by conventional and quantitative real-time PCR. *Plant Pathology*, 51: 281-290.
- De Ley P., Mundo-Ocampo M., De Ley, I.T. (2003) Identification of Free living nematodes (Secernentea). University of California, Riverside. University Extension.
- Defelipo, B.V., Ribeiro, A.C. (1981) *Análise química do solo*. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. 17p. (Boletim de Extensão, 29).
- Del Valle, E.E., Dolinski, C., Barreto, E.L.S., Souza, R.M., (2009). Effect of cadaver coatings on emergence and infectivity of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis baujardi* LPP7 (Rhabditida: Heterorhabditidae) and the removal of cadavers by ants. *Biological Control*, 50: 21-24.
- Dolinski, C., Choo, H.Y., Duncan, L.W. (2012) Grower Acceptance of Entomopathogenic Nematodes: Case Studies on Three Continents. *Journal of Nematology*, 44: 226-235.
- Dolinski, C., Del Valle, E., Stuart, R.J. (2006) Virulence of entomopathogenic nematodes to larvae of the guava weevil, *Conotrachelus psidii* (Coleoptera: Curculionidae), in laboratory and greenhouse experiments. *Biological Control* 38: 422-427.

- Duncan, L.W., Graham, J.H., Dunn, D.C., Zellers, J., McCoy, C.W., Nguyen, K., (2003) Incidence of endemic entomopathogenic nematodes following application of *Steinernema riobrave* for control of *Diaprepes abbreviatus*. *Journal of Nematology*, 35:178-186.
- Duncan, L.W., Graham, J.H., Zellers, J., Bright, D., Dunn D.C., El-Borai, F.E., Porazinska, D.L. (2007) Food Web Responses to Augmenting the Entomopathogenic Nematodes in Bare and Animal Manure-Mulched Soil. *Journal of Nematology*, 39: 176-189.
- Duncan, L.W., McCoy, C.W., Terranova, A.C. (1996) Estimating sample size and persistence of entomogenous nematodes in sandy soils and their efficacy against the larvae of *Diaprepes abbreviatus* in Florida. *Journal of Nematology*, 28: 56-67.
- Duncan, L.W., Stuart, R.J., El-Borai, F.E., Campos-Herrera, R., Pathak, E., Giurcanu, M., Graham, J.H. (2013) Modifying orchard planting sites conserves entomopathogenic nematodes, reduces weevil herbivory and increases citrus tree growth, survival and fruit yield. *Biological Control*, 64: 26-36.
- Ekmen, Z.I., Hazir, S., Cakmak, I., Ozer, N., Karagoz, M., Kaya, H.K. (2010) Potential negative effects on biological control by *Sancassania polyphyllae* (Acari: Acaridae) on an entomopathogenic nematode species. *Biological Control*, 54: 166-171.
- El-Borai, F.E., Brentu, C.F., Duncan, L.W. (2007) Augmenting entomopathogenic nematodes in soil from a Florida citrus orchard: non-target effects of a trophic cascade. *Journal of Nematology*, 39: 203-210.
- El-Borai, F.E., Bright, D.B., Graham, J.H., Stuart, R.J., Cubero, J., Duncan, L.W. (2009) Differential susceptibility of entomopathogenic nematodes to nematophagous fungi from Florida citrus orchards. *Nematology*, 11: 233-243.

- El-Borai, F.E., Campos-Herrera, R., Stuart, R.J., Duncan, L.W. (2011) Substrate modulation, group effects and the behavioral responses of entomopathogenic nematodes to nematophagous fungi. *Journal of Invertebrate Pathology*, 106: 347-356.
- El-Borai, F.E., Duncan, L.W., Preston, J.F. (2005) Bionomics of a phoretic association between *Paenibacillus* sp. and the entomopathogenic nematode *Steinernema diaprepesi*. *Journal of Nematology*, 37: 18-25.
- Embrapa (1979) Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Serviço Nacional de Levantamentos e Conservação de Solos. Rio de Janeiro, Manual de métodos de análise de solos, 412p.
- Enright, M.R., Griffin, C.T. (2004) Specificity of association between *Paenibacillus* spp. and the entomopathogenic nematodes, *Heterorhabditis* spp. *Microbial Ecology*, 48: 412-421.
- Enright, M.R., Griffin, C.T. (2005) Effects of *Paenibacillus nematophilus* on the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis megidis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 88: 40-48.
- Enright, M.R., McInerney, J.O., Griffin, C.T. (2003) Characterization of endosporeforming bacteria associated with entomopathogenic nematodes, *Heterorhabditis* spp., and description of *Paenibacillus nematophilus* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53: 435-441.
- Filion, M., St-Arnaud, M., Jabaji-Hare, S.H. (2003) Direct quantification of fungal DNA from soil substrate using real time PCR. *Journal of Microbiological Methods*, 53: 67-76.
- Gaugler, R., Lewis, E., Stuart, R.J. (1997) Ecology in the service of biological control: the case of entomopathogenic nematodes. *Oecologia*, 109: 483-489.

- Glazer, I. (2002) Survival Biology. *In: Gaugler, R. (ed.) Entomopathogenic Nematology*. Wallingford, UK: CAB International, p. 169-187.
- Gould, W. P., Raga, A. (2002) Pests of guava. *In: J. E. Peña, J. L. Sharp, M. Wysoki, (eds.) Tropical Fruit Pests and Pollinators*. Wallingford, UK, CABI Publishing, p.295–313.
- Greenwood, C.M., Barbercheck, M.E., Brownie, C. (2011) Short term response to soil microinvertebrates to application of entomopathogenic nematode-infected insects in two tillage systems. *Pedobiologia*, 54: 177-186.
- Hammer, O., Harper, D.A., Ryan, P.D. (2003) PAST – Paleontological Statistics ver. 1.12.: <http://www.folk.uio.no/ohammer/past> em 17/10/2012.
- Hunt, D.J. (1993) Aphelenchida, Longidoridae and Trichodoridae: their systematics and bionomies. Wallingford, UK: CAB International, 352p.
- Hutcheson, K. (1970) A test for comparing diversities based on the Shannon formula. *Journal of Theoretical Biology*, 29: 151-154.
- Jabbour R., Barbercheck M. E. 2011. Soil microarthropod response to the application of entomopathogenic nematode-killed insects in maize and flower strip habitats. *Biological Control*, 54: 243-251.
- Jabbour R., Crowder D.W., Aultman E.A., Snyder. W. E. (2011) Entomopathogen biodiversity increases host mortality. *Biological Control*, 59: 277-283.
- Jaffee, B.A., Strong, D.R. (2005) Strong bottom-up and weak top-down effects in soil: nematode parasitized insects and nematode-trapping fungi. *Soil Biology and Biochemistry*, 37: 1011-1021.
- Jairajpuri, M.S., Ahmad, W. (1992) *Dorylamida Free living Predaceous and Plant-parasitic nematodes*. E.J. Brill-Leiden. New York: Kobenhavn. Koln. 458p.

