

RESEARCH NOTE/NOTA INVESTIGATIVA

ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE FUNGOS NEMATÓFAGOS NO PARASITISMO DE *MELOIDOGYNE JAVANICA* “IN VITRO”

Camila Torres Stroze^{1*}, Débora Cristina Santiago¹, Fernando Cesar Baida¹

¹Universidade Estadual de Londrina, Departamento de Agronomia, Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445, Km 380, Campus Londrina, Paraná, Brasil. *Autor para correspondência: ctstroze@gmail.com.

ABSTRACT

Stroze, C. T., D. C. Santiago, and F. C. Baida. 2013. Isolation, characterization and evaluation of the potential of nematophagous fungi in the parasitism of *Meloidogyne javanica* “in vitro”. *Nematropica* 43:18-23.

The objective of this research was to isolate and identify nematophagous fungi of the genera *Paecilomyces* and *Pochonia* and to study the potential of these fungi for egg parasitism of *M. javanica* at different incubation temperatures. Twenty-one specimens were examined from soils, plated and identified, obtaining pure cultures of various isolates. The determination of the mycelial growth and parasitism “in vitro” isolates on *M. javanica* was conducted in Petri dishes containing media PDA and water agar, respectively. The isolates were incubated in BOD at temperatures of 15, 20, 25, 30 and 35 C ± 2 with a twelve hour photoperiod. The mycelial growth of the colony diameter was measured after eight and the determination of parasitism was measured after two weeks of incubation, calculating the percentage of parasitized eggs. Seventeen isolates of *P. lilacinus* and three isolates of *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* were obtained and identified. The isolates of *P. lilacinus* differed with respect to the growth rate and were temperature dependant in their ability to infect eggs of *M. javanica*. The three isolates of *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* behaved as egg parasites.

Key Words: Biological control. *Meloidogyne* spp.. *Paecilomyces lilacinus*. *Pochonia chlamydosporia*.

RESUMO

Stroze, C. T., D. C. Santiago, F. C. Baida. 2013. Isolamento, caracterização e avaliação do potencial de fungos nematófagos no parasitismo de *Meloidogyne javanica* “in vitro”. *Nematropica* 43:18-23.

Objetivou-se isolar e identificar fungos nematófagos dos gêneros *Paecilomyces* e *Pochonia* e avaliar o potencial destes no parasitismo de ovos de *M. javanica* sob diferentes temperaturas de incubação. Vinte e uma amostras de solos foram examinadas, plaqueadas e identificadas, obtendo-se culturas puras de diferentes isolados. A determinação do crescimento micelial e do parasitismo “in vitro” dos isolados sobre *M. javanica* foi realizada em placas de Petri contendo meio BDA e ágar-água, respectivamente. Os isolados foram incubados em BOD a temperaturas de 15, 20, 25, 30 e 35°C ± 2 com 12 doze horas de fotoperíodo. A avaliação do crescimento foi durante oito dias medindo-se o diâmetro das colônias e a determinação do parasitismo foi realizada depois de duas semanas de incubação, calculando-se a porcentagem de ovos parasitados. Dezesete isolados de *P. lilacinus* e três isolados de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia*, foram identificados. Os isolados de *P. lilacinus* apresentaram diferença quanto à velocidade de crescimento, e mostraram dependência da temperatura quanto ao parasitismo. Os três isolados de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* comportaram-se como parasitas de ovos.

Palabras clave: Controle biológico. *Meloidogyne* spp. *Paecilomyces lilacinus*. *Pochonia chlamydosporia*.

Para o manejo dos fitonematoides normalmente se recorre ao controle químico, cujo uso é mais limitado devido à alta toxicidade, risco de contaminação ambiental, alto custo e baixa eficácia de controle depois de repetidas aplicações (Dong e Zhang, 2006), para

os gêneros *Meloidogyne* spp. (nematoides das galhas) *Heterodera* spp. (nematoides de cisto), o controle químico não é muito eficiente, tornando-se essencial a busca por controle alternativo, como o controle através de agentes biológicos (Araújo *et al.*, 2002).

Tabela 1. Localidades das amostras de solo das diferentes regiões do Brasil e ocorrência de fungos parasitas de ovos de nematoide por região.

Amostra de solo	Localidades	Fungos isolados	Código de referencia
1	Chapadão do Sul - MS	<i>P. lilacinus</i> ^y	PAE 1101
2	Chapadão do Céu - GO	<i>P. lilacinus</i>	PAE 1102
3	Chapadão do Céu - GO	<i>P. lilacinus</i>	PAE 1103
4	Jataí - GO	<i>P. lilacinus</i>	PAE 1104
5	Jataí - GO	<i>P. lilacinus</i>	PAE 1105
6	Jataí - GO	<i>P. lilacinus</i>	PAE 1106
7	Mineiros - GO	<i>P. lilacinus</i>	PAE 1107
8	Jataí - GO	<i>P. lilacinus</i> <i>P. chlamydosporia</i> ^z	PAE 1108 POC 1108
9	Chapadão do Céu - GO	<i>P. lilacinus</i> <i>P. chlamydosporia</i>	PAE 1109 POC 1109
10	Lucas do Rio Verde - MT	<i>P. lilacinus</i>	PAE 1110
11	Lucas do Rio Verde - MT	<i>P. lilacinus</i>	PAE 1111
12	Promissão - SP	<i>P. lilacinus</i>	PAE 1112
13	Bom Jesus da Lapa - BA	<i>P. lilacinus</i>	PAE 1113
14	Chapadão do Céu - GO	<i>P. lilacinus</i>	PAE 1114
16	Chapadão do Céu - GO	<i>P. lilacinus</i> <i>P. chlamydosporia</i>	PAE 1116 POC 1116
17	Campo Novo do Parecis - MT	<i>P. lilacinus</i>	PAE 1117
18	Bom Jesus da Lapa - BA	<i>P. lilacinus</i>	PAE 1118

^y*Paecilomyces lilacinus*

^z*Pochonia chlamydosporia*

Tabela 2. Caracterização dos isolados de *Pochonia chlamydosporia* quanto à coloração das colônias parte superior e no reverso da placa, presença ou não de clamidósporos, crescidos em meio BDA (Batata, Dextrose, Ágar) a 25°C.

Isolado	Coloração da colônia			Formação de clamidósporos
	Superfície	Reverso		
POC 1108	Branca	Creme		Externo
POC 1109	Branca	Creme		Externo
POC 1116	Branca	Creme		Externo

Tabela 3. Medição das estruturas reprodutivas dos isolados de *Pochonia chlamydosporia*.

Isolado	Fiálide (µm)		Conídio (µm)		Clamidósporos (µm)	
	nº	comprimento	largura	comprimento	largura	comprimento
POC 1108	2	18,3	1,3	4,2	23,1	20,5
POC 1109	3	12,1	1,5	3,7	24,3	19,3
POC 1116	3	22,6	2,2	4,4	24,1	18,2

O controle biológico apresenta várias vantagens em relação ao químico, pois não desequilibra o meio ambiente, não deixa resíduo e é de fácil aplicação (De Leij e Kerry, 1991). Dentre o grande número de fungos parasitas de ovos conhecidos, *Paecilomyces lilacinus* (Thom.) Samsom e *Pochonia chlamydosporia* (Goddard) Zare e Gams, têm apresentado os melhores resultados (Santiago *et al.*, 2006; Cadioli *et al.*, 2009; Franco-Navarro *et al.*, 2009; Nunes *et al.*, 2010).

Paecilomyces lilacinus parasita de ovos, fêmeas e de cistos de nematoides, detectado em diferentes tipos de hospedeiros e solos, e sua eficácia varia entre os isolados (Goettel *et al.*, 2001; Sosa-Gomez, 2002; Jacobs *et al.*, 2003). *Pochonia chlamydosporia* parasita de nematoides de galha e tem sido descrito, também, como parasita de fungos patogênicos de plantas, com propriedades que o tornam um potencial bioagente de controle de doenças de plantas (Kerry *et al.*, 1984; De Leij *et al.*, 1993; Hidalgo-Diaz *et al.*, 2000; Monfort *et al.*, 2005).

Para que se possa saber se os isolados fungicos podem, ou não, ser utilizados no controle de nematoides, é necessário conhecer as melhores condições de multiplicação, principalmente no que se refere à temperatura, pelo fato da exposição à variação térmica que ocorre no solo durante o ano (Fioretto & Villacorta, 1981).