- Jenkins, W.R. (1964) A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. *Plant Disease Reporter*, 48: 692p.
- Kaspi, R., Ross, A., Hodson, A., Stevens, G.N., Kaya, H.K., Lewis, E.E. (2010) Foraging efficacy of the entomopathogenic nematode *Steinernema riobrave* in different soil types from California citrus groves. *Applied Soil Ecology*, 45: 243-253.
- Kaya, H.K., Aguilera, M.M., Alumai, A., Choo, H.Y., de la Torre, M., Fodor, A., Ganguly, S., Hazir, S., Lakatos, T., Pye, A., Wilson, M., Yamanaka, S., Yang, H., Ehlers, R.-U. (2006) Status of entomopathogenic nematodes and their symbiotic bacteria from selected countries or regions of the world. *Biological Control*, 38: 134-155.
- Kaya, H.K., Gaugler, R. (1993) Entomopathogenic Nematodes. *Annual Review of Entomology*, 38: 181-206.
- Landeweert, R., Veenman, C., Kuyper, T.W., Fritze, H., Wernars, K., Smit, E. (2003) Quantification of ectomycorrhizal mycelium in soil by real-time PCR compared to conventional quantification techniques. *FEMS Microbiology Ecology*, 45: 283-292.
- Larsen, M. (1999) Biological control of helminths. *International Journal for Parasitology*, 29: 139-146.
- Lawrence, J.L., Hoy, C.W., Grewal, P.S. (2006) Spatial and temporal distribution of endemic entomopathogenic nematodes in a heterogeneous vegetable production landscape. *Biological Control*, 37: 247-255.
- Lees, A.K., Cullen, D.W., Sullivan, L., Nicolson, M.J. (2002) Development of conventional and quantitative real-time PCR assays for the detection and identification of *Rhizoctonia solani* AG-3 in potato and soil. *Plant Pathology*, 51: 293-300.

- Lueders, T., Wagner, B., Claus, P., Friedrich, M.W. (2004) Stable isotope probing of rRNA and DNA reveals a dynamic methyloph community and trophic interactions with fungi and protozoa in oxic rice field soil. *Environmental Microbiology*, 69: 60-72.
- Manica, I., Icumã, I.M., Junqueira, N.T.V., Salvador, J.O., Moreira, A., Malavolta, E. (2000). Goiaba. Porto Alegre: Cinco continentes, 374p.
- McCoy, C.W., Shapiro, D.I., Duncan, L.W., Nguyen, K. (2000) Entomopathogenic nematodes and other natural enemies as mortality factors for larvae of *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae). *Biological Control*, 19, 182-190.
- Minas, R.S. (2012) Caracterização biológica de uma linhagem de nematoide entomopatogênico visando o controle do gorgulho da goiaba (*Conotrachelus psidii*) em dois sistemas de cultivo. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 137 p.
- Mohammad, R.S. (1986) Tylenchida Parasites of plantas and insects. 2. ed. CABI publishing.
- Mraček, Z., Bečvař, S., Kindlmann, P., Jersakova, J. (2005). Habitat preference for entomopathogenic nematodes, their insect hosts and new faunistic records for the Czech Republic. *Biological Control*, 34: 27-37.
- Nordbring-Hertz, B., Jansson, H., Tunlid, A. (2006) Nematophagous Fungi. In: Encyclopedia of Life Sciences. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester. <http://www.els.net/> [doi:10.1038/npg.els.0004293] em 09/09/2012.
- Pathak, E., El-Borai, F.E., Campos-Herrera, R., Johnson, E.G., Stuart, R.J., Graham, J.H., Duncan, L.W. (2012) Use of real-time PCR to discriminate parasitic and saprophagous behavior by nematophagous fungi. *Fungal Biology*, 115: 563-573.

- Primavesi, A. (2006) *Manejo ecológico do solo: a agricultura em regiões tropicais*. 18. ed. São Paulo: Nobel. 549p.
- Puza, V., Mraček, Z. (2005) Seasonal dynamics of entomopathogenic nematodes of the genera *Steinernema* and *Heterorhabditis* as a response to abiotic factors and abundance of insect hosts. *Journal of Invertebrate Pathology*, 89: 116-122.
- Ribeiro Júnior, J.I., de Melo A.L.P. (2008) Guia prático para utilização do SAEG - Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas, Versão 8.0. Viçosa, MG:UFV.
- Tihohod, D. (2000) *Nematologia Agrícola Aplicada*. 2. ed. Jaboticabal: Funep, 473p.
- Timper, P., Kaya, H.K. (1989) Role of the 2nd-stage cuticle of entomogenous nematode preventing infection by Nematophagous fungi. *Journal of Invertebrate Pathology*, 54: 314-321.
- Timper, P., Kaya, K.K., Jaffee, B.A. (1991) Survival of entomogenous nematodes in soil infested with the nematode-parasitic fungus *Hirsutella rhossiliensis* (Deuteromycotina: Hyphomycetes). *Biological Control*, 1: 42-50.
- Torr, P., Spiridonov, S.E., Heritage, S., Wilson, M.J. (2007) Habitat associations of two entomopathogenic nematodes: a quantitative study using real-time quantitative polymerase chain reactions. *Journal of Animal Ecology*, 76: 238-245.
- Waller, P.J., Faedo, M. (1996) The prospect for biological control of the free-living stages of nematode parasite of livestock. *International Journal for Parasitology*, 26: 915-925.
- White, G.F. (1927) A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. *Science*, 30: 302-303.