Devido à importância desses microrganismos na agricultura, este trabalho teve por objetivo isolar e identificar fungos nematófagos *P. lilacinus* e *P. chlamydosporia* e avaliar o potencial desses no parasitismo de ovos de *M. javanica* em diferentes temperaturas de incubação.

Amostras de solo de diferentes regiões do Brasil (Tabela 1) foram utilizadas para o isolamento das espécies fúngicas. Para o isolamento de *Paecilomyces* foi empregada a técnica de diluição seriada até 1×10^{-3} utilizando-se 10 g de cada solo amostrado, separadamente, em Erlenmeyer de 200 mL, contendo 90 mL de água esterilizada, alíquota de 1 mL desta diluição foi plaqueada em meio de cultura semi-seletivo de Alves *et al.* (1998), modificado segundo proposto por Santiago *et al.* (2006). Os isolados foram transferidos para placas de Petri contendo meio BDA (200 g batata, 1000 mL de água destilada, 20 g dextrose, 20 g ágar), e incubados em BOD (Biochemical Oxygen Demand) a $25^{\circ}\text{C} \pm 2$, para o desenvolvimento das colônias puras. As colônias foram caracterizadas pela medição do crescimento radial (duas medidas diametralmente opostas), considerando suas hifas vegetativas com diâmetro variável entre 2,5-4,0 μm , as quais consistem de micélio floconoso, inicialmente branco, e que durante a esporulação apresenta uma coloração violácea (Samsom, 1974).

Para a obtenção dos isolados de *Pochonia*, amostras de 10 g de solo foram adicionadas em 90 mL de água esterilizada, e agitadas por 30 minutos, para posterior diluições em série 1×10^{-4} , uma alíquota de 1 mL de cada amostra foi distribuída em placas de Petri com meio

semi-seletivo (Gaspard *et al.*, 1990). As placas foram armazenadas a $26^{\circ}\text{C} \pm 2$ no escuro até o crescimento das colônias fúngicas, que foram transferidos para placas de Petri com meio de cultura 'Com Meal Agar' (CMA), posterior, discos de micélio de 5 mm foram transferidos para placas de Petri com meio BDA, armazenadas no escuro a $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ por 10 dias. A caracterização foi realizada medindo o crescimento radial (duas medidas diametralmente opostas), coloração das colônias (na parte superior e no reverso da placa), presença ou não de clamidósporos e medição de estruturas reprodutivas (Gams, 1988).

Para a avaliação da medição de estruturas reprodutivas dos isolados de *Pochonia* foi utilizada a técnica de microcultura (Martins *et al.*, 2008). Após as lâminas foram observadas a microscópio de luz com câmera de vídeo digital (Motacam 2300) acoplado, medindo o comprimento e largura das hialídes, conídios e clamidósporos.

População de *M. javanica* foi obtida de raízes de tomate (*Solanum lycopersicum*) cv. Santa Cruz cultivadas durante 45 dias em casa de vegetação. As raízes foram coletadas, lavadas cuidadosamente e submetidas a técnica de Bonetti e Ferraz (1981), a suspensão obtida foi ajustada para uma concentração média de 300 ovos + juvenis (J_2) mL.

Para a avaliação do potencial dos isolados sobre o *M. javanica*, discos de micélio (5 mm) foram removidos das culturas puras, mantidas em meio BDA, e transferidos para placas de Petri com ágar-água a 2%, adicionado 1 mL/placa da suspensão de nematoides. Estas foram incubadas em cinco diferentes temperaturas (15, 20, 25, 30 e $35^{\circ}\text{C} \pm 2$), com 12 horas de fotoperíodo, com três repetições por isolados.

Após duas semanas avaliou-se 15 ovos aleatoriamente por placa, com auxílio de microscópio de luz, acrescido de algumas gotas de lactofenol, obtendo as porcentagens de parasitismo. Os dados foram submetidos à análise de variância e ao teste de Scott Knott a 5% de significância.

Das amostras de solos analisados foram obtidos e caracterizados 17 isolados de *P. lilacinus* e três de *P. chlamydosporia*, observando *P. lilacinus* em 80% das amostras (Tabela 1). Todos os isolados de *Pochonia* apresentaram produção de clamidósporos externos no micélio e coloração no reverso da placa creme (Tabela 2), as medidas das estruturas reprodutivas foram utilizadas para identificação das espécies dos isolados (Tabela 3). Caracterizando as espécies como *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia*, apresentando conídios hialinos subglobosos a elipsóide, produzindo agrupamentos de conídios em cabeça (Hidalgo *et al.*, 2000; Zare *et al.*, 2001; Zare e Gams, 2004).

Com relação à média do crescimento micelial (Tabela 4) dos isolados de *P. lilacinus*, houve diferença estatística, observando que os isolados PAE1101, PAE1103, PAE1106, PAE1112, PAE1116 e PAE1118 apresentaram um desenvolvimento micelial superior em comparação com os demais, corroborado Cadioli *et*

Tabela 4. Crescimento micelial e parasitismo em diferentes temperaturas dos ovos de *Meloidogyne javanica* pelos isolados de *Paecilomyces lilacinus* "in vitro".

Isolado	Crescimento micelial	% Parasitismo				
		15°C	20°C	25°C	30°C	35°C
PAE1101	3,95 ^y a ^z	59,7 c	55,6 b	77,6 a	73,3 b	68,9 b
PAE1102	3,71 b	68,9 c	68,9 a	53,3 b	57,8 c	73,3 b
PAE1103	3,82 a	71,1 c	71,1 a	66,7 b	80,0 b	71,1 b
PAE1104	3,71 b	60,0 c	55,3 b	75,6 a	57,7 c	68,9 b
PAE1105	3,73 b	62,3 c	55,6 b	68,9 b	73,3 b	68,8 b
PAE1106	3,96 a	71,1 c	73,3 a	71,1 b	60,0 c	62,2 b
PAE1107	3,77 b	80,0 b	68,9 a	66,7 b	71,1 b	80,0 a
PAE1108	3,71 b	64,3 c	64,7 b	57,8 b	71,1 b	82,2 a
PAE1109	3,60 b	66,7 c	80,0 a	91,1 a	84,4 a	93,3 a
PAE1110	3,71 b	66,7 c	66,7 a	66,7 b	66,6 c	64,4 b
PAE1111	3,70 b	53,0 c	66,7 a	73,3 a	73,3 b	53,3 b
PAE1112	3,92 a	62,2 c	60,0 b	93,3 a	75,5 b	62,2 b
PAE1113	3,60 b	68,8 c	68,9 a	82,3 a	55,5 c	33,3 c
PAE1114	3,70 b	91,1 a	77,6 a	75,6 a	91,1 a	40,0 c
PAE1116	3,93 a	80,0 b	73,3 a	60,0 b	60,0 c	62,2 b
PAE1117	3,70 b	75,7 b	71,1 a	73,3 a	75,5 b	57,7 b
PAE1118	3,94 a	91,1 a	88,6 a	75,6 a	93,3 a	62,2 b
Testemunha	-	0,0 d	0,0 c	0,0 c	0,0 d	0,0 d
C.V. (%)	3,89	12,0	13,39	14,56	12,48	14,63

^y Dados referentes a médias de três repetições.

^z Médias seguidas de mesma letra na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Scoot-Knott em nível de 5% de significância.

Tabela 5. Crescimento micelial e parasitismo em diferentes temperaturas dos ovos de *Meloidogyne javanica* pelos isolados de *Pochonia chlamydosporia* "in vitro".

Isolado	Crescimento micelial	% Parasitismo				
		15°C	20°C	25°C	30°C	35°C
POC 1108	4,0 ^y a ^z	75,5 a	75,5 a	73,3 a	42,2 a	64,4 a
POC 1109	4,3 a	73,3 a	77,8 a	77,8 a	53,3 a	73,3 a
POC 1116	3,8 a	64,4 a	57,7 b	75,5 a	46,6 a	44,4 a
Testemunha	-	0,0 b	0,0 c	0,0 b	0,0 b	0,0 b
C.V. (%)	5,04	13,49	10,95	14,0	17,12	27,05

^y Dados referentes a médias de três repetições.

^z Médias seguidas de mesma letra na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Scoot-Knott em nível de 5% de significância.

al., (2007). No entanto para o crescimento micelial de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* não observou-se diferença estatística significativa (Tabela 5).