4. RESUMOS E CONCLUSÕES

- Foi encontrado o fungo nematófago predador *Arthrobotrys* sp e *Arthrobotrys musiformis*;
- A comunidade de nematoides do solo foi composta por bacteriófagos, fitoparasitas, predadores e onívoros e micófagos;
- Foi possível observar que a eliminação do goiabal proporcionou maior exposição do solo às intempéries que desencadeou rapidamente a eliminação dos NEPs presentes na área e a diminuição da quantidade de nematoides do solo;
- Em um pomar de goiabas, onde foi realizada a aplicação aumentativa de *H. indica* LPP 30 ocorreu um rápido consumo dos NEPs aplicados e queda da quantidade de fungos nematófagos presentes no local, indicando a tendência de entrar no equilíbrio dinâmico;
- Em pomar de goiabeiras, localizado em um país tropical foi possível concluir que é necessário a aplicação periódica de NEPs, devido à presença e ação de fungos nematófagos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, B.J., Fodor, A., Koppenhöfer, H.S., Stackebrandt, E., Stock, S.P., Klein, M.G. (2006) Reprint of “Biodiversity and systematics of nematode-bacterium entomopathogens”. *Biological Control*, 38:4-21.
- Adams, B.J., Nguyen, K.B. (2002) Taxonomy and Systematics. *In*: Gaugler, R. (ed) *Entomopathogenic Nematology*. New York: CABI, p. 311-332.
- Ahman, J., Ek, B., Rask, L., Tunlid, A. (1996) Sequence analysis and regulation of a cuticle degrading serine protease from the nematophagous fungus *Arthrobotrys oligospora*. *Microbiology*, 142: 1605-1616.
- Ahman, J., Olsson M., Johansson, T., Olsson, M., Punt, P.J., Van del Hondel, C.A.M.J.J., Tunlid, A. (2002) Improving the pathogenicity of a nematode-trapping fungus by genetic engineering of subtilisin with nematotoxic activity. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 3408-3415.

- Ameen, H.H. (1991) Nematicidal effect of *Aspergillus ochraceus* filtrate. *Bulletin Faculty Agriculture*, 42: 963-970.
- Araújo, J.V., Mota, M.A., Campos, A.K. (2004) Controle de helmintos parasitos de animais por fungos nematófagos. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 13: 165-170.
- Ayatollahy, E., Fatemy, S., Etebarian, H.R. (2008) Potencial for biological controlo of *Heterodera schachtii* by *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* on sugar beet. *Biocontrol Science and Technology*, 18: 157-167.
- Bailez, O.E., Viana-Bailez, A.M., Lima, J.O.G., Moreira, D.D.O. (2003) Lifehistory of the guava weevil, *Conotrachelus psidii* Marshall (Coleoptera:Curculionidae), under laboratory conditions. *Neotropical Entomology*, 32: 203-207.
- Barbercheck, M.E., Wang, J., Hirsh, I.S. (1995) Host plant effects on entomopathogenic nematodes. *Journal of invertebrate Pathology*, 66: 169-177.
- Baur, M.E., Kaya, H.K., Strong, D.R. (1998) Foraging ants as scavengers of entomopathogenic nematode-killed insects. *Biological Control*, 12: 231-236.
- Bonants, P.J.M., Fitters, P.F.L., Thijs, H., Den Belder, E., Waalwijk, C., Henfling, J.W.D.M. (1995) A basic serine protease from *Paecilomyces lilacinus* with biological activity against *Meloidogyne hapla* eggs. *Microbiology*, 141: 775-784.
- Braga, F.R. (2008) *Ação in vitro de fungos das espécies Duddingtonia flagrans, Monacrosporium sinense e Pochonia chlamydosporia sobre ovos de Fasciola hepatica e Schistosoma mansoni*. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária) - Viçosa – MG, Universidade Federal de Viçosa - UFV, 67p.
- Braga, F.R., Araújo, J.V., Silva, A.R., Carvalho, R.O., Araujo, J.M., Ferreira, S.R., Benjamin, L.A. (2010) Predatory activity of the nematophagous fungus

Duddingtonia flagrans on horse cyathostomin infective larvae. *Tropical Animal Health and Production*, 42: 1161-1165.

Brasil (2003) Lei n.º10.831, de 23 de dezembro de 2003. Dispõe sobre a agricultura orgânica e dá outras providências. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 24 dez. 2003. Seção 1, p.8.

Campbell, J.F., Gaugler, R. (1997) Inter-specific variation in entomopathogenic nematode foraging strategy: dichotomy or variation along a continuum? *Fundamental and Applied Nematology*, 20: 393-398.

Campos-Herrera, R., El-Borai, F.E., Duncan, L.W. (2012) Wide interguild relationships among entomopathogenic and free-living nematodes in soil as measured by real time qPCR. *Journal of Invertebrate Pathology*, 111: 126-135.

Campos-Herrera, R., El-Borai, F.E., Stuart, R.J., Graham, J.H., Duncan, L.W. (2011a) Entomopathogenic nematodes, phoretic *Paenibacillus* spp., and the use of real time quantitative PCR to explore soil food webs in Florida citrus groves. *Journal of Invertebrate Pathology*, 108: 30-39.

Campos-Herrera, R., Gomez-Ros, J.M., Escuer, M., Cuadra, L., Barrios, L., Gutierrez, C. (2008) Diversity, occurrence, and life characteristics of natural entomopathogenic nematode populations from La Rioja (Northern Spain) under different agricultural management and their relationships with soil factors. *Soil Biology and Biochemistry*, 40: 1474-1484.

Campos-Herrera, R., Johnson, E.G., El-Borai, F.E., Stuart, R.J., Graham, J.H., Duncan, L.W. (2011b) Long-term stability of entomopathogenic nematode spatial patterns measured by sentinel insects and real-time PCR assays. *Annals of Applied Biology*, 158: 55-68.

- Campos-Herrera, R., Pathak, E., El-Borai, F., Schumann, A., Abd-Elgawad M.M.M., Duncan, L.W. (2013) New citriculture system suppresses native and augmented entomopathogenic nematodes. *Biological Control*, 66: 183-194.
- Cardoso, E.A., Alves, R.E., Moura, C.F., Almeida, A.S., Pereira, M.E.C. (2002) Frutos da goiabeira “Paluma” colhidos em diferentes estádios de maturação na região Vale do Curu, Ceará. *Anais do Congresso Brasileiro de Fruticultura*, 17, Belém - PA.
- Chandrawathani, P., Jamnah, O., Adnan. M., Waller, P.J., Larsen, M., Gillespie, A.T. (2004) Field studies on the biological control of nematode parasites of sheep in the tropics, using the microfungus *Duddingtonia flagrans*. *Veterinary Parasitology*, 120: 177-187.
- Charles, T.P., Roque, M.V.C., Santos, C.P. (1996) Reducing of *Haemonchus contortus* infective larvae by *Harposporium anguillulae* in sheep faecal cultures. *International Journal for Parasitology*, 26: 509-510.
- Chaston, J., Goodrich-Blair, H. (2010) Common trends in mutualism revealed by model associations between invertebrates and bacteria. *FEMS Microbiological Reviews*, 34: 41-58.
- Chen, S., Dickson, D.W. (2004) Biological control of nematodes by fungal antagonists. In: Chen, Z., Chen, S., Dickson, D.W. (eds). *Nematology Advances and perspectives*. 2. ed. Tsinghua: Nematode Management and Utilization: University Press; CABI publishing, p. 979-1039.
- Chen, S.Y., Dickson, D.W., Mitchell, D.J. (2000) Viability of *Heterodera glycines* exposed to fungal filtrates. *Journal of Nematology*, 32: 190-197.
- Ciancio, A., Logricco, A., Lamberti, L., Bottalico, A. (1988) Nematicidal effects of some *Fusarium* toxins. *Nematologia Mediterranea*, 16: 137-138.

- Ciarmela, M.L., Minvielle, M.C., Lori, G., Basualdo, J.A. (2002) Biological interaction between soil fungi and *Toxocara canis* eggs. *Veterinary Parasitology*, 103: 251-257.
- Ciche, T.A., Ensign, J.C. (2003) For the insect pathogen *Photorhabdus luminescens*, which end of a nematode is out? *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 1890-1897.
- Costa, M.J.N., Campos, V.P., Pfenning, L.H., Oliveira, D.F. (2001) Toxicidade de filtrados fúngicos a *Meloidogyne incognita*. *Fitopatologia Brasileira*, 26: 749-755.
- Cullen, D.W., Lees, A.K., Toth, I.K., Duncan, J.M. (2002) Detection of *Colletotrichum coccodes* from soil and potato tubers by conventional and quantitative real-time PCR. *Plant Pathology*, 51: 281-290.
- Curran, J. (1993) Post-application biology of entomopathogenic nematodes in soil. *In: Bedding, R., Akhurst, R., Kaya, H. (eds) Nematodes and the Biological Control of insect Pests*. Victoria, Australia: CSIRO Publications, p. 67-77.
- De Ley P., Mundo-Ocampo M., De Ley, I.T. (2003) Identification of Free living nematodes (Secernentea). University of California, Riverside. University Extension.
- Defelipo, B.V., Ribeiro, A.C. (1981) *Análise química do solo*. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. 17p. (Boletim de Extensão, 29).
- Del Valle, E.E., Dolinski, C., Barreto, E.L.S., Souza, R.M., (2009). Effect of cadaver coatings on emergence and infectivity of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis baujardi* LPP7 (Rhabditida: Heterorhabditidae) and the removal of cadavers by ants. *Biological Control*, 50: 21-24.

- Dimander, S.O., Hoglund, J., Ugglå, Spörndly, E., Waller, P.J. (2003) Evaluation of gastro-intestinal nematode parasite control strategies for first-season grazing cattle in Sweden. *Veterinary Parasitology*, 111: 193-209.
- Dolinski, C., Choo, H.Y., Duncan, L.W. (2012) Grower Acceptance of Entomopathogenic Nematodes: Case Studies on Three Continents. *Journal of Nematology*, 44: 226-235.
- Dolinski, C., Del Valle, E., Stuart, R.J. (2006) Virulence of entomopathogenic nematodes to larvae of the guava weevil, *Conotrachelus psidii* (Coleoptera: Curculionidae), in laboratory and greenhouse experiments. *Biological Control* 38: 422-427.
- Dolinski, C., Lacey, L.A. (2007) Microbial control of Arthropod pests of tropical tree fruits. *Neotropical Entomology*, 36: 161-179.
- Duncan, L.W., Graham, J.H., Dunn, D.C., Zellers, J., McCoy, C.W., Nguyen, K., (2003) Incidence of endemic entomopathogenic nematodes following application of *Steinernema riobrave* for control of *Diaprepes abbreviatus*. *Journal of Nematology*, 35:178-186.
- Duncan, L.W., Graham, J.H., Zellers, J., Bright, D., Dunn D.C., El-Borai, F.E., Porazinska, D.L. (2007) Food Web Responses to Augmenting the Entomopathogenic Nematodes in Bare and Animal Manure-Mulched Soil. *Journal of Nematology*, 39: 176-189.
- Duncan, L.W., McCoy, C.W., Terranova, A.C. (1996) Estimating sample size and persistence of entomogenous nematodes in sandy soils and their efficacy against the larvae of *Diaprepes abbreviatus* in Florida. *Journal of Nematology*, 28: 56-67.
- Duncan, L.W., Stuart, R.J., El-Borai, F.E., Campos-Herrera, R., Pathak, E., Giurcanu, M., Graham, J.H. (2013) Modifying orchard planting sites conserves

entomopathogenic nematodes, reduces weevil herbivory and increases citrus tree growth, survival and fruit yield. *Biological Control*, 64: 26-36.