Quanto à avaliação do potencial de parasitismo todos os isolados foram hábeis para parasitar ovos de *M. javanica*, diferindo estatisticamente entre si e entre as temperaturas (Tabela 4) indicando uma dependência de temperatura para o parasitismo de *P. lilacinus*.

Os isolados PAE1114 e PAE1118 destacaram-se na temperatura de 15°C, com percentuais de parasitismo de 91,1%. Para 30°C, PAE1109, PAE1114 e PAE1118 variaram de 93,3 a 84,4% de parasitismo e os isolados PAE1107, PAE1108 e PAE1109 apresentaram maior porcentagem de parasitismo a 35°C. Freitas *et al.* (1995) observaram a efetividade dos isolados de *P. lilacinus* sobre *M. javanica* “*in vitro*” e casa de vegetação.

Na Tabela 5 para a temperatura de 20°C os isolados POC1108 e POC 1109 apresentaram diferença estatística quanto ao parasitismo dos ovos, característica observada por Arevalo *et al.* (2009). Variações quanto à capacidade de colonizar os ovos de nematoides são comumente observadas dentro de uma mesma espécie fúngica, Stirling e West (1991) observaram que isolados de *Verticillium chlamydosporium* e de *P. lilacinus* apresentaram variabilidade na patogenicidade.

Os resultados apresentados no estudo confirmam pelo teste “*in vitro*” o potencial de parasitismo dos isolados nematófagos. Estes isolados serão melhores estudados em casa de vegetação e a campo, a fim de escolher o melhor para aplicação no manejo contra *M. javanica*.

LITERATURA CITADA

- Alves, S. B., J. E. M. Almeida, e A. Moino, Jr. 1998. Técnicas de laboratório. Controle microbiano de insetos. Piracicaba: FEALQ.
- Arevalo, J., L. Hidalgo-Díaz, I. Martins, J. F. Souza, J. M. C. Castro, R. M. D. G. Carneiro, and M. S. Tigano. 2009. Cultural and morphological characterization of *Pochonia chlamydosporia* and *Lecanicillium psalliotae* isolated from *Meloidogyne mayaguensis* eggs in Brazil. *Tropical Plant Pathology*. 34:158-163.
- Araujo, W. L., A. O. S. Lima, J. L. Azevedo, J. Marcon, J. Kublincky-Sobral, e P. T. Lacava. 2002. Manual: isolamento de microrganismos endofíticos. Piracicaba: Calq.
- Bonetti, J. I. S., e S. Ferraz. 1981. Modificações do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* em raízes de cafeeiro. *Fitopatologia Brasileira*, 6:533.
- Cadioli, M. C., D. C. Santiago, A. T. Hoshino, e M. Homechin. 2007. Crescimento micelial e parasitismo de *Paecilomyces lilacinus* sobre ovos de *Meloidogyne paranaensis* em diferentes temperaturas “*in vitro*”. *Ciênc. Agrotec.* 31:305-311.
- Cadioli, M. C., D. C. Santiago, A. D. Oliveira, V. dos S. Paes, G. O. Arieira, e F. C. Baida. 2009. Efeito de isolados de *Paecilomyces lilacinus* no desenvolvimento de cafezais e na população de *Meloidogyne paranaensis*. *Ciência e Agrotecnologia*. 33:713-720.
- De Leij, F. A. A. M., and B. R. Kerry. 1991. The fungus *Verticillium chlamydosporium* as a potential biological control agent for *Meloidogyne arenaria*. *Revue de ematologie*, 14:157-164.
- De Leij, F. A. A. M., B. R. Kerry, and J. A. Dennehy, 1993. *Verticillium chlamydosporium* as a biological control agent for *Meloidogyne incognita* and *M. hapla* in pot and microplot tests. *Nematologica*, 39:115-126.
- Dong, L. Q., and K. Q. Zhang. 2006. Microbial control of plant-parasitic nematodes: a five-party interaction. *Plant Soil*. 288:31-45.
- Fioretto, A. M. C., e A. Villacorta, 1981. Exigências térmicas para o desenvolvimento do fungo nematófago *Paecilomyces lilacinus*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 24:975-978.
- Franco-Navarro, F., K. Vilchis-Martínez, and J. Miranda-Damián. 2009. New records of *Pochonia chlamydosporia* from Mexico: isolation, root colonization and parasitism of *Nacobbus aberrans* eggs. *Nematropica*. 39:133-142.
- Freitas, L. G., S. Ferraz, and J. J. Muchovej. 1995. Effectiveness of different isolates of *Paecilomyces lilacinus* and an isolates of *Cylindrocarpon destructans* on the control of *Meloidogyne javanica*. *Nematropica*. 25:109-115.
- Gams, W. 1988. A contribution to the knowledge of nematophagous species of *Verticillium*. *Netherlands Journal of Plant Pathology*. 94:123-148.
- Gaspard, J. T., B. A. Jaffe, and H. Ferris. 1990. Association of *Verticillium chlamydosporium* and *Paecilomyces lilacinus* with root-knot nematode infested soil. *Journal of Nematology*. 22:207-213.
- Goettel, M. S., A. E. Hajek, J. P. Siegel, and H. C. Evans. 2001. Safety of fungal biocontrol agents. In: Butt, T. M., C. Jackson, N. Magan (eds). *Fungal as biocontrol agents: problems, progress and potential*. United Kingdom: CABI Publishing.
- Hidalgo-Díaz L., J. M. Bourne, B. R. Kerry, and M. G. Rodríguez. 2000. Nematophagous *Verticillium* spp. in soils infested with *Meloidogyne* spp. in Cuba: isolated and screening. *International Journal of Pest Management*. 46:277-284.
- Jacobs, H., S. N. Gray, and D. H. Crump. 2003. Interactions between nematophagous fungi and consequences for their potential as biological agents for the control of Potato cyst Nematodes. *Mycological Research*. 107:47-56.
- Kerry, B. R., A. Simon, and A. D. Rovira. 1984. Observations on the introduction of *Verticillium chlamydosporium* and other parasitic fungi into soil for the control of the cereal cyst nematode *Heterodera avenae*. *Annals of Applied Biology*. 105:509-516.