- Ekmen, Z.I., Hazir, S., Cakmak, I., Ozer, N., Karagoz, M., Kaya, H.K. (2010) Potential negative effects on biological control by *Sancassania polyphyllae* (Acari: Acaridae) on an entomopathogenic nematode species. *Biological Control*, 54: 166-171.
- El-Borai, F.E., Brentu, C.F., Duncan, L.W. (2007) Augmenting entomopathogenic nematodes in soil from a Florida citrus orchard: non-target effects of a trophic cascade. *Journal of Nematology*, 39: 203-210.
- El-Borai, F.E., Bright, D.B., Graham, J.H., Stuart, R.J., Cubero, J., Duncan, L.W. (2009) Differential susceptibility of entomopathogenic nematodes to nematophagous fungi from Florida citrus orchards. *Nematology*, 11: 233-243.
- El-Borai, F.E., Campos-Herrera, R., Stuart, R.J., Duncan, L.W. (2011) Substrate modulation, group effects and the behavioral responses of entomopathogenic nematodes to nematophagous fungi. *Journal of Invertebrate Pathology*, 106: 347-356.
- El-Borai, F.E., Duncan, L.W., Preston, J.F. (2005) Bionomics of a phoretic association between *Paenibacillus* sp. and the entomopathogenic nematode *Steinernema diaprepesi*. *Journal of Nematology*, 37: 18-25.
- Embrapa (1979) Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Serviço Nacional de Levantamentos e Conservação de Solos. Rio de Janeiro, Manual de métodos de análise de solos, 412p.
- Enright, M.R., Griffin, C.T. (2004) Specificity of association between *Paenibacillus* spp. and the entomopathogenic nematodes, *Heterorhabditis* spp. *Microbial Ecology*, 48: 412-421.

- Enright, M.R., Griffin, C.T. (2005) Effects of *Paenibacillus nematophilus* on the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis megidis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 88: 40-48.
- Enright, M.R., McInerney, J.O., Griffin, C.T. (2003) Characterization of endosporeforming bacteria associated with entomopathogenic nematodes, *Heterorhabditis* spp., and description of *Paenibacillus nematophilus* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53: 435-441.
- Epsky, N.D., Water, D.E., Capinera, J.L. (1988) Potential role of nematophagous microarthropods as biotic mortality factors of entomogenous nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae). *Journal of Economic Entomology*, 81: 821-825.
- Farrell, F.C., Jaffee, B.A., Strong, D.R. (2006). The nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora* in soil of the Bodega marine reserve: distribution and dependence on nematode-parasitized moth larvae. *Soil Biology and Biochemistry*, 38:1422-1429.
- Ferraz, S., Freitas, L.G., Lopes E.A., Dias-Arieira, C.R. (2010) *Manejo sustentável de fitonematoides*. Viçosa: Editora Universidade Federal de Viçosa-UFV, 306p.
- Filion, M., St-Arnaud, M., Jabaji-Hare, S.H. (2003) Direct quantification of fungal DNA from soil substrate using real time PCR. *Journal of Microbiological Methods*, 53: 67-76.
- Freire, M.T.A., Hashida, J.C., Favaro-Trindade, C.S. (2009) Avaliação física, química e sensorial de doce cremoso de goiaba acondicionado em bisnaga plástica. *Brazilian Journal of Food Technology*, 12: 172-180.

- Freitas, V.M., Cares, J.E., Andrade, E.P., Huang, S.P. (2008) The Influence of Citrus spp. on the Community of Soil Nematodes in the Dry and Rainy Seasons in Distrito Federal of Brazil. *Nematologia Brasileira*, 32: 20-32.
- Gaugler, R., Lewis, E., Stuart, R.J. (1997) Ecology in the service of biological control: the case of entomopathogenic nematodes. *Oecologia*, 109: 483-489.
- Georgis, R., Gaugler, R. (1991) Predictability in biological control using entomopathogenic nematodes. *Journal of Economic Entomology* 84: 713-720.
- Ghahfarokhi, M.S., Abyaneh, M.R., Bahadori, S.R.; Eslami, A., Zare, R. Ebrahimi, M. (2004) Screening of soil and sheep faecal samples for predacious fungi: isolation and characterization of the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. *Iranian Biomedical Journal*, 8: 135-142.
- Gilmore, S.K., Potter, D.A. (1993) Potencial role of Collembola as biotic mortality agents for entomopathogenic nematode. *Pedobiologia*, 37: 30-38.
- Glazer, I. (2002) Survival Biology. In: Gaugler, R. (ed.) *Entomopathogenic Nematology*. Wallingford, UK: CAB International, p. 169-187.
- Gomes, P. (2007) *Fruticultura Brasileira*. São Paulo: Nobel, 446 p.
- Gomes, S.G., Huang, S.P., Cares, J.E. (2003) Nematode Community, Trophic Structure and Population Fluctuation in Soybean Fields. *Fitopatologia Brasileira*, 28: 258-265.
- Goulart, A.M.C., Monteiro, A.R., Ferraz, L.C.C.B. (2003) Comunidades de nematoides em Cerrado com vegetação original preservada ou substituída por culturas. 2. Diversidade Taxionômica. *Nematologia Brasileira*, 27: 129-137.
- Gould, W.P., Raga, A. (2002) Pests of guava. In: Peña, J.E., Sharp, J.L., Wysoki, M. (eds.) *Tropical fruit pests and pollinators*. Wallingford, UK: CABI Publishing, p. 295-313.

- Graminha, E.B.N., Maia, A.S., Santos, J.M., Cândido, R.C., Silva, G.S., Costa, A.J. (2001) Avaliação in vitro da patogenicidade de fungos predadores de nematoides parasitos de animais domésticos. *Semina: Ciências Agrárias*, 22: 11-16.
- Gray, N.F. (1988) Fungi attacking vermiform nematodes. *In*: Poinar, G.O., Jansson, H.B. (eds) *Diseases of Nematodes*. Boca Raton: CRC Press, 38p.
- Greenwood, C.M. (2004) *Interactions between soil invertebrates and entomopathogenic nematodes in no-till and conventional-till corn in North Carolina*. PhD thesis, North Carolina State University, U.S., 207p.
- Greenwood, C.M., Barbercheck, M.E., Brownie, C. (2011) Short term response to soil microinvertebrates to application of entomopathogenic nematode-infected insects in two tillage systems. *Pedobiologia*, 54: 177-186.
- Grønvold, J., Henriksen, S. A., Larsen, M., Nansen, P., Wolstrup, J. (1996) Aspects of biological control - With special reference to arthropods, protozoans and helminths of domesticated animals. *Veterinary Parasitology*, 64: 47-64.
- Hammer, O., Harper, D.A., Ryan, P.D. (2003) PAST – Paleontological Statistics ver. 1.12.: <http://www.folk.uio.no/ohammer/past> em 17/10/2012.
- Hominick, W. (2002) Biogeography. *In*: R. Gaugler, (ed) *Entomopathogenic Nematology*. London, UK: CABI Publishing, p. 115–144.
- Hunt, D.J. (1993) Aphelenchida, Longidoridae and Trichodoridae: their systematics and bionomies. Wallingford, UK: CAB International, 352p.
- Hutcheson, K. (1970) A test for comparing diversities based on the Shannon formula. *Journal of Theoretical Biology*, 29: 151-154.

- IBGE (2011): <http://www.sidra.ibge.gov.br> em 15/06/2013 página mantida pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.
- Index Fungorum: www.indexfungorum.org em 30/06/2013 página mantida pela Index Fungorum Partnership.
- Jabbour R., Crowder D.W., Aultman E.A., Snyder. W. E. (2011) Entomopathogen biodiversity increases host mortality. *Biological Control*, 59: 277-283.
- Jabbour, R., Barbercheck, M. E. (2011) Soil microarthropod response to the application of entomopathogenic nematode-killed insects in maize and flower strip habitats. *Biological Control*, 54: 243-251.
- Jaffe, B.A. (1992) Population biology and biological control of nematodes. *Canadian Journal of Microbiology*, 38: 359-364.
- Jaffe, B.A., Muldoon, A.E. (1995) Susceptibility of root-knot and cyst nematodes to the nematode-trapping fungi *Monacrosporium ellipsosporum* and *M. cionopagum*. *Soil Biology and Biochemistry*, 27: 1083-1090.
- Jaffee, B.A., Strong, D.R. (2005) Strong bottom-up and weak top-down effects in soil: nematode parasitized insects and nematode-trapping fungi. *Soil Biology and Biochemistry*, 37: 1011-1021.
- Jairajpuri, M.S., Ahmad, W. (1992) *Dorylamida Free living Predaceous and Plant-parasitic nematodes*. E.J. Brill-Leiden. New York: Kobenhavn. Koln. 458p.
- Jansson, H., Jeyprakash, A., Zuckerman, B.M. (1985) Differential adhesion and infection of nematodes by the endoparasitic fungus *Meria coniospora* (Deutoromycetes). *Applied and Environmental*, 49: 552-555.
- Jatala, P. (1986) Biological control of plant-parasitic nematodes. *Annual Review of Phytopathology*, 24: 453-489.

- Jenkins, W.R. (1964) A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. *Plant Disease Reporter*, 48: 692p.
- Kanitkar, S.I., Kanitkar, R.U. (2003) Nematodes capture by *Arthrobotrys oligospora* KTS 1001 – a nematode hungry fungus: <http://www.biologicalresearch.com/india/em/27/02/2013>.
- Karagoz, M., Gulcu B., Cakmak, I., Kaya, H.K., Hazir, S. (2007) Predation of entomopathogenic nematodes by *Sancassania* sp. (Acari: Acaridae). *Experimental and Applied Acarology*, 43: 85-95.
- Kaspi, R., Ross, A., Hodson, A., Stevens, G.N., Kaya, H.K., Lewis, E.E. (2010) Foraging efficacy of the entomopathogenic nematode *Steinernema riobrave* in different soil types from California citrus groves. *Applied Soil Ecology*, 45: 243-253.
- Kaya, H.K. (2002) Natural enemies and other antagonists. *In*: Gaugler R (ed) *Entomopathogenic nematology*. Wallingford: CABI Publishing, p. 169-203.
- Kaya, H.K., Aguilera, M.M., Alumai, A., Choo, H.Y., de la Torre, M., Fodor, A., Ganguly, S., Hazir, S., Lakatos, T., Pye, A., Wilson, M., Yamanaka, S., Yang, H., Ehlers, R.-U. (2006) Status of entomopathogenic nematodes and their symbiotic bacteria from selected countries or regions of the world. *Biological Control*, 38: 134-155.
- Kaya, H.K., Gaugler, R. (1993) Entomopathogenic Nematodes. *Annual Review of Entomology*, 38: 181-206.
- Kaya, H.K., Koppenhöfer, A.M. (1996) Effects of microbial and other antagonistic organism and competition on entomopathogenic nematodes. *Biocontrol Science and Technology*, 6: 357-371.
- Kaya, H.K., Koppenhöfer, A.M., Johnoson, M. (1998) Natural enemies of entomopathogenic nematodes. *Japanese Journal of Nematology*, 28: 13-21.

- Kaya, H.K., Stock, P. (1997) Techniques in insect nematology. In: Lacey, L. *Manual of Techniques in Insect Pathology*. San Diego: Academic Press. p. 281-324.
- Kerry, B.R. (1990) An assessment of progress toward microbial control of plant-parasitic nematodes. *Journal of Nematology*, 22: 621-631.
- Kerry, B.R. (2000) Rhizosphere interactions and the exploitation of microbial agents for the biological control of plant-parasitic nematodes. *Annual Review of phytopathology* 38:423-441.
- Khan, T.A., Azam, M, F., Husain, S.I. (1984) Effect of fungal filtrates of *Aspergillus niger* and *Rizoctonia solani* on penetration and development of root-knot nematodes and the plant growth to tomato var. Marglobe. *Indian Journal of Nematology*, 14: 106-109.
- Koppenhöfer, A.M., Jaffe, B.A., Muldoon, A.E., Strong, D.R. (1997) Suppression of an entomopathogenic nematode by the nematode-trapping fungi *Geniculifera paucispora* and *Monacrosporium endermatum* as affected by the fungus *Arthrobotrys oligospora*. *Mycologia*, 89: 220-227.
- Landeweert, R., Veenman, C., Kuyper, T.W., Fritze, H., Wernars, K., Smit, E. (2003) Quantification of ectomycorrhizal mycelium in soil by real-time PCR compared to conventional quantification techniques. *FEMS Microbiology Ecology*, 45: 283-292.
- Larsen, M. (1999) Biological control of helminths. *International Journal for Parasitology*, 29: 139-146.
- Lawrence, J.L., Hoy, C.W., Grewal, P.S. (2006) Spatial and temporal distribution of endemic entomopathogenic nematodes in a heterogeneous vegetable production landscape. *Biological Control*, 37: 247-255.

- Lees, A.K., Cullen, D.W., Sullivan, L., Nicolson, M.J. (2002) Development of conventional and quantitative real-time PCR assays for the detection and identification of *Rhizoctonia solani* AG-3 in potato and soil. *Plant Pathology*, 51: 293-300.
- Lewis, E.E., (2002) Behavioral ecology. In: Gaugler, R. (ed) *Entomopathogenic Nematology*. New York: CABI, p. 205-224.
- Lewis, E.E., Gaugler, R., Harrison, R. (1992) Entomopathogenic nematode host finding: response to host contact cues by cruise and ambush foragers. *Parasitology*, 105: 109-115.
- Lopez-Llorca, L.V., Olivares-Bernabeu, C., Salinas, J. Jansson, J.H.B., Kolattukudy, P.E. (2002) Pre-penetration events in fungal parasitism of nematode eggs. *Mycologi Research*, 106: 499-506.
- Lueders, T., Wagner, B., Claus, P., Friedrich, M.W. (2004) Stable isotope probing of rRNA and DNA reveals a dynamic methylotroph community and trophic interactions with fungi and protozoa in oxic rice field soil. *Environmental Microbiology*, 69: 60-72.
- Luximon-Ramma, A., Bahorun, T., Crozier, A. (2003) Antioxidant actions and phenolic and vitamin C contents of common Mauritian exotic fruits. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83: 496-502.
- Lýsek, H., Krajší, D. (1987) Penetration of ovicidal fungus *Verticillium chlamydosporium* through the *Ascaris lumbricoides* egg-shells. *Folia Parasitologica*, 34: 57-60.
- Marti, O.G. Jr, Timper, P. (1999) Phoretic relationship between *Bacillus* sp. and the entomopathogenic nematode, *Heterorhabditis*. *Journal of Nematology*, 31: 553.

- Mattos, J.K.A., Huang, S.P., Pimentel, C.M.M. (2006) Grupos tróficos da comunidade de nematoides do solo em oito sistemas de uso da terra nos cerrados do Brasil central. *Nematologia Brasileira*, 30: 267-273.
- Manica, I., Icuma, I.M., Junqueira, N.T.V., Salvador, J.O., Moreira, A., Malavolta, E. (2000). Goiaba. Porto Alegre: Cinco continentes, 374p.
- McCoy, C.W., Shapiro, D.I., Duncan, L.W., Nguyen, K. (2000) Entomopathogenic nematodes and other natural enemies as mortality factors for larvae of *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae). *Biological Control*, 19, 182-190.
- Meyer, S.L.F., Massoud, S.I., Chitwood, D.J., Roberts, D.P. (2000) Evaluation of *Trichoderma virens* and *Burkholderia cepacia* for antagonistic activity against root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *Nematology*, 2: 871-879.
- Minas, R.S. (2012) *Caracterização biológica de uma linhagem de nematoide entomopatogênico visando o controle do gorgulho da goiaba (Conotrachelus psidii) em dois sistemas de cultivo*. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 137 p.
- Mohammad, R.S. (1996) *Tylenchida Parasites of plants and insects*. 2nd Edition. CABI Publishing, Wallingford, 864 p.
- Molina, G.C., Da Vide, R.G. (1986) Evaluation of microbial extracts for nematicidal activity against parasitic nematodes *Meloidogyne incognita* and *Radopholus similis*. *Philippine Agriculturist*, 69: 173-186.
- Mota, M.A., Campos A.K., Araújo J.V. (2003) Controle biológico de helmintos parasitos de animais: estágio atual e perspectivas futuras. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 23: 93-100.

- Mraček, Z., Bečvař, S., Kindlmann, P., Jersakova, J. (2005). Habitat preference for entomopathogenic nematodes, their insect hosts and new faunistic records for the Czech Republic. *Biological Control*, 34: 27-37.
- Nitão, J.K., Meyer, S.L.F., Chitwood, D.J. (1999) In-vitro assays of *Meloidogyne incognita* and *Heterodera glycines* for detection of nematode antagonistic fungal compounds. *Journal of Nematology*, 31: 172-183.
- Nordbring-Hertz, B., Jansson, H., Tunlid, A. (2006) Nematophagous Fungi. In: Encyclopedia of Life Sciences. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester. <http://www.els.net/> [doi:10.1038/npg.els.0004293] em 09/09/2012.
- Nunes, H.T. (2008) *Agentes microbianos no controle de nematoides e fungos fitopatogênicos de soja e sua compatibilidade com agroquímicos*. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária) – Jaboticabal – SP, Universidade Estadual Paulista Faculdade de Ciência Agrárias e Veterinárias – UNESP, 60p.
- Odum, E.P. (1983) *Ecologia*. Rio de Janeiro: Guanabara. 434p.
- Oliveira, R. P., Scivittaro W.B., Schroder, E.C., Esswein, F.J. (2010) *Produção Orgânica de Citros no Rio Grande do Sul*. Pelotas: Embrapa Clima Temperado. 296p.
- Pathak, E., El-Borai, F.E., Campos-Herrera, R., Johnson, E.G., Stuart, R.J., Graham, J.H., Duncan, L.W. (2012) Use of real-time PCR to discriminate parasitic and saprophagous behavior by nematophagous fungi. *Fungal Biology*, 115: 563-573.
- Penteado, S.R. (2004) *Fruticultura Orgânica: Formação e condução*. Viçosa: Aprenda Brasil, 308 p.
- Pereira, F. M., Martinez Jr., M. (1986) *Goiabas para industrialização*. Jaboticabal: UNESP. p. 13-22.

- Pereira, F.M., Kavati, R. (2011) Contribuição da pesquisa científica brasileira no desenvolvimento de algumas frutíferas de clima subtropical. *Revista Brasileira de Fruticultura, Volume Especial*, p. 092-108.
- Primavesi, A. (2006) *Manejo ecológico do solo: a agricultura em regiões tropicais*. 18. ed. São Paulo: Nobel. 549p.
- Puza, V., Mraček, Z. (2005) Seasonal dynamics of entomopathogenic nematodes of the genera *Steinernema* and *Heterorhabditis* as a response to abiotic factors and abundance of insect hosts. *Journal of Invertebrate Pathology*, 89: 116-122.
- Ram, K., Gruner, D.S., McLaughlin, J.P., Preisser, E.I., Strong, D.R. (2008) Dynamics of a subterranean trophic cascade in space and time. *Journal of Nematology*, 40: 85-92.
- Ribeiro Júnior, J.I., de Melo A.L.P. (2008) Guia prático para utilização do SAEG - Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas, Versão 8.0. Viçosa, MG:UFV.
- Ribeiro, R.C.F., Ferraz, S., Mizobutsi, E. H., Menezes, M. (1999) Levantamento de espécies de *Monacrosporium* predadoras de nematóides em diversas regiões brasileiras. *Nematologia Brasileira*, 23: 41-47.
- Rosén, S., Sjollem, K., Veenhuis, M., Tunlid, A. (1997) A cytoplasmic lectin produced by the fungus *Arthrobotrys oligospora* functions as a storage protein during saprophytic and parasitic growth. *Microbiology*, 143: 2593–2604.
- Rubner, A. (1996) *Revision of predacious Hyphomycetes in the Dactylella-Monacrosporium complex*. Berlin: Studies in Mycology, n. 39.
- Sánchez-Moreno, S., Ferris, H. (2007) Suppressive service of the soil food web: Effects of environmental management. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 119: 75-87.

- Santos, M.A. dos, Ferraz, S., Muchovej, F.F. (1991) Detection and ecology of nematophagous fungi from Brazilian soils. *Nematologia Brasileira*, 15: 121-134.
- Sanyal, P.K., Chauhan, J.B., Mukhopadhyaya, P.N. (2004) Implications of fungicidal effects of benzimidazole compounds on *Duddingtonia flagrans* in integrated nematode parasite management in livestock. *Veterinary Research communications*, 28: 375-385.
- Schouten, A.J., Van Esbroek, M.L.P., Alkemade, J.R.M. (1998) Dynamics and stratification of functional groups of nematodes in the organic layer of a Scots pine forest in relation to temperature and moisture. *Biology and Fertility of Soils*, 26:293–304.
- Siddiqui, Z.A., Mahmood, I. (1996) Biological control of plant parasitic nematodes by fungi: A review. *Bioresource Technology*, 58: 229-239.
- Smits, P.H. (1996) Post-application persistence of entomopathogenic nematodes. *Biocontrol Science and Technology*, 6: 379-387.
- Soares, L.M.V., Shihido, K., Moraes, A.M.M., Moreira, V.A. (2004) Composição mineral de sucos concentrados de frutas brasileiras. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 24: 202-206.
- Souza, J.C., Haga, A., Souza, M.A. (2003) *Pragas da goiabeira*. Boletim Técnico 71. EPAMIG, Minas Gerais, Brasil, 60p.
- Stuart, R.J., El-Borai, F.E., Duncan, L.W. (2008) From augmentation to conservation of entomopathogenic nematodes: trophic cascades, habitat manipulation and enhanced biological control of *Diaprepes abbreviatus* root weevils in Florida citrus groves. *Journal of Nematology*, 40:73-84.
- Tihohod, D. (2000) *Nematologia Agrícola Aplicada*. 2. ed. Jaboticabal: Funep, 473p.

- Timper, P., Kaya, H.K. (1989) Role of the 2nd-stage cuticle of entomogenous nematode preventing infection by Nematophagous fungi. *Journal of Invertebrate Pathology*, 54: 314-321.
- Timper, P., Kaya, K.K., Jaffee, B.A. (1991) Survival of entomogenous nematodes in soil infested with the nematode-parasitic fungus *Hirsutella rhossiliensis* (Deuteromycotina: Hyphomycetes). *Biological Control*, 1: 42-50.
- Torr, P., Spiridonov, S.E., Heritage, S., Wilson, M.J. (2007) Habitat associations of two entomopathogenic nematodes: a quantitative study using real-time quantitative polymerase chain reactions. *Journal of Animal Ecology*, 76: 238-245.
- Veenhuis, M., Nordbring-Hertz, B., Harder, W. (1984) Occurrence, characterization and development of two different types of microbodies in the nematophagous fungus *Arthrobotrys oligospora*. *FEMS Microbiology Letters*, 24: 31-38.
- Waller, P.J., Faedo, M. (1996) The prospect for biological control of the free-living stages of nematode parasite of livestock. *International Journal for Parasitology*, 26: 915-925.
- Waller, P.J., Faedo, M., Ellis, K. (2001) The potential of nematophagous fungi to control the free living stages of nematodes parasites of sheep: towards the development of a fungal controlled release device. *Veterinary Parasitology*, 102: 321-331.
- White, G.F. (1927) A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. *Science*, 30: 302-303.
- Yeates, G.W. (1999) Effects of plants on nematode community structure. *Annual Review of Phytopathology*, 37:127-49.

Zhang, K., Liu X., Cao, L., Ren-Hen, G. (1996b). A new species of *Arthrobotrys* from China. *Mycologi Research*, 100: 527-530.

Zhang, K., Liu, X., Cao, L. (1996a) Nematopgagous species of *Monacrosporium* from China. *Mycologi Research*, 100: 274-276.