- Martins, A., M. L. Braúna, I. Martins, e S. C. M. Mello. 2008. Técnica modificada de microcultura de fungos para visualização microscópica. ISSN 9192-0099, Brasília DF.
- Monfort, E., L. V. Llopez-Lorca, H. B. Jansson, J. Salinas, J. O. Park, and K. Sivasithamparam. 2005. Colonisation of seminal roots of wheat and barley by egg parasitic nematophagous fungi and their effects on *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* and development of root-knot. *Soil Biology and Biochemistry* 37:1229-1235.
- Nunes, H. T., A. C. Monteiro, e A. W. V. Pomela. 2010. Uso de agentes microbianos e químico para o controle de *Meloidogyne incognita* em soja. *Acta Scientiarum Agronomy (Online)*. 32:403-409.
- Samsom, R. A. 1974. *Paecilomyces* and some allied Hyphomycetes. *Studies in Micology*. 6:1-119.
- Santiago, D. C., M. Homechin, J. F. V. Silva, E. R. Ribeiro, B. C. Gomes, e P. H. Santoro. 2006. Seleção de isolados de *Paecilomyces lilacinus* (Thom.) Samson para controle de *Meloidogyne paranaensis* em tomateiro. *Ciência Rural*. 36:1055-1064.
- Sosa-Gomez, D. R. 2002. Fungos entomopatogênicos: catálogo de isolados. Londrina: Embrapa-Soja. 1:1-32.
- Stirling, G. R., and L. M. West. 1991. Fungal parasites of root-knot nematode eggs from tropical and subtropical regions of Australia. *Australasian Plant Pathology*. 20:149-154.
- Zare, R., W. Gams, and H. C. Evans. 2001. A revision of *Verticillium* Section Prostrata. V. The Genus *Pochonia*, with notes On Rotiferophthora. *Nova Hedwigia*. 73:1-86.
- Zare, R., and W. Gams. 2004. A Monograph of *Verticillium* Section Prostrata Rostaniha. *Botanical Journal of Iran, Supplement 3*: 188.

Received:

9/VII/2012

Accepted for publication:

9/I/2013

Recibido:

Aceptado para publicación: