

MARIANA FERNANDES NAIME

**ISOLAMENTO DE FUNGOS COM ATIVIDADE NEMATOFÁGICA
EM SOLO PARANAENSE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação de Microbiologia, Parasitologia e Patologia do Setor de Ciências Biológicas e do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Vanete Thomaz Soccol

Curitiba

2009

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais pelo estímulo constante para que eu conheça e faça sempre algo mais, na busca da superação.

À Professora Dr.^a Vanete Thomaz Soccol pela orientação deste trabalho e pela dedicação e conhecimentos transmitidos ao longo desse tempo.

Ao Professor Dr. Carlos Ricardo Soccol pela orientação no início deste trabalho e por disponibilizar o Laboratório de Processos Biotecnológicos para que este trabalho pudesse ser desenvolvido.

À funcionária e amiga Mitiyo Miyaoka por todo apoio, conhecimento, amizade e pelos bons momentos que passamos juntas.

À colega de mestrado Mara Scheffer pelo convívio, não apenas durante o período letivo, mas também pela amizade que construímos.

Aos colegas do Laboratório de Bioprocessos da UFPR, pela amizade e companheirismo.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	1
LISTA DE FIGURAS	4
LISTA DE TABELAS	6
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	7
RESUMO	9
ABSTRACT	10
1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	18
2.1 OBJETIVO GERAL.....	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
3 MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1 COLETA E ARMAZENAMENTO DE SOLO PARA ISOLAMENTO DE FUNGOS.....	19
3.2 ISOLAMENTO DE FUNGOS NEMATÓFAGOS DO SOLO.....	19
3.3 OBTENÇÃO DE CULTURAS PURAS E MANUTENÇÃO DOS FUNGOS EM TUBOS DE ENSAIO.....	20
3.4 AQUISIÇÃO E MANUTENÇÃO DE CEPAS REFERÊNCIA.....	21
3.5 TESTE DE CRESCIMENTO DO FUNGO EM MEIO CONTENDO QUITINA.....	22
3.5.1 Teste de crescimento dos fungos em diferentes concentrações de quitina.....	22
3.5.2 Teste de viabilidade das amostras em quitina.....	23
3.5.3 Coloração das placas contendo isolados viáveis em quitina.....	23
3.6 VIABILIDADE E PRESERVAÇÃO DE FUNGOS NEMATÓFAGOS EM MEIO CMA.....	24
3.7 TESTE DE PREDUÇÃO DOS FUNGOS NOS NEMATÓDEOS.....	24
3.8 CRESCIMENTO RADIAL.....	25
3.9 MICROCULTIVO.....	26
3.10 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS.....	27
3.10.1 Extração do DNA.....	27
3.10.2 Amplificação da região ITS.....	28

3.10.3	ARDRA - Análise do polimorfismo no comprimento de fragmentos obtidos por enzimas de restrição nos produtos amplificados da região ITS.....	28
3.10.4	RAPD - Random Arbitrary Polimorfism DNA	29
3.10.5	Sequenciamento.....	29
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
4.1	COLETA DAS AMOSTRAS DE TERRA PARA ISOLAMENTO DE FUNGOS DE INTERESSE BIOTECNOLÓGICO.....	31
4.2	ISOLAMENTO DE FUNGOS NEMATÓFAGOS DO SOLO.....	34
4.3	OBTENÇÃO DE CULTURAS PURAS DE FUNGOS E MANUTENÇÃO DESSES FUNGOS EM TUBOS DE ENSAIO.....	36
4.5	TESTE DE CRESCIMENTO DOS FUNGOS ISOLADOS EM MEIO CONTENDO QUITINA.....	37
4.5.1	Teste de crescimento em diferentes concentrações de quitina.....	37
4.5.2	Teste de viabilidade das amostras de fungo em meio contendo quitina.....	38
4.5.3	Coloração com azul de algodão das placas contendo isolados viáveis em meio contendo 2,5% de quitina.....	40
4.6	CRESCIMENTO DOS FUNGOS ISOLADOS EM MEIO CMA.....	40
4.7	TESTE DE PREDUÇÃO DOS FUNGOS ISOLADOS E CEPAS REFERÊNCIA EM <i>Panagrellus</i> sp.....	41
4.8	CRESCIMENTO RADIAL.....	42
4.9	MICROCULTIVO.....	44
4.10	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS.....	48
5	CONCLUSÃO.....	51
6	PERSPECTIVAS.....	52
	REFERÊNCIAS.....	53
	ANEXOS.....	63

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	MAPA DO ESTADO DO PARANÁ E PONTOS DE COLETA.....	32
FIGURA 2 -	TESTE DE CRESCIMENTO DO ISOLADO 1AB EM MEIO CONTENDO 2,5% DE QUITINA, UM DOS ISOLADOS QUE MELHOR SE DESENVOLVEU.....	39
FIGURA 3 -	TESTE DE CRESCIMENTO DO ISOLADO 1CA EM MEIO CONTENDO 2,5% DE QUITINA, UM DOS ISOLADOS QUE MELHOR SE DESENVOLVEU.....	39
FIGURA 4 -	TESTE DE CRESCIMENTO DO ISOLADO 2AB EM MEIO CONTENDO 2,5% DE QUITINA, UM DOS ISOLADOS QUE POUCO SE DESENVOLVEU.....	39
FIGURA 5 -	TESTE DE CRESCIMENTO DO ISOLADO 3CB EM MEIO CONTENDO 2,5% DE QUITINA, UM DOS ISOLADOS QUE POUCO SE DESENVOLVEU.....	39
FIGURA 6 -	ATIVIDADE NEMATOFÁGICA (ANÉIS NÃO CONSTRITORES) DO ISOLADO 3CB EM AUMENTO DE 40x.....	42
FIGURA 7 -	ATIVIDADE NEMATOFÁGICA (REDES ADESIVAS) DO ISOLADO 4GB EM AUMENTO DE 40x.....	42
FIGURA 8 -	CRESCIMENTO RADIAL DO FUNGO ISOLADO 1AC QUE APRESENTOU POUCO CRESCIMENTO.....	43
FIGURA 9 -	CRESCIMENTO RADIAL DO FUNGO ISOLADO 2AB, PIGMENTAÇÃO VERDE, QUE CRESCEU POR TODA A PLACA.....	43
FIGURA 10 -	CRESCIMENTO RADIAL DO FUNGO ISOLADO 1CB, PIGMENTAÇÃO ALARANJADA, QUE APRESENTOU MENOR CRESCIMENTO.....	44
FIGURA 11 -	CRESCIMENTO RADIAL DO FUNGO ISOLADO 3CA QUE APRESENTOU MELHOR CRESCIMENTO DENTRE OS FUNGOS ISOLADOS.....	44
FIGURA 12 -	CRESCIMENTO RADIAL DA CEPA REFERÊNCIA <i>M. thaumasium</i>	44
FIGURA 13 -	ISOLADO 1AB COM CORANTE AZUL DE ALGODÃO EM AUMENTO DE 40x.....	46

FIGURA 14 - ISOLADO 1FB COM CORANTE AZUL DE ALGODÃO EM AUMENTO DE 15x.....	46
FIGURA 15 - ISOLADO 4EB COM CORANTE AZUL DE ALGODÃO EM AUMENTO DE 40x.....	47
FIGURA 16 - ISOLADO 1HB COM CORANTE AZUL DE ALGODÃO EM AUMENTO DE 15x.....	47
FIGURA 17 - BANDAS OBTIDAS DOS ISOLADOS DE FUNGOS APÓS A AMPLIFICAÇÃO COM PRIMERS LS266 e V9D.....	48
FIGURA 18 - BANDAS DE DNA AMPLIFICADAS POR PCR-RAPD DE ISOLADOS DE FUNGOS PROVENIENTES DE DIFERENTES REGIÕES DO ESTADO DO PARANÁ.....	49
FIGURA 19 - BANDAS OBTIDAS APÓS RESTRIÇÃO COM ENZIMA <i>Hae</i> III.....	49

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	NÚMERO DE AMOSTRAS DE SOLO, LOCAIS E DATA DE COLETA.....	33
TABELA 2 -	AGRUPAMENTO POR REGIÃO DOS ISOLADOS OBTIDOS.....	35
TABELA 3 -	ISOLADOS QUE SE DESENVOLVERAM EM MEIO BDA.....	36
TABELA 4 -	ISOLADOS QUE CRESCERAM EM MEIO CONTENDO 2,5% DE QUITINA.....	39
TABELA 5 -	CRESCIMENTO DE FUNGO ISOLADO A PARTIR DE SOLO EM MEIO CMA.....	40
TABELA 6 -	FUNGOS ISOLADOS QUE APRESENTARAM ATIVIDADE NEMATOFÁGICA.....	41
TABELA 7 -	ISOLADOS SUBMETIDOS AO TESTE DE CRESCIMENTO RADIAL.....	43
TABELA 8 -	ISOLADOS SUBMETIDOS AO TESTE DE MICROCULTIVO.....	46
TABELA 9 -	GRUPAMENTO DOS ISOLADOS CONFORME SEMELHANÇA OBSERVADA EM MICROCULTIVO.....	47
TABELA 10 -	AGRUPAMENTOS DOS ISOLADOS DE FUNGOS SEGUNDO A TÉCNICA DE RAPD.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

® – Marca registrada

µl – Microlitro

AA – Agar água

ARDRA – Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis

ATCC – American Type Culture Collection

atm – Atmosfera

BDA – Batata Dextrose Agar

bp – Pares de base

cm – Centímetro

cm² – Centímetro quadrado

CMA – Corn Meal Agar

CTAB – Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

dNTP – Desoxirribonucleotídeo Trifosfato

g – Grama

h – Hora

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

ITS – Internal Transcribed Spacer

larvas/ml – Larvas por mililitro

LPB – Laboratório de Processos Biotecnológicos

m – Metro

min – Minuto

ml – Mililitro

mm – Milímetro

mM – Mili Mol

ng – Nanograma

n^o – Número

NVL – Nematóide de Vida Livre

°C – Grau centígrado

PCR – Polymerase Chain Reaction

PCR-RFLP – Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism

PIB – Produto Interno Bruto

pmol/ μ L – Pico mol por microlitro

pmol – Pico mol

ppm – Parte por milhão

RAPD – Random Amplified Polymorphic DNA

rpm – Rotações por minuto

S – Sul

s - Segundos

TaqDNA polimerase – *Thermus aquaticus* DNA polimerase

ton/eq – Tonelada por equivalência

U - Unidade

UFPR – Universidade Federal do Paraná

μ g/ml – Micrograma por mililitro

US\$ – Dólar

UV – Ultravioleta

V – Volts

V/cm – Volts por centímetro

W - Oeste

x – vezes

RESUMO

Foram coletadas amostras de solo em vinte e três localidades do estado do Paraná com o objetivo de isolar fungos com atividade nematofágica. Sessenta e nove amostras foram isoladas e submetidas a testes como: crescimento em meio BDA (batata dextrose agar), em meio contendo quitina e sais, em meio CMA (corn meal agar), crescimento radial, microcultivo e efetuada a identificação molecular. Quatro isolados se desenvolveram mais significativamente em meio contendo quitina; em meio contendo CMA, cresceram vinte isolados. Em crescimento radial, cinco isolados demonstraram velocidade de crescimento semelhante entre si. Das sessenta e nove amostras, onze apresentaram atividade nematofágica. Dessas, três isolados tiveram como método de predação anéis não constritores e oito se utilizaram de redes adesivas. Pelo método de microcultivo foram identificados seis grupos com características morfológicas diferentes. Por identificação molecular foram distinguidos três grupos. Num dos grupos, identificou-se quatro isolados pertencentes ao gênero *Fusarium*.

Palavras-chave: fungos nematófagos, isolamento, identificação.

ABSTRACT

Soil samples were collected over twenty three areas in Paraná State looking forward to isolate nematophagous fungi. Sixty nine samples were isolated and submitted to trial as: growing PDA (potato dextrose agar) environment, environment with chitin and salt, CMA (corn meal agar) environment, radius growing, microcultiive and after, it was made the molecular identification. Four isolated developed more significant in environment with chitin; in CMA environment, twenty grew isolated. In radius growing, five isolated shown growing speed from each other. From the sixty nine samples, eleven have shown nematophagic activity. Of them, three samples utilize non-constrictive rings and eight utilized adhesive branches. Utilizing microcultiive method was possible to identify six groups of fungi with different morphologic characteristics. By molecular identification, three groups were identified. One of these groups, were found four isolated fungi, belong to *Fusarium* genus.

Keywords: nematophagous fungi, isolation, identification.

1 INTRODUÇÃO

Conforme dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2009), o Brasil possui 207.157.000 cabeças de gado bovino e o Paraná, 10.153.000, o que representa 5,4% da participação nacional, ocupando o 8º lugar. A produção de leite brasileira é da ordem de 24.572 milhões de litros e a paranaense é de 2.519 milhões de litros, ocupando o 5º lugar. Quanto aos ovinos, em 2005 o Brasil possuía 15.588.000 de cabeças e o Paraná, 512.000, representando o 6º lugar; quanto aos caprinos, 10.307.000 cabeças no país e 115.000 no estado do Paraná, ocupando o 9º lugar. A pecuária contribui significativamente na constituição do Produto Interno Bruto (PIB) do agronegócio no Brasil. A exemplo, em 2008, cresceu quase 4% no primeiro quadrimestre comparado ao ano de 2007 (MINISTÉRIO DO PLANEJAMENTO, 2009). No comércio mundial, a carne brasileira compete com os maiores exportadores (Austrália e Argentina) por meio de preços atrativos e pela qualidade incomparável da carne, conhecida por “carne verde”. Em 2005, o Brasil produziu aproximadamente 9 milhões ton/eq carcaça e exportou 2,1 milhões ton/eq de carne bovina, o que corresponde a uma receita de US\$ 3 bilhões, um crescimento de 20% em relação a 2004 (BRASIL PECUÁRIA, 2009).

Há, no entanto, alguns entraves para o fortalecimento pleno dessa atividade produtiva. Dentre os fatores que interferem no desenvolvimento da pecuária, as helmintoses gastrintestinais ocupam lugar de destaque (MACRAE, 1993). Considere-se que no Brasil os animais, especialmente os ruminantes, são criados em sua maioria de modo extensivo, dificultando o uso de produtos químicos para controle das nematodioses gastrintestinais. Os prejuízos estão relacionados ao retardo na produção, custos com tratamentos profiláticos e curativos e, em casos extremos, à morte dos animais. No Brasil, a taxa de mortalidade varia de 5% a 10% (BIANCHIN *et al.*, 1993).

Nos países em desenvolvimento, as doenças parasitárias causam prejuízos pela diminuição na produção e na restrição à criação de animais com reduzida suscetibilidade às parasitoses; nos países desenvolvidos os gastos devidos aos custos com controle são significativos. As raças de animais com

melhores índices produtivos raramente se sobressaem em condições ambientais onde há grande disponibilidade de parasitos durante todo o ano (PERRY e RANDOLPH, 1999).

O conhecimento sobre a epidemiologia dos parasitos e suas interações com os hospedeiros em um determinado ambiente e sistema produtivo são os requerimentos mais importantes no estabelecimento de um sistema de controle efetivo. A falta dessas informações pode levar à utilização inadequada de tratamentos anti-helmínticos, relacionada ao rápido desenvolvimento de resistência e traduzida em aumento de casos clínicos e perdas produtivas. Os programas de controle parasitários eficientes estão baseados em informações sobre disponibilidade de larvas no ambiente, detecção de fontes de infecção e conhecimento sobre as exigências climáticas para eclosão e viabilidade de larvas. Medidas preventivas baseadas nessas informações podem diminuir a frequência de tratamentos químicos e, quando associadas a outras formas de controle, podem reduzir a dependência de anti-helmínticos (STROMBERG, 1997; BARGER, 1999; STROMBERG & AVERBECK, 1999).

Substâncias químicas anti-helmínticas elevam o custo de produção e causam deterioração ecológica e pressão seletiva no genoma dos parasitos, selecionando mutantes altamente resistentes (FERNANDEZ *et al.*, 1985). Os problemas relacionados à resistência e ecotoxicidade enfatizam a necessidade de serem implementados programas integrados de controle parasitário que assegurem saúde e segurança dos organismos vivos, por meio de tratamentos estratégicos baseados no conhecimento da epidemiologia, eliminação de tratamentos desnecessários e utilização de pastoreio alternado com outras espécies. Além disso, deve-se evitar o uso continuado de uma mesma classe de anti-helmíntico, assim como a rápida rotação de compostos e a utilização de doses inferiores às recomendadas (LE JAMBRE, 2006). Práticas de manejo que contribuam para o aumento da imunidade pela nutrição e/ou vacinas também podem ser úteis para incrementar níveis produtivos. A utilização de taninos extraídos a partir de plantas que funcionem como vermífugos não resultou em estudos conclusivos (REW, 1999; THAMSBORG *et al.*, 1999; WILLIAMS, 1999), no entanto, os resultados obtidos por PAOLINI *et al.*, (2003)

que detectaram uma redução na fecundidade e na ovoposição de *Haemonchus contortus* em cabras, após a utilização de extratos de quebracho (*Schinopsis ssp.*), planta rica em taninos, somam-se a evidências da atividade anti-helmíntica deste composto (OLIVO *et al.*, 2007). Ainda não há evidências concretas de como a estrutura da pastagem influencia a sobrevivência de ovos e larvas de nematódeos gastrintestinais na pastagem (QUADROS, 2004). O arranjo espacial da comunidade de plantas que permite a insolação nas partes basais pode alterar o ecossistema e provocar a morte de muitos ovos e larvas (SANTOS *et al.*, 2002). MARTIN NIETO *et al.* (2003) encontraram diferenças no grau de infecção de ovelhas mantidas em pastagens formadas com capins diferentes, contudo não foi evidente a influência do hábito de crescimento da planta forrageira na contagem do OPG.

Uma alternativa que vem ganhando importância é o controle biológico (SKIPP *et al.*, 2002). Este é um método desenvolvido para diminuir uma população de parasitos pela utilização de antagonistas naturais. Os fungos nematófagos têm demonstrado eficácia em experimentos laboratoriais e no campo no controle de parasitos de animais domésticos, sem agredir os ecossistemas (DALLAPRIA *et al.* 1991; ARAÚJO *et al.*, 2000b). Este processo ocorre espontaneamente na natureza. Na ausência de controladores naturais, a população de um determinado organismo poderia aumentar indiscriminadamente, causando sérios prejuízos ao seu hospedeiro. A utilização de antagonistas naturais leva à diminuição da população de um agente causador de perdas produtivas à atividade pecuária ou agrícola a um limiar subclínico e economicamente aceitável (GRØNVOLD *et al.*, 1996). Na prática, o controle biológico não atua sobre estágios internos de parasitos. Concentra, contudo, suas ações sobre os hospedeiros intermediários, paratênicos, vetores e estágios larvais de vida livre, diminuindo a fonte de infecção para os hospedeiros definitivos. Portanto com esse método tem-se a vantagem da predação no ambiente, ação essa que nenhum produto químico é capaz. Além disso, causam menos efeitos negativos no ambiente que os métodos químicos. A utilização de fungos nematófagos pode ser altamente promissora para animais em pastejo que estão sendo constantemente infectados (ARAÚJO *et al.*, 1998 e 2003; LARSEN, 2000; MOTA *et al.*, 2003).

Num sistema de controle biológico, os microrganismos selecionados como antagonistas naturais devem possuir especificidade de ação, alta capacidade reprodutiva e suportar as condições ambientais no local em que o controle é realizado. A seleção de um agente que possa ser empregado comercialmente como controlador biológico de parasitos gastrintestinais de ruminantes está baseada na capacidade de produção de antagonista em escala industrial, nos custos relacionados a essa produção, na competitividade com drogas tradicionais estabelecidas no mercado e no tempo de sobrevivência do organismo em formulações comerciais (JACKSON & MILLER, 2006). Deve-se atentar para que as formulações ofereçam segurança para os produtores, consumidores, animais tratados e ao meio ambiente e, finalmente, que sejam efetivas no controle do organismo alvo (GRØNVOLD *et al.*, 1996).

Em sua grande maioria, os fungos nematófagos são considerados mitospóricos, classificados como Deuteromycetes, classe Hyphomycetes, ordem Hyphomycetales e família Moliniaceae. Estes organismos apresentam micélio septado e bem desenvolvido, reproduzindo-se agamicamente por esporos exógenos, que são formados sobre ramificações das hifas (VAN OORSCHOT, 1985).

O interesse no estudo da biologia do processo de infecção dos nematóides pelos fungos está relacionado ao potencial papel que estes agentes controladores biológicos podem desempenhar no controle de nematóides parasitos de animais e plantas. As espécies de fungos *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium* e *Arthrobotrys musiformis*, são identificadas como nematófagas (BARRON, 1977) e têm sido estudadas quanto ao seu potencial como agentes controladores biológicos de helmintos gastrintestinais de animais domésticos (ARAÚJO *et al.*, 1993, 1998, 1999, 2004b; LARSEN *et al.*, 1994, 1997; ALVES *et al.*, 2003).

Fungos nematófagos compõem três grandes grupos: fungos que fazem armadilhas para nematóides, fungos endoparasitas que atacam nematóides de estádios larvais utilizando-se de estruturas especializadas, e fungos parasitas de cistos e ovos que atacam esses estágios a partir das hifas (NORDBRING-HERTZ *et al.*, 2002).

Fungos nematófagos que fazem armadilhas e endoparasitas são encontrados em todos os grandes grupos taxonômicos de fungos e eles ocorrem principalmente em ambiente terrestre, como em folhas mofadas, madeiras e plantas deterioradas, esterco e briófitas vivas, sendo que estas últimas contêm grande fauna de nematóides sendo, portanto, seu maior reservatório (DUDDINGTON, 1951) e sobrevivem de forma principalmente saprofítica (FERNANDEZ *et al.*, 1985). A habilidade de usar nematóides como fonte nutricional adicional promove a esses fungos uma vantagem competitiva (BARRON, 1977). Esses fungos ativam o estágio parasita quando mudam a sua morfologia ou quando os esporos estão maduros; então eles geram as armadilhas (BARRON, 1977; DIJKSTERHUIS *et al.*, 1991; GRØNVOLD *et al.*, 1996; NORDBRING-HERTZ *et al.*, 2002).

A habilidade dos fungos que criam armadilhas para capturar nematóides está ligada com o desenvolvimento da fase específica do micélio desses fungos. O fungo predador desenvolve estruturas sofisticadas das hifas, como nós, redes, anéis e botões, e os nematóides são capturados mecanicamente ou por adesão. Como exemplos de armadilhas têm-se: redes adesivas tridimensionais; anéis constritores que capturam os nematóides mecanicamente; redes adesivas e nós adesivos, os quais produzem outros nós adesivos e anéis não constritores. Os tipos de estruturas a serem formadas pelos fungos dependem das espécies, das cepas e de condições ambientais. O fator biológico mais importante é a presença de nematóides, os quais não apenas induzem à formação de estruturas de armadilhas pelo contato com o micélio, como também servem de fonte alimentar para o fungo depois que eles invadem o nematóide (NORDBRING-HERTZ *et al.*, 2002). Quanto maior a motilidade dos nematóides, maior o estímulo ao fungo para a produção de armadilhas (NANSEN *et al.*, 1986, 1988).

As armadilhas são formadas diretamente da germinação do conídio (dos esporos) quando estes têm a capacidade de germinar em substratos naturais como esterco de bovinos ou solo rizosporo (PERSMARK & NORDBRING-HERTZ, 1995). Posteriormente ocorre a penetração das hifas na cutícula do nematóide e dentro dele se processa o crescimento das hifas e a digestão de conteúdos internos (MOTA *et al.*, 2003).

Estudos de ultra-estrutura do processo de penetração das hifas demonstraram que o nematóide é inicialmente mantido aderido ao fungo por meio de uma substância fibrilar adesiva rica em fosfatase ácida, que também é responsável pela degradação da cutícula. O processo de penetração está associado à presença de corpos densos, ricos em enzimas que atuam como peroxissomos, os quais são encontrados apenas nas armadilhas, e nunca em hifas vegetativas (JANSSON & NORDBRING-HERTZ, 1988).

Os fungos endoparasitas têm outro método de abordagem do nematóide, atacam com seus esporos e passam sua vida vegetativa dentro do nematóide infectado, aderidos à sua superfície ou são engolidos (NORDBRING-HERTZ *et al.*, 1995). Após a ingestão, os esporos desenvolvem hifas responsáveis pela absorção do conteúdo interno do nematóide. Esses fungos não produzem hifas vegetativas fora do corpo do hospedeiro, mas hifas férteis ou conidióforos contendo esporos (MOTA *et al.*, 2003).

O melhor local de utilização dos fungos nematófagos para o controle das verminoses nos animais domésticos é nas fezes frescas, onde todos os nematóides parasitos têm que passar, desde o estágio de ovo até os estágios larvais, antes de migrarem para a pastagem como larvas infectantes (ARAÚJO *et al.*, 2000a). Daí a importância de se determinar que espécies fúngicas são capazes de sobreviver à passagem pelo trato gastrointestinal dos animais, germinar nas fezes e capturar as larvas infectantes.

A habilidade desses fungos em sobreviver à passagem pelo trato gastrointestinal é um pré-requisito essencial a ser estudado para o uso estratégico destes organismos como controladores biológicos de nematóides gastrointestinais (WALLER *et al.*, 2001b).

As formulações à base de alginato de sódio têm sido avaliadas experimentalmente no controle de nematóides parasitas de animais por alguns laboratórios de pesquisa. Essas formulações têm demonstrado bons resultados em condições laboratoriais e a campo (ALVES *et al.*, 2003; ARAÚJO & SAMPAIO, 2000; ARAÚJO *et al.*, 2000a).

Para o desenvolvimento de uma produção comercial desses microrganismos, no entanto, é necessário que as formulações fúngicas sejam eficientes e economicamente viáveis (ARAÚJO *et al.*, 2000b).

No Brasil, na Câmara dos Deputados, acha-se em tramitação os Projetos de Lei n.º 1.062/2007 e n.º 1.166/2007, instituindo incentivo fiscal para o controle biológico de pragas agrícolas e de vetores de interesse para a saúde pública e animal. Anualmente as indústrias de pesticidas faturam cerca de US\$ 27 bilhões no mundo e, apesar disso, essas empresas investem muito pouco na área de desenvolvimento de produtos biológicos e em pesquisas (ARAÚJO *et al.*, 2000b).

Com o objetivo de utilizar e selecionar fungos promissores no controle biológico das nematodioses gastrintestinais de ruminantes, foi realizado no estado do Paraná um *screening* com o intuito de se isolar fungos com capacidade nematofágica e compará-los macro e microscopicamente aos fungos *Duddingtonia*, *Monacrosporium* e *Arthrobotrys*, os quais já foram estudados e sabe-se que têm essa habilidade.

2 OBJETIVOS

GERAL

Isolar fungos do solo paranaense e avaliar a sua atividade nematofágica *in vitro*.

ESPECÍFICOS

Realizar o isolamento de fungos nematofágos do solo em localidades cardeais do estado do Paraná.

Selecionar, em testes *in vitro*, os fungos nematofágos mais promissores no controle das nematodioses.

Comparar os fungos isolados do solo com cepas referência de fungos nematofágos.

Identificar, em nível de gênero, os fungos com atividade nematofágica por morfologia e biologia molecular.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 COLETA E ARMAZENAMENTO DE SOLO PARA ISOLAMENTO DE FUNGOS

Com a finalidade de isolar fungos com atividade nematofágica, foi realizada a coleta de solo em pontos cardeais do estado do Paraná, em locais onde existe material orgânico (área de pastagem, área agrícola e apriscos de animais), pois sabe-se que nesses locais há uma probabilidade maior de se encontrar fungos com capacidade nematofágica.

No período de 20/07 (vinte de julho) a 24/11 de 2006 (vinte e quatro de novembro de dois mil e seis), foram coletadas 23 amostras de solo. Cada amostra foi coletada a uma profundidade máxima de 10 cm e selecionados cinco pontos distintos para a mesma coleta. Cada amostra era composta de aproximadamente 300 g. O material foi colocado em um recipiente para fazer a homogeneização e a retirada de 200 g. Cada amostra foi depositada em saco plástico, devidamente identificada com local da coleta e data. As amostras foram colocadas em isopor com gelo para transporte até o laboratório.

No laboratório, as amostras foram guardadas em potes plásticos, identificadas e armazenadas sob refrigeração (4°C).

3.2 ISOLAMENTO DE FUNGOS NEMATÓFAGOS DO SOLO

Com o objetivo de se isolar do solo fungos com capacidade nematofágica, foi usado o método de espalhamento de solo (DUDDINGTON, 1955, modificado por SANTOS *et al.*, 1991; BARRON, 1977).

Nas 23 amostras de solo coletadas, foi realizado o isolamento em triplicata e de cada placa foram isolados um ou mais fungos.

Método para recuperação de nematóides de vida livre (NVL) *Panagrellus sp*

Os nematóides de vida livre (NVL) *Panagrellus sp* eram mantidos em meio de aveia em flocos, umedecida e amassada, em placas de Petri (HEINTZ

& PRAMER, 1972) para serem utilizados como iscas e para a multiplicação dos inóculos.

Foi empregado o método de Baermann modificado por SANTOS *et al.*, 1991 (ANEXO 1), por meio do qual os NVL eram coletados e deixados em suspensão em água destilada esterilizada na concentração de 1×10^3 larvas/ml.

Método para o isolamento de fungos

As 23 amostras de solo coletadas foram identificadas conforme número e letra: o número identifica a sequência das amostras relativas à letra da mesma área e a segunda letra identifica o grupamento da triplicata. Cada amostra foi homogeneizada e pesada (2g). A amostra de solo foi colocada no centro da placa de Petri contendo agar-água 2% (AA 2%) (ANEXO 2) e 0,05% de cloranfenicol e 0,05% de sulfato de estreptomicina, na qual adicionou-se 1ml de suspensão de NVL ao redor da amostra, sobre o agar. As placas foram incubadas à temperatura de 25 a 28°C, no escuro, durante dois meses. A partir do décimo dia de incubação, foram observadas diariamente. Quando constatada a presença de micélio ou hifas, era realizada a transferência das subculturas para uma nova placa contendo AA 2% e adicionando-se a cada três dias 1ml de suspensão de NVL até a obtenção de culturas puras.

Quando eram obtidas culturas puras, estas eram transferidas para meios de cultura mais adequados para o crescimento dos fungos.

3.3 OBTENÇÃO DE CULTURAS PURAS E MANUTENÇÃO DOS FUNGOS EM TUBOS DE ENSAIO

Considerando que nas placas de AA 2% cresceram diversos fungos, estes tiveram que ser repicados em novas placas até a obtenção de culturas puras. Após a certificação de que apenas um fungo estava contido em cada placa contendo meio AA 2%, estes foram repicados em placas contendo meio de cultura batata dextrose agar (BDA) (ANEXO 3). Este meio de cultura foi o de eleição por se tratar de meio que contém muito substrato, portanto capaz de promover crescimento de micélio (STEVENS, 1981). As placas eram incubadas em estufa à temperatura de 25 a 28°C, no escuro, por até sete dias. Após o

crescimento do microrganismo em placa, o isolado era repicado em tubos, em meio de cultura BDA.

Os tubos contendo o isolado eram mantidos em refrigeração a 4°C para sua manutenção e testes posteriores.

Os fungos isolados foram observados em microscópio estereoscópico e forma anotadas as principais características que possibilitaram a diferenciação macroscópica e posterior agrupamento desses fungos.

3.4 AQUISIÇÃO E MANUTENÇÃO DAS CEPAS REFERÊNCIA

Duddingtonia flagrans, *Monacrosporium thaumasium* e *Arthrobotrys musiformis*, dentre outros fungos, são conhecidos por sua capacidade nematofágica, pois já foram submetidos a inúmeros testes de predação de nematóides, constatável em diversos trabalhos relatados (STIRLING *et al.*, 1998; CRESPO *et al.*, 1999; FERNÁNDEZ *et al.*, 1999; ARAÚJO *et al.*, 2000a e 2004a; WALLER *et al.*, 2001a; PEÑA *et al.*, 2002; SKIP *et al.*, 2002; ALVES *et al.*, 2003; GRAMINHA *et al.*, 2005; FARREL *et al.*, 2006; KAHN *et al.*, 2007). As três cepas *D. flagrans* (Catalog nº 38101, linhagem CRT 76.054), *M. thaumasium* (Catalog nº 18498, linhagem IMI 121299), e *A. musiformis* (Catalog nº 38100, linhagem CRT 76.044) foram adquiridas da ATCC (American Type Culture Collection), Estados Unidos, no ano de 2006 e mantidas no Laboratório de Processos Biotecnológicos (LPB) da Universidade Federal do Paraná com o objetivo de serem comparadas e submetidas aos mesmos testes que os fungos isolados o foram durante este experimento.

Essas três cepas foram reativadas conforme as seguintes orientações da ATCC. As cepas foram enviadas em ampolas congeladas imersas em vapor de nitrogênio líquido e descongeladas em banho-maria a 55°C durante 90 segundos. Imediatamente após o descongelamento, o conteúdo da ampola foi transferido assepticamente em meio sólido apropriado com meal agar – agar fubá (CMA) (ANEXO 4) e incubado em estufa em temperatura de aproximadamente de 25°C. Após a reativação, foram mantidas em tubos contendo meio CMA.

3.5 TESTE DE CRESCIMENTO DO FUNGO EM MEIO CONTENDO QUITINA

Os fungos nematófagos têm a aptidão de penetrar na quitina localizada na cutícula das larvas de nematódeos, pois possuem diversas enzimas extracelulares, como protease, quitinase e colagenase que estão envolvidas diretamente no processo de infecção do nematóide (GRYNDLER *et al.*, 2003). Testes de crescimento de fungos nematófagos em substrato contendo resíduos de casca de camarão, cuja composição é de 50% de quitina, 25% de proteína e 25% de carbonato de cálcio já foram realizados conforme RATTANAKIT *et al.* (2002); GRYNDLER *et al.* (2003); MATSUMOTO *et al.* (2004). No entanto, neste experimento, optou-se, pela praticidade e segurança da concentração do substrato, testar a quitina comercial (Difco TM) para verificar a atividade nematofágica dos fungos isolados e das cepas referência.

3.5.1 Teste de crescimento dos fungos em diferentes concentrações de quitina

Em teste contendo resíduo de casca de camarão, a porcentagem utilizada no meio é de 5%. Como não se sabia qual a concentração adequada de quitina comercial, foram testadas diferentes concentrações de quitina (de 1,5% até 7,5%) para conhecer em qual concentração os fungos nematófagos se desenvolveriam melhor em até 48h. Foram avaliados parâmetros de concentração de crescimento de micélio e de produção de esporos.

Considerando que não era sabido quais dos isolados seriam capazes de se desenvolver em meio contendo quitina e, principalmente, não se conhecia qual a concentração ideal de quitina, uma cepa referência *A. musiformis* (esporos ou fragmentos de micélio), foi repicada no ponto central de três placas de Petri, cada uma contendo diferentes concentrações de quitina em meio sólido constituído principalmente de sais (ANEXO 5): 2,5%, 5% e 7,5%.

As placas foram incubadas em estufa a uma temperatura de 25°C a 28°C, no escuro, por até 48h. Foi observado que na concentração de 2,5% o fungo se desenvolveu melhor e produziu mais micélios.

Desse modo, novos testes foram realizados em concentrações próximas a 2,5% (1,5%, 2,0%, 2,5%, 3,0% e 3,5%) para ajustar qual a melhor concentração de quitina para o desenvolvimento dos fungos com capacidade nematofágica. Foram utilizadas duas cepas referência – *A. musiformis* e *D. flagrans* para este teste.

3.5.2 Teste de viabilidade das amostras em quitina

A finalidade deste teste consistiu em verificar se todos os fungos isolados no meio BDA seriam capazes de se desenvolver em meio contendo 2,5% de quitina e se produziram micélio em quantidade significativa para a realização de outros testes. Neste teste foi utilizada a concentração de 2,5% de quitina, pois as cepas referência *A. musiformis* e *D. flagrans* testadas no item anterior demonstraram melhor crescimento nessa concentração.

Nas placas de Petri, contendo 15ml do meio com 2,5% de quitina, foram inoculados esporos e fragmentos de micélio dos diferentes isolados no ponto central das placas. Após a inoculação, as placas foram incubadas em estufa a $27\pm 0,5^{\circ}\text{C}$, por cinco a sete dias. Todas as amostras foram feitas em duplicata.

3.5.3 Coloração das placas contendo isolados viáveis em quitina

Considerando que o teste de crescimento em quitina comprovou que esses isolados possuíam a capacidade de degradar esse polissacarídeo, foi realizada a coloração dos fungos isolados para observar suas características morfológicas, compará-los entre si e separá-los conforme semelhança.

Todas as placas contendo o meio de quitina 2,5% que tiveram crescimento dos fungos isolados foram coradas com o corante azul de algodão e observadas em microscópio estereoscópico em aumento de 10x para avaliar suas características morfológicas.

3.6 VIABILIDADE E PRESERVAÇÃO DE FUNGOS NEMATÓFAGOS EM MEIO CMA

De acordo com STEVENS (1981), o meio de cultura corn meal agar – agar fubá (CMA) é o eleito para cultivo de fungos por promover equilíbrio de desenvolvimento entre crescimento micelial e esporulação. É considerado adequado para cultura de fungos isolados de solo, de substratos do solo e de madeira. O meio de cultura batata dextrose agar (BDA) é um meio que permite o crescimento de uma gama de microrganismos, portanto não oferece a seletividade e o equilíbrio de desenvolvimento que o meio de cultura CMA propicia.

Após crescimento em meio contendo quitina, os fungos foram repicados em placas contendo meio de cultura CMA. Foi realizada a comparação macroscópica entre os isolados mantidos em tubos de meio de cultura BDA e CMA. Os que se desenvolveram em meio de cultura CMA foram transferidos para tubos de ensaio contendo o mesmo meio para a preservação dos isolados visando à realização de testes posteriormente.

3.7 TESTE DE PREDACÃO DOS FUNGOS NOS NEMATÓDEOS

A finalidade deste teste foi a de verificar a capacidade nematofágica dos fungos isolados do solo e mantidos em meio de cultura CMA.

Como a cultura de *Panagrellus* sp é realizada em meio de aveia em flocos, umedecida e amassada (HEINTZ & PRAMER, 1972) e na realização deste teste não poderia haver contaminação bacteriana, as larvas de nematódeos foram coletadas conforme o método de Baermann, modificado por SANTOS *et al.* (1991) (ANEXO 1). Os nematóides foram centrifugados na rotação de 1000 rpm durante 5 minutos, desprezando-se no final de cada centrifugação o sobrenadante. Foi repetido o procedimento dez vezes. As larvas foram estocadas durante até uma semana a 4°C em solução de 0,05% de anfotericina B, 0,05% de cloranfenicol e 0,05% de sulfato de estreptomicina. Quando essas larvas foram utilizadas, foi realizado o processo de lavagem com água destilada, em centrífuga com rotação de 1000 rpm durante 5 minutos, repetindo-se dez vezes (ARAÚJO *et al.*, 1996). Foi usada uma alíquota de 20µl

e feita a contagem de nematóides em microscópio óptico em objetiva de 10x e realizada a contagem de cinco alíquotas de 10µl, obtendo-se a média entre elas e extrapolando-se o valor para o volume total.

Cada fungo isolado foi repicado em triplicata, em placas contendo meio de cultura agar-água 2% e incubados em estufa a temperatura de $27\pm 0,5^{\circ}\text{C}$, por quatro a cinco dias. Após esse período, foi adicionado 1ml de suspensão de *Panagrellus* sp, na concentração de 1×10^3 larvas/ml. As placas foram mantidas no escuro dentro da estufa e a cada 24h as placas eram observadas em microscópio estereoscópico em aumento de 10x, 15x e 40x para visualização de atividade de predação dos fungos isolados e das cepas referência. A cada 48h, era adicionado 1ml de suspensão de *Panagrellus* sp. em todas as placas, independentemente da atividade nematofágica. Foi considerada presença de atividade nematofágica nas placas em que se observou a presença de armadilhas construídas pelos fungos, a diminuição do número de nematóides e maior crescimento de micélio dos fungos.

3.8 CRESCIMENTO RADIAL

O objetivo deste experimento foi avaliar a velocidade de crescimento dos fungos isolados e das cepas referência, observar a presença de micélio aéreo e as características macroscópicas morfológicas (coloração e esporulação). Essa comparação objetivou estabelecer semelhanças entre os fungos isolados e as cepas referência.

Em placas contendo BDA foi realizado o teste de crescimento radial com o objetivo de comparar a velocidade de desenvolvimento dos isolados entre si e com as cepas referência. Passadas 24 horas, o crescimento foi acompanhado ininterruptamente em um período de 96 horas e deixadas em estufa até seu total desenvolvimento, ocupando o diâmetro total da placa num período máximo de sete dias.

Amostras de culturas de fungos isolados e cepas referência foram retiradas a partir de tubos de ensaio e repicadas no centro das placas contendo 15ml de meio de cultura BDA solidificado.

Após a inoculação, as placas foram incubadas em estufa a $27\pm 0,5^{\circ}\text{C}$, por cinco a sete dias, no escuro. Todos os experimentos foram realizados em duplicata. Com um marcador permanente foram realizados círculos concêntricos a partir do centro até a borda das placas. As placas foram observadas diariamente para acompanhamento do crescimento e foi realizada a comparação do desenvolvimento e velocidade de crescimento entre os isolados selvagens e as três cepas referência. No sétimo dia de cultivo foi feita a medição dos diâmetros das culturas.

3.9 MICROCULTIVO

O objetivo do teste de microcultivo foi o de observar microscopicamente as características dos fungos isolados e as das cepas referência e compará-los e agrupá-los conforme semelhança, já que nesta situação as estruturas permanecem íntegras e o meio de cultura utilizado (BDA) estimula a produção de conídios (STEVENS, 1981), que na maioria das vezes permite a identificação dos fungos.

Foram cortados quadrados de meio de cultura BDA de 1cm x 1cm e depositados sobre as lâminas. Foram inoculados todos os isolados e as três cepas referência nas arestas do quadrado do meio de cultura; a lamínula foi colocada sobre o meio de cultura. Para manter a umidade do microambiente da placa, umidificava-se o algodão e este era colocado dentro da placa. Foram incubados em estufa a $27\pm 0,5^{\circ}\text{C}$, por cinco a dez dias. O algodão foi umedecido quando necessário (KONEMAN & ROBERTS, 1992; LACAZ *et al.*, 1998).

Após observar o crescimento do fungo pelas arestas e tomando a área da lamínula, esta era retirada e fixada em lâmina limpa e previamente preparada. Foi depositado o corante azul de algodão na lâmina antes de sua fixação, para melhor visualização dos fungos isolados e das cepas referência em microscopia. As peças foram montadas em duplicata.

3.10 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS

Para complementar a identificação morfológica, usou-se também técnicas moleculares por serem mais sensíveis e permitirem a comparação com as cepas referência e os isolados entre si. Para agrupamento dos isolados foram usadas as técnicas de PCR com a amplificação da região ITS (Internal Transcribed Spacer) seguidas da Análise do polimorfismo no comprimento de fragmentos obtidos por enzimas de restrição (ARDRA) e a técnica de RAPD (Random Arbitrary Polimorfism DNA). Após a realização dos grupamentos foram seqüenciados cinco isolados para confirmar a identificação.

3.10.1 Extração do DNA

A etapa crucial nas técnicas moleculares é a extração do DNA.

Após quatro a cinco dias de cultivo, 1cm² de micélio foi transferido para tubos de 2ml contendo 300µl CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) buffer [CTAB 2% (w/v), NaCl 1.4M, Tris-HCl 100mM, pH 8.0; EDTA 20mM, b-mercaptoethanol 0,2% (v/v)] e 80mg de mistura de sílica-celite (sílica gel H, Merck 7736, Darmstadt, Germany/ Kieselguhr Celite 545, Machery, Düren, Alemanha, 2:1, w/w). As células foram rompidas manualmente com um macerador esterilizado por aproximadamente cinco minutos. Posteriormente 200 µl de buffer CTAB foi adicionado, a mistura foi centrifugada e incubada por 10 min. a 65°C. Após a adição de 500µl de clorofórmio, a solução foi homogeneizada e centrifugada por 5 min a 20 500g e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo com 2 vols. de 96% de etanol gelado. O DNA foi precipitado durante 30 min. a - 20 °C e em seguida centrifugado novamente por 5 min a 20 500g. Posteriormente o pellet foi lavado com etanol gelado 70%. Após secagem a temperatura ambiente, o pellet foi resuspenso em 97,5 µl TE-buffer acrescido de 2,5 µl RNase 20 U.ml⁻¹ e incubado por 5 min a 37 °C, antes de ser armazenado a - 20°C (GERRITS & HOOG, 1999).

3.10.2 Amplificação da região ITS

As amostras de DNA genômico foram submetidas a PCR para amplificação do DNA. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram LS266 5' GCATTCCCAAACAACACTCGACTC 3' e V9D 5' TTAAGTCCCTGCCCTTTGTA (WHITE *et al.*, 1990).

A região ITS (Internal Transcribed Spacer) é uma das repetições do DNA ribossomal e é um marcador utilizado para identificação molecular de fungos.

A reação de PCR utilizada foi efetuada num volume final de 20 μ L contendo: 2 μ L de tampão (1x PCR Buffer), 25 mM de $MgCl_2$, 5 mM de cada dNTP, 10 pmol/ μ L dos iniciadores (primers) LS266 5' GCATTCCCAAACAACACTCGACTC 3' e V9D 5' TTAAGTCCCTGCCCTTTGTA 3' (WHITE *et al.*, 1990), e 1,25 U de TaqDNA polimerase. As reações foram realizadas em termociclador com o seguinte ciclo de temperaturas, 2 minutos a 94°C, 30 ciclos de: 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C e 1 minuto a 72°C, e 3 minutos a 72°C. Após reação de amplificação as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,6% (~6V/cm 30min) e coradas com 0,5 μ g/mL de brometo de etídeo para a verificação do tamanho e concentração do amplificado por comparação com padrões de peso molecular (1Kb Invitrogen).

3.10.3 ARDRA – Análise do polimorfismo no comprimento de fragmentos obtidos por enzimas de restrição nos produtos amplificados da região ITS

O método ARDRA utiliza o estudo da região espaçadora do DNA ribossomal (rDNA) (ITS) e compara a sequência de nucleotídeos de genes do rDNA. É um método rápido e permite avaliar diferenças entre grupos filogenéticos (JORGENSEN & CLUSTER, 1989).

Alíquotas de 10 μ L dos produtos amplificados foram adicionadas a uma quantidade de enzima *HaeIII* (GG'CC) (5 U por reação) (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden), tampão "One-phor-all" buffer (Amersham Pharmacia – GE Healthcare) e água ultra pura para um volume final de 15 μ L e incubadas a 37°C por no mínimo 3 horas.

O tamanho dos fragmentos de restrição obtidos de pela enzima foi comparado por eletroforese em gel de agarose 2,0% a 80 V por 2 horas e 30 minutos coradas com brometo de etídio por 20 minutos e fotografados sob luz UV utilizando como referência padrões de peso molecular (100 Base-Pair Ladder -Invitrogen).

3.10.4 RAPD - Random Arbitrary Polimorfism DNA

Esta técnica baseia-se na repetição cíclica da extensão enzimática de primers que se anelam nos dois extremos opostos de uma fita de DNA que serve como molde. Nesta técnica utiliza-se apenas um único primer e este tem uma sequência arbitrária (ACHENBACH *et al.*, 1996).

As reações de amplificações foram feitas em volumes de 25µL contendo 10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 50 mM KCl, 1,7 mM MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP (deoxinucleotídeos trifosfatos), 10 pmol iniciador, A9 (GGGTAACGCC) (Operon Technologies, Alameda, California) DNA genômico 20 ng e 2,5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen). Os ciclos de amplificação consistiram de desnaturação inicial de 94°C por cinco minutos, desnaturação de 94°C por um minuto, anelamento de 34°C por 1 minuto e extensão de 72°C por 2 minutos, por 45 ciclos. E extensão final de 72°C por sete minutos. O material amplificado foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,6% e visualizados por luz ultravioleta após coloração com brometo de etídio (0,5 µg/mL).

3.10.5 Sequenciamento

O rDNA da região ITS (Internal Transcribed Spacer) foi amplificado usando os primers V9G e LS266 (GERRITS & HOOG, 1999) e seqüenciado com ITS1 e ITS4 (WHITE *et al.*, 1990). Amplicons foram retirados utilizando o kit de purificação GFX PCR DNA (GE Healthcare, U. K.). O sequenciamento foi realizado no sequenciador automático ABI 3130 (Applied Biosystems). Foi utilizado o Staden v.1.6.0 para editar e alinhar as sequências. A análise das sequências foi realizada com o software BLASTn que compara com um banco

de dados mantido pela NCBI (National Center for Biotechnology Information, website [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>]).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 COLETA DAS AMOSTRAS DE SOLO PARA ISOLAMENTO DE FUNGOS DE INTERESSE BIOTECNOLÓGICO

As amostras de solo foram coletadas em 23 localidades de 11 municípios do estado do Paraná, em diferentes localidades de criação de animais de interesse: Quatro Barras localizada na região leste, altitude de 800m, latitude 25°21'57" S e longitude 49°4'37" W; Campina Grande do Sul localizada na região leste, altitude de 918m, latitude 25°18'21" S e longitude 49°3'18" W; São Luis do Purunã localizada na região leste, altitude de 1150m, latitude 25°28'22" S e longitude 49°42'49" W; Morretes localizada na região leste, altitude de 10m, latitude 25°28'34" S e longitude 48°50'08" W; Apucarana localizada na região norte, altitude de 983m, latitude 23°33'05" S e longitude 51°27'40" W; Palotina localizada na região oeste, altitude de 333m, latitude 24°17'02" S e longitude 53°50'40" W; Medianeira localizada na região oeste, altitude de 402m, latitude 25°17'42" S e longitude 54°05'38" W; Nova União localizada na região sudoeste, altitude de 560m, latitude 25°02'13" S e longitude 53°46'34" W; Chopinzinho localizada na região sudoeste, altitude de 720m, latitude 25°51'19" S e longitude 52°31'46" W; Goioerê localizada na região oeste, altitude de 505m, latitude 24°11'06" S e longitude 53°01'40" W e Carambeí localizada na região leste, altitude de 1150m, latitude 24°55'04" S e longitude 50°05'49" W (FIGURA 1 e TABELA 1).

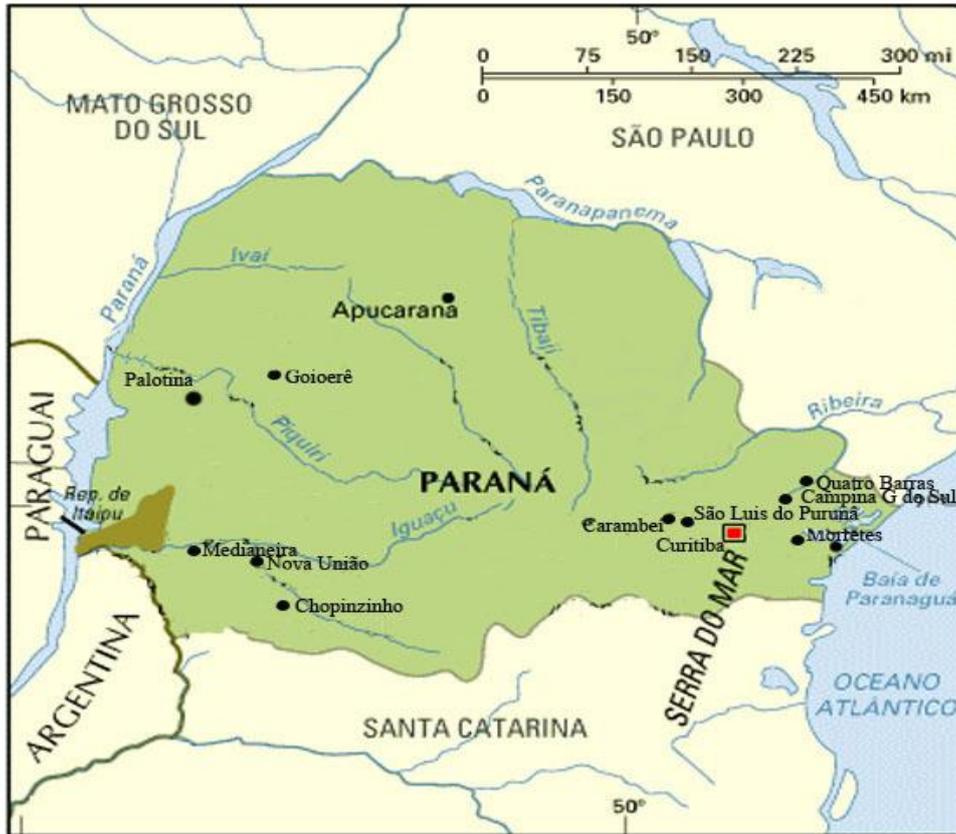


FIGURA 1 – MAPA DO ESTADO DO PARANÁ E PONTOS DE COLETA

Identificação	Município	Área	Data
1A	Quatro Barras	Pecuária	20/07/06
2A	Quatro Barras	Lavoura	20/07/06
1B	Campina Grande do Sul	Aprisco	20/07/06
2B	Campina Grande do Sul	Pecuária	20/07/06
1C	São Luis do Purunã	Lavoura	21/07/06
2C	São Luis do Purunã	Pecuária	21/07/06
3C	São Luis do Purunã	Pasto c/ equino	21/07/06
1D	Morretes	Lavoura	23/07/06
2D	Morretes	Pasto c/ bubalino	23/07/06
3D	Morretes	Pasto c/ bubalino	23/07/06
1E	Apucarana	Pasto c/ equino	16/08/06
2E	Apucarana	Lavoura	16/08/06
3E	Apucarana	Pecuária	16/08/06
4E	Apucarana	Lavoura 2	16/08/06
5E	Apucarana	Aprisco	16/08/06
1F	Palotina	Pecuária	23/10/06
1G	Medianeira	Pastagem	25/10/06
2G	Medianeira	Lavoura	25/10/06
3G	Medianeira	Pecuária	25/10/06
4G	Nova União	Pastagem	25/10/06
1H	Chopinzinho	Pecuária	24/11/06
2H	Goioerê	Pastagem	24/11/06
3H	Carambeí	Pecuária	24/11/06

TABELA 1 - NÚMERO DE AMOSTRAS DE SOLO, LOCAIS E DATA DE COLETA

4.2 ISOLAMENTO DE FUNGOS NEMATÓFAGOS DO SOLO

Das 23 amostras de solo coletadas em solo paranaense, após sucessivos repiques em meio de cultura agar água 2% (AA 2%) e adição de suspensão de nematóides de vida livre – *Panagrellus* sp (NVL), até a obtenção de isolados puros, foram selecionados 69 fungos das placas de cultivo (TABELA 2).

De todas as placas deste experimento contendo solo e AA 2% foi possível isolar um ou mais fungos e submetê-los a repiques no mesmo meio, com o objetivo de isolar culturas puras de fungos.

O fato de não haver substrato no meio de cultura AA 2%, e efetuar a adição de nematóides de vida livre sugere a possibilidade de crescimento de fungos que são capazes de apreender e utilizar como substrato os nematóides presentes nas placas (BARRON, 1977).

Este trabalho teve início com a pesquisa de fungos com potencial nematofágico, a partir da coleta de solo em propriedades no estado do Paraná que possuem criação de animais. Partiu-se do princípio que haveria maior probabilidade de se encontrar esse tipo de fungo nesses solos, tendo em vista que pesquisas dessa natureza já tinham sido realizadas em alguns estados do Brasil, a exemplo, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, São Paulo, Santa Catarina, Minas Gerais, Amazonas, Rio Grande do Sul, Pernambuco e Paraná (GOMES *et al.*, 2001), como também em diversos países: Equador (RUBNER, 1994), China (ZHANG *et al.*, 1996; LI *et al.*, 2006), Azerbaijão (MEKHTIEVA, 1998), França e México (CRESPO *et al.*, 1999), Dinamarca (FERNÁNDEZ *et al.*, 1999), Ilhas Fiji (MANUELI *et al.*, 1999), Nova Zelândia (SKIPP *et al.*, 2002), Irã (GHAHFAROKHI *et al.*, 2004; ESLAMI *et al.*, 2005), Estados Unidos (FARRELL *et al.*, 2006), Escócia (SAXENA, 2008), dentre outros países. As citadas pesquisas obtiveram sucesso; dessas, a maioria dos isolados reporta ao gênero *Arthrobotrys*.

Das onze localidades nas quais foram coletadas amostras de solo para isolar fungos com potencial atividade nematofágica, em oito municípios (Quatro Barras, São Luis do Purunã, Morretes, Palotina, Medianeira, Nova União, Goioerê e Carambeí) encontrou-se um ou mais isolados que apresentaram potencialidade para essa habilidade.

N.º de Isolados	Local de Coleta	Grupamento dos Isolados				
6	Quatro Barras	1AA	2AA			
		1AB	2AB			
		1AC	2AC			
6	Campina Grande do Sul	1BA	2BA			
		1BB	2BB			
		1BC	2BC			
9	São Luis do Purunã	1CA	2CA	3CA		
		1CB	2CB	3CB		
		1CC	2CC	3CC		
9	Morretes	1DA	2DA	3DA		
		1DB	2DB	3DB		
		1DC	2DC	3DC		
15	Apucarana	1EA	2EA	3EA	4EA	5EA
		1EB	2EB	3EB	4EB	5EB
		1EC	2EC	3EC	4EC	5EC
3	Palotina	1FA				
		1FB				
		1FC				
12	Medianeira / Nova União	1GA	2GA	3GA	4GA	
		1GB	2GB	3GB	4GB	
		1GC	2GC	3GC	4GC	
9	Chopinzinho / Goioerê / Carambeí	1HA	2HA	3HA		
		1HB	2HB	3HB		
		1HC	2HC	3HC		

TABELA 2 – AGRUPAMENTO DOS FUNGOS ISOLADOS PROVENIENTES DE SOLO DO ESTADO DO PR COLETADOS NO ANO DE 2006

4.3 OBTENÇÃO DE CULTURAS PURAS DE FUNGOS E MANUTENÇÃO DESSES FUNGOS EM TUBOS DE ENSAIO

Após constatação macroscópica da presença de fungo em meio de cultura agar água 2% (AA 2%), foi efetuado o repique em placa contendo meio de cultura batata dextrose agar (BDA) para certificação de que a cultura estava pura. Após este procedimento, cada fungo foi repicado em tubos contendo meio de cultura BDA com o intuito de preservar os isolados. Dos 69 fungos isolados em meio AA 2%, 41 isolados cresceram nesse meio de cultura (TABELA 3).

Local de Coleta	Grupamento de Isolados			
Quatro Barras	1AB 1AC	2AB		
Campina Grande do Sul	1BA 1BB 1BC			
São Luis do Purunã	1CA 1CB	3CA 3CB 3CC=3CD		
Morretes	3DA 3DB 3DC			
Apucarana		2EA	3EB	4EA 4EB
Palotina	1FA 1FB			
Medianeira / Nova União	1GA 1GB 1GC	2GA 2GB 2GC	3GA 3GB 3GC	4GA 4GB 4GC
Chopinzinho / Goioerê / Carambeí	1HA 1HB 1HC	2HA 2HB 2HC	3HA 3HB 3HC	

TABELA 3 - ISOLADOS QUE SE DESENVOLVERAM EM MEIO BDA

Foram obtidos 123 tubos contendo cultura pura de cada isolado (em triplicata) representando 41 isolados.

Todos os tubos foram devidamente identificados e mantidos sob refrigeração (4°C) para serem submetidos a testes posteriores de identificação e atividade biológica.

4.5 TESTE DE CRESCIMENTO DOS FUNGOS ISOLADOS EM MEIO CONTENDO QUITINA

4.5.1 Teste de crescimento em diferentes concentrações de quitina

Uma cepa referência *A. musiformis* (Catalog nº 38100, linhagem CRT 76.044; ATCC) foi submetida ao teste de crescimento em meio contendo diferentes concentrações de quitina (2,5%, 5% e 7,5%). A cepa desenvolveu-se melhor em estufa (25°C a 28°C) durante 48h no meio contendo 2,5% de quitina. No meio contendo 5%, o crescimento foi muito pequeno, e no meio contendo 7,5%, foi inexpressivo.

Considerando que a cepa se desenvolveu melhor no meio contendo a concentração de 2,5% de quitina, um novo teste foi realizado para encontrar a concentração ideal de quitina para o desenvolvimento de fungos nematófagos.

A mesma cepa foi submetida às seguintes concentrações de quitina: 1,5%, 2,0%, 2,5%, 3,0% e 3,5%. O crescimento em 1,5% foi inexpressivo, a 2% e a 2,5% foi muito semelhante, apesar de que a 2,5% o fungo *A. musiformis* apresentou crescimento maior de micélios aéreos; a 3% o crescimento foi pequeno e a 3,5% o crescimento também não foi significativo quando comparado com as concentrações de 2% e 2,5%. Todas as placas foram feitas em duplicata, acondicionadas em estufa (25°C a 28°C) durante 48h.

A cepa se desenvolveu melhor em meio contendo a concentração de 2,5% de quitina.

Em testes de crescimento de fungos nematófagos em substrato contendo resíduos de casca de camarão, sempre é utilizada a concentração de 5%, conforme RATTANAKIT *et al.* (2002); GRYNDLER *et al.* (2003); MATSUMOTO *et al.* (2004), no entanto, neste experimento foi possível utilizar metade da concentração preconizada e obter desenvolvimento de fungos com capacidade nematofágica, o que corresponde a economia de substrato para a seleção de fungos com essa atividade em testes *in vitro*.

4.5.2 Teste de viabilidade das amostras de fungo em meio contendo quitina

As 41 amostras relacionadas na TABELA 3, mantidas em meio de cultura BDA foram submetidas a teste de viabilidade em meio de cultura contendo 2,5% de quitina. Da mesma forma, as cepas referência também foram avaliadas e utilizadas como base de comparação para os resultados obtidos com os fungos isolados.

Dos 41 fungos isolados mantidos em meio de cultura BDA, 20 isolados se desenvolveram em meio contendo 2,5% de quitina (TABELA 4 e FIGURAS 2 a 5); portanto, menos de 50% dos fungos isolados do solo que se desenvolveram em meio de cultura BDA, conseguiram produzir micélio e se desenvolverem em meio contendo 2,5% de quitina.

Os isolados que melhor se desenvolveram no meio contendo 2,5% de quitina foram: 1AB, 1CA, 3CA e 3CD.

Os isolados que menos se desenvolveram foram: 1AC, 1CB, 2AB, 3CB, e as cepas referência *A. musiformis* e *M. thaumasium*.

Os isolados que pouco se desenvolveram foram: 1FB, 3DA, 4EB, 4GB, 2HA e a cepa referência *D. flagrans*.

Todos os fungos isolados e as cepas referência foram repicados do mesmo modo, depositando a mesma quantidade de micélio e esporos sobre as placas e o meio de cultura contendo quitina a 2,5%. No entanto, foi possível observar que as três cepas referência se desenvolveram pouco quando comparadas com a maioria dos fungos isolados.

Neste teste, apenas o isolado 2AB manteve sua característica morfológica de cor esverdeada; todos os outros isolados se apresentaram muito semelhantes, com coloração branca e aspecto cotonoso.

Local de Coleta	Grupamento dos Isolados		
Quatro Barras	1AB 1AC	2AB	
São Luis do Purunã	1CA 1CB	3CA 3CB 3CC=3CD	
Morretes	3DA 3DC		
Apucarana	4EB		
Palotina	1FA 1FB		
Medianeira / Nova União	2GB		4GB
Chopinzinho / Goioerê / Carambeí	1HA 1HB	2HA 2HB	3HA

TABELA 4 - ISOLADOS QUE CRESCERAM EM MEIO CONTENDO 2,5% DE QUITINA

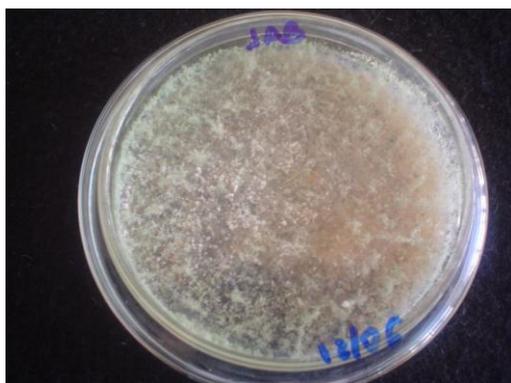


FIGURA 2 - TESTE DE CRESCIMENTO DO ISOLADO 1AB EM MEIO CONTENDO 2,5% DE QUITINA, UM DOS ISOLADOS QUE MELHOR SE DESENVOLVEU

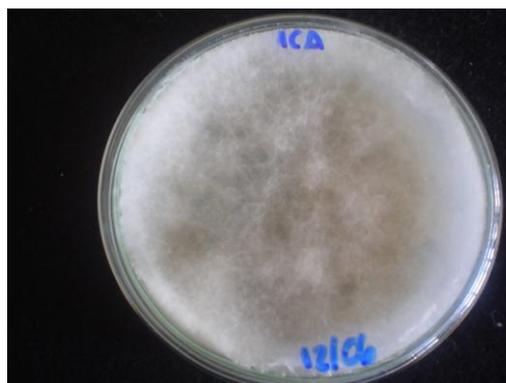


FIGURA 3 - TESTE DE CRESCIMENTO DO ISOLADO 1CA EM MEIO CONTENDO 2,5% DE QUITINA, UM DOS ISOLADOS QUE MELHOR SE DESENVOLVEU



FIGURA 4 - TESTE DE CRESCIMENTO DO ISOLADO 2AB EM MEIO CONTENDO 2,5% DE QUITINA, UM DOS ISOLADOS QUE POUCO SE DESENVOLVEU

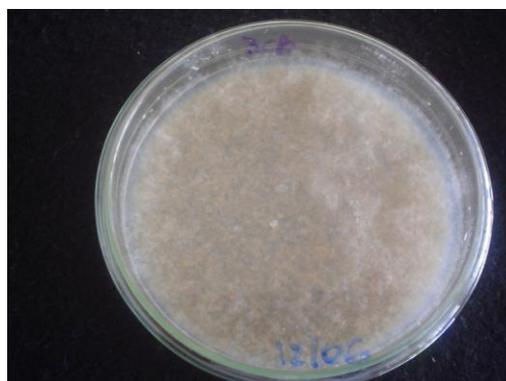


FIGURA 5 - TESTE DE CRESCIMENTO DO ISOLADO 3CB EM MEIO CONTENDO 2,5% DE QUITINA, UM DOS ISOLADOS QUE POUCO SE DESENVOLVEU

4.5.3 Coloração com azul de algodão das placas contendo isolados viáveis em meio contendo 2,5% de quitina

Após cinco a sete dias de crescimento dos fungos relacionados na TABELA 4 em estufa a 25°C a 28°C, as placas foram coradas com azul de algodão e observadas em microscópio estereoscópico em aumento de 10x, 15x e 40x com o objetivo de serem identificadas e agrupadas conforme semelhança morfológica.

Por semelhança de características de micélio e morfologia de esporos, foi possível agrupar em quatro diferentes grupos os seguintes isolados: 1AB e 1AC; 1FB e 3CA; 4EB e 1FA; 2GB, 4GB; 1HB, 2HA e 3HA. Os demais isolados por falta de semelhança morfológica não foram agrupados.

4.6 CRESCIMENTO DOS FUNGOS EM MEIO CMA

Das 41 amostras que cresceram em meio de cultura BDA (TABELA 3), 20 tiveram crescimento em meio de cultura CMA (TABELA 5). Alguns isolados apresentaram crescimento mais rápido que em meio BDA, como 1AC, 2AB e 3HA.

Neste experimento foi possível observar que os mesmos isolados que cresceram em meio contendo 2,5% de quitina se desenvolveram e meio de cultura CMA.

Local de Coleta	Grupamento dos Isolados		
Quatro Barras	1AB 1AC	2AB	
São Luis do Purunã	1CA 1CB	3CA 3CB 3CC=3CD	
Morretes	3DA 3DC		
Apucarana	4EB		
Palotina	1FA 1FB		
Medianeira / Nova União	2GB		4GB
Chopinzinho / Goioerê / Carambeí	1HA 1HB	2HA 2HB	3HA

TABELA 5 - CRESCIMENTO DE FUNGO ISOLADO A PARTIR DE SOLO EM MEIO CMA

4.7 TESTE DE PREDACÃO DOS FUNGOS ISOLADOS E CEPAS REFERÊNCIA EM *Panagrellus* sp

As placas foram observadas diariamente em microscópio estereoscópico (aumento de 10x, 15x e 40x), lupa e a olho nu, para verificação da atividade nematofágica.

O objetivo deste teste foi o de verificar a presença e ausência de atividade nematofágica dos fungos isolados e das cepas referência. Não foi utilizado método quantitativo, apenas a observação de armadilhas e a presença de nematóides nas placas.

Os fungos que não apresentaram atividade nematofágica desenvolveram menos micélio e observou-se nas placas grande quantidade de nematóides sobre o fungo e na porção superior da placa.

Os fungos que apresentaram atividade nematofágica tiveram melhor desenvolvimento de micélio e produção de esporos e, mesmo realizando a reposição de nematóides a cada 48h, era possível observar menor quantidade desses nematóides quando comparava-se as placas contendo os fungos isolados sem atividade.

Dos 20 fungos isolados que se desenvolveram em meio de cultura CMA, onze fungos isolados (TABELA 6) e as três cepas referência apresentaram algum tipo de predação como redes adesivas e anéis não constritores (FIGURAS 6 e 7).

Local de Coleta	Grupamento dos Isolados	
Quatro Barras	1AB 1AC	
São Luis do Purunã		3CB 3CC=3CD
Morretes		3DC
Palotina	1FA 1FB	
Medianeira / Nova União	2GB	4GB
Chopinzinho / Goioerê / Carambeí	2HA	3HA

TABELA 6 - FUNGOS ISOLADOS QUE APRESENTARAM ATIVIDADE NEMATOFÁGICA



FIGURA 6 - ATIVIDADE NEMATOFÁGICA (ANÉIS NÃO CONSTRITORES) DO ISOLADO 3CB EM AUMENTO DE 40X

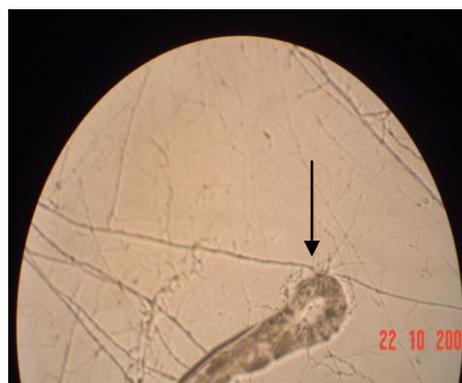


FIGURA 7 - ATIVIDADE NEMATOFÁGICA (REDES ADESIVAS) DO ISOLADO 4GB EM AUMENTO DE 40X

Quatro isolados apresentaram como método de predação anéis não constritores: 1AB, 3CB, 3CD.

Os seguintes isolados apresentaram como método de predação redes adesivas: 1AC, 3DC, 1FA, 1FB, 2GB, 4GB, 2HA e 3HA.

Percentualmente, a atividade de predação dos fungos isolados por anéis não constritores foi de 27,27%, enquanto que a atividade de rede adesiva foi de 72,73%.

Com relação às cepas referência, *A. musiformis* teve atividade de anéis não constritores, já *M. thaumasium* e *D. flagrans* se utilizaram de redes adesivas.

4.8 CRESCIMENTO RADIAL

As três cepas referência e 18 fungos isolados foram submetidos ao teste de crescimento radial. Dentre os 18, 11 foram os que apresentaram atividade nematofágica, os outros sete foram submetidos a este teste por terem se desenvolvido em meio de cultura contendo 2,5% de quitina.

Os isolados que tiveram o desenvolvimento mais rápido foram 2AB e 1HA; os isolados 1CA, 3CA, 1FB, 4GB e 3HA tiveram um crescimento semelhante. Os isolados que apresentaram desenvolvimento mais lento foram

1AC e 1CB (conforme TABELA 7 e FIGURAS 8 a 12). Foi realizada a comparação com as cepas referência, as quais foram submetidas às mesmas condições de substrato, temperatura e umidade. As cepas referência, de um modo geral, demoraram mais tempo para se desenvolver, principalmente a *M. thaumasium*, por ter como característica o crescimento pontual, não se espalhando pela placa. A cepa referência que melhor se desenvolveu foi a *D. flagrans*.

Local de Coleta	Grupamento dos Isolados		
Quatro Barras	1AB 1AC	2AB	
São Luis do Purunã	1CA 1CB	3CA 3CB 3CC=3CD	
Morretes	3DC		
Apucarana	4EB		
Palotina	1FA 1FB		
Medianeira / Nova União	2GB		4GB
Chopinzinho / Goioerê / Carambeí	1HA 1HB	2HA	3HA

TABELA 7 – ISOLADOS SUBMETIDOS AO TESTE DE CRESCIMENTO RADIAL



FIGURA 8 – CRESCIMENTO RADIAL DO FUNGO ISOLADO 1AC QUE APRESENTOU POUCO CRESCIMENTO



FIGURA 9 – CRESCIMENTO RADIAL DO FUNGO ISOLADO 2AB, PIGMENTAÇÃO VERDE, QUE CRESCER POR TODA A PLACA



FIGURA 10 – CRESCIMENTO RADIAL DO FUNGO ISOLADO 1CB, PIGMENTAÇÃO ALARANJADA, QUE APRESENTOU MENOR CRESCIMENTO



FIGURA 11 – CRESCIMENTO RADIAL DO FUNGO ISOLADO 3CA QUE APRESENTOU MELHOR CRESCIMENTO DENTRE OS FUNGOS ISOLADOS



FIGURA 12 – CRESCIMENTO RADIAL DA CEPA REFERÊNCIA *M. thaumasium*

4.9 MICROCULTIVO

O objetivo foi verificar e comparar microscopicamente os isolados para a identificação de gênero. Para dezessete fungos isolados foram montadas lâminas de microcultivo. Dos dezessete, 11 apresentaram atividade nematofágica e seis, que embora não tenham apresentado atividade nematofágica, mas se desenvolveram em meio contendo 2,5% de quitina e apresentaram eficiente e semelhante velocidade de crescimento quando comparados aos fungos isolados com atividade nematofágica no teste de crescimento radial (TABELA 8). As lâminas foram observadas em microscópio estereoscópico com aumento de 10x, 15x e 40x e foram separadas e agrupadas conforme semelhança de esporos e conídios, como também os septos nos micélios (TABELA 9).

Nas FIGURAS 13 e 14, observam-se os fungos isolados 1AB e 1FB que, conforme pode-se observar na TABELA 8, foram coletados em diferentes localidades; no entanto, possuem estruturas muito semelhantes, como a morfologia dos esporos, as hifas septadas que compõem os micélios e a estrutura do conidióforo.

Nas FIGURAS 15 e 16 pode-se constatar as semelhanças estruturais entre dois fungos isolados diferentes, o 4EB e o 1HB. Dessa forma, é possível afirmar, por observação microscópica, que o formato dos esporos é muito semelhante ao do gênero *Fusarium*.

O *Fusarium* é um fungo filamentosos, amplamente distribuído em plantas e no solo. Este fungo pode ser encontrado na microflora normal das mais diversas commodities como arroz, feijão e soja (PITT *et al.*, 1994). Este fungo cresce rapidamente em agar dextrose Sabouraud à temperatura de 25°C e produz colônias lisas com características de lanosas a cotonosas. A colônia vista de frente pode ter coloração branca, creme, bege, salmão, canela, amarela, vermelha, violeta, rosa ou roxa, vista no verso, pode ser incolor, castanha, vermelha, roxa escura ou marrom (LARONE, 1995 e HOOG *et al.*, 2000).

Microscopicamente, observa-se que as fiálides são cilíndricas, com um colarete de pequeno porte, solitárias ou produzidas como um componente de um complexo sistema de ramificação. Monofiálides e polifiálides são localizadas na porção superior ou em cadeias. Macroconídios (3-8 x 11-70 µm) são produzidos a partir de fiálides em conidióforos ramificados ou não ramificados. São unicelulares, com parede celular grossa, lisa e em forma de canoa ou cilíndrica. Microconídios (2-4 x 4-8 µm) são formados por conidióforos simples que podem ser longos ou curtos. São unicelulares, lisos, hialinos e ovóides a cilíndricos e dispostos em bolas podendo ocasionalmente ocorrer em cadeia. Clamidósporos, quando presentes, são escassos, em pares, grupos ou cadeias. Eles possuem paredes grossas, hialina, intercalar ou terminal (LARONE, 1995 e HOOG *et al.*, 2000).

Características macroscópicas e microscópicas, tais como cor da colônia, o comprimento e a forma dos macroconídios, o número, forma e disposição dos microconídios, e presença ou ausência de clamidósporos são

características fundamentais para a diferenciação das espécies de *Fusarium* (HOOG *et al.*, 2000).

Local de Coleta	Grupamento do Isolado		
Quatro Barras	1AB	2AB	
	1AC		
São Luis do Purunã	1CA		3CA
			3CB
			3CC=3CD
Morretes			3DC
Apucarana			4EB
Palotina	1FA		
	1FB		
Medianeira / Nova União		2GB	4GB
Chopinzinho / Goioerê / Carambeí	1HA	2HA	3HA
	1HB		

TABELA 8 – ISOLADOS SUBMETIDOS AO TESTE DE MICROCULTIVO



FIGURA 13 – ISOLADO 1AB COM CORANTE AZUL DE ALGODÃO EM AUMENTO DE 40X



FIGURA 14 – ISOLADO 1FB COM CORANTE AZUL DE ALGODÃO EM AUMENTO DE 15X



FIGURA 15 – ISOLADO 4EB COM CORANTE AZUL DE ALGODÃO EM AUMENTO DE 40X



FIGURA 16 – ISOLADO 1HB COM CORANTE AZUL DE ALGODÃO EM AUMENTO DE 15X

Após o microcultivo, foi possível agrupar os isolados em seis grupos. No grupo 1, obteve-se 9 isolados; no grupo 2 obteve-se 4; todos com características morfológicas muito semelhantes entre si. No entanto, não é possível afirmar a que gênero pertencem, observando-os apenas em microscopia. Dos grupos 3 a 6 apenas um isolado por grupo, pois cada um desses não possuía qualquer semelhança com outros isolados (TABELA 9).

Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	Grupo 6
1AB	3CD	3CA	1HA	2AB	3CB
1AC	3DC				
1CA	4EB				
1FA	1HB				
1FB					
2GB					
4GB					
2HA					
3HA					

TABELA 9 – GRUPAMENTO DOS ISOLADOS CONFORME SEMELHANÇA OBSERVADA EM MICROCULTIVO

4.10 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

O método utilizado para a extração do DNA do micélio dos isolados mostrou-se eficiente, resultando em quantidade de DNA suficiente para a utilização de técnicas de purificação e análises de polimorfismo da região do ITS do produto do PCR.

As regiões ITS1, ITS2 e 5.8S do rDNA do micélio foram amplificadas com sucesso com os oligonucleotídeos iniciadores. A técnica de amplificação da região ITS com os iniciadores universais LS266 e V9D produziu fragmentos obtidos com aproximadamente 1000bp para os 23 isolados, não demonstrando contaminação por agentes externos (FIGURA 17).

A amplificação por RAPD revelou que os isolados 1AB, 3CD e 3DC eram idênticos, assim como os isolados 1FA e 1FB. Os demais isolados apresentaram perfis de banda diferentes. Como a técnica identifica o genótipo em nível de indivíduo, é possível afirmar que estes dois grupos eram formados por gêneros iguais (FIGURA 18).

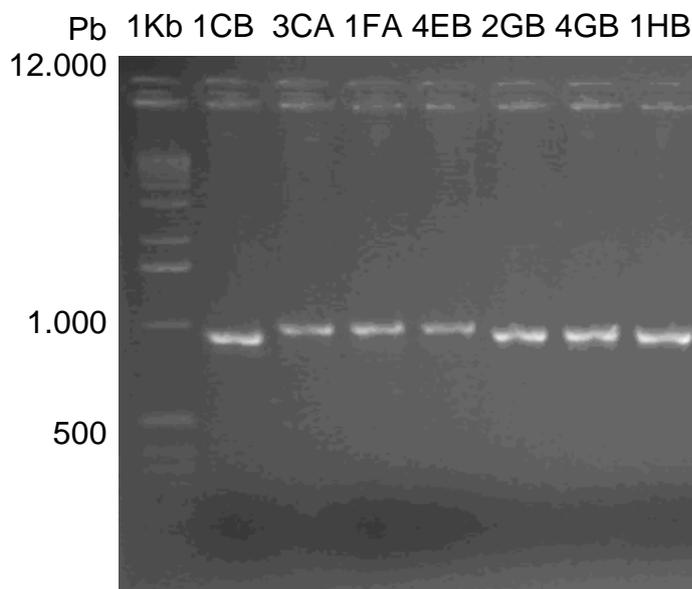


FIGURA 17 – BANDAS OBTIDAS DOS ISOLADOS DE FUNGOS APÓS A AMPLIFICAÇÃO COM PRIMERS LS266 e V9D

3CA 4EB 1FA 1FB 1HB 2HA

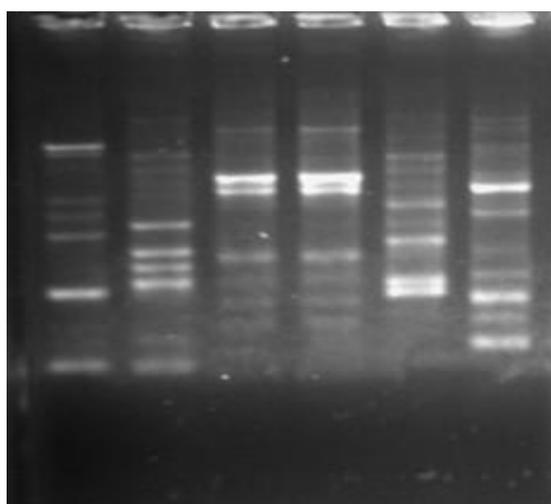


FIGURA 18 – BANDAS DE DNA AMPLIFICADAS POR PCR - RAPD DE ISOLADOS DE FUNGOS PROVENIENTES DE DIFERENTES REGIÕES DO ESTADO DO PARANÁ.

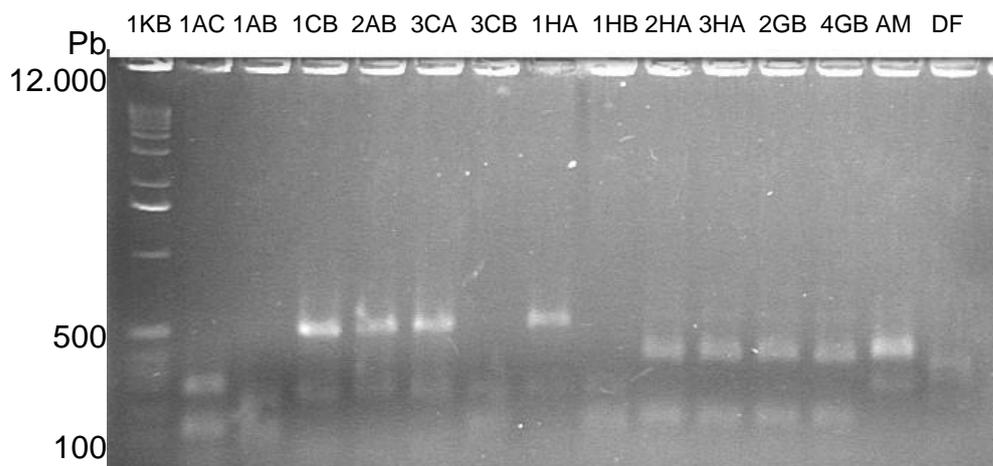


FIGURA 19 – BANDAS OBTIDAS APÓS RESTRIÇÃO COM ENZIMA *Hae* III

Após restrição com a enzima *Hae* III, foi possível agrupar os isolados em três grandes grupos (FIGURA 18 e TABELA 10), dos quais, um grupo (G1) contém os mesmos fungos isolados que compõe um dos grupos do grupamento realizado pela técnica de microcultivo, porém o segundo grupo (G2) contém fungos isolados pertencentes a grupos distintos do microcultivo e, finalmente o terceiro grupo (G3) possui fungos de dois grupamentos diferentes obtidos pela técnica de microcultivo. Isso indica que, por observação microscópica, foi possível dividir os fungos isolados em seis grupos, dos quais,

dois grupos, cada um deles, contêm fungos com características morfológicas semelhantes e os outros quatro grupos contêm apenas um exemplar sem semelhança morfológica com os demais. Por identificação molecular, foi possível agrupar os fungos isolados em apenas três grupos, o que indica que os fungos isolados pertencem a três gêneros diferentes.

Os fungos isolados denominados 2HA, 3HA, 2GB e 4GB foram identificados por microcultivo como morfológicamente semelhantes; por identificação molecular, estes fungos são do mesmo gênero, tendo sido possível identificá-los como pertencentes ao gênero *Fusarium*. Por teste de similaridade, foi possível constatar que esses quatro isolados são: *Fusarium moniliforme*, sinônimo *Gibberella moniliformis* e no estágio anamórfico é *Fusarium verticillioides*. Os isolados 2HA, 3HA e 4GB são de uma mesma cepa *culture collection* NRRL: 20984, enquanto que o isolado 2GB é de outra cepa *culture collection* NRRL: 20956.

GRUPO	ISOLADO
G1	2GB, 4GB, 2HA, 3HA
G2	1CB, 3CA, 1HA
G3	1AB, 1AC, 3CB, 1HB

TABELA 10 - AGRUPAMENTOS DOS ISOLADOS DE FUNGOS SEGUNDO A TÉCNICA DE RAPD

5 CONCLUSÃO

Das 23 amostras de solo coletadas em diferentes localidades do estado do Paraná, foi possível isolar 69 fungos, bem como avaliar a sua capacidade nematófaga.

Desses fungos isolados, apenas 11 apresentaram atividade nematófaga; oito tiveram como forma de captura redes adesivas e três se utilizaram de anéis constritores.

Relativamente ao teste que visou observar qualidades morfológicas, foi possível identificar seis grupos para os fungos isolados; esse grupamento foi confirmado por identificação molecular pelos métodos de PCR-RAPD e ARDRA, que agrupou em três grupos os fungos isolados. Em um dos grupos está o gênero *Fusarium sp.*, cujos fungos isolados 2HA, 3HA, 2GB e 4GB apresentaram atividade de formação de armadilhas no teste de predação.

6 PERSPECTIVAS

Os experimentos realizados e relatados no presente trabalho apontam para a possibilidade de existir em solo paranaense fungos nematófagos. No entanto, para se afirmar que os fungos isolados possuem habilidade predatória, há a necessidade de se realizar outros testes *in vitro*, como o uso do nematóide *Haemonchus contortus* para o teste de predação. Além disso, faz-se necessária também a simulação do trato gastrintestinal para a viabilidade da passagem desses fungos. Numa etapa posterior, sugere-se a realização de testes *in vivo*, como o teste da viabilidade da passagem desses fungos pelo trato gastrintestinal de ruminantes. Se comprovada a capacidade de passagem e sobrevivência desses fungos, estes deverão ser testados no bolo fecal dos animais para verificar se germinam nas fezes. A seguir, acompanhar a captura das larvas infectantes por esses fungos germinados e presentes nas fezes. Após a realização desses testes, será possível considerá-los como efetivas ferramentas de controle biológico de nematodioses gastrintestinais de ruminantes.

Para a produção desses fungos em larga escala será necessária, no entanto, a conjunção de outros fatores. A utilização de processos biotecnológicos, a formulação de meios apropriados para que os animais possam ingerir os fungos nematófagos constituem-se em alguns desses fatores.

REFERÊNCIAS

ACHENBACH, A. L.; PATRICK, J.; GRAY, L. Use of RAPD markers as diagnostic tool for the identification of *Fusarium solani* isolates that cause soybean sudden death syndrome. **Plant Disease**, v.80, p. 1228-1232, 1996.

ALVES, P. H.; ARAÚJO, J. V.; GUIMARÃES, M. P.; ASSIS, R. C. L.; SARTI, P.; CAMPOS, A. K. Aplicação de formulação do fungo predador de nematóides *Monacrosporium thaumasium* (Drechsler 1937) no controle de nematóides de bovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n. 3, p. 568-573, 2003.

ARAÚJO, J. V.; SANTOS, M. A.; FERRAZ, S. & MAIA, A. S. Antagonistic effect of predacious *Arthrobotrys* fungi on infective *Haemonchus placei* larvae. **Journal of Helminthology**, v. 67, p. 136-138, 1993.

ARAÚJO, J. V. Atividade predatória de isolados de *Arthrobotrys* sobre L3 de *Cooperia punctata*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 14., 1996, Viçosa. **Resumo...** Viçosa, 1996. p.295-299.

ARAÚJO, J. V.; NETO, A. P.; AZEVEDO, M. F. H. Screening parasitic nematode-trapping fungi *Arthrobotrys* for passage through the gastrointestinal tract of calves. **Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 48, p. 543-552, 1996.

ARAÚJO, J. V.; GOMES, A. P. S.; & GUIMARÃES, M. P. Biological control of bovine gastrointestinal nematode parasites in southern Brazil by nematode trapping fungus *Arthrobotrys robusta*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 7, p. 117-122, 1998.

ARAÚJO, J. V.; STEPHANO, M. A. & SAMPAIO, W. M. Passage of nematode-trapping fungi through the gastrointestinal tract of calves. **Veterinarski Arhiv**, v. 2, p. 69-78, 1999.

ARAÚJO, J. V. & SAMPAIO, W. M. Effects of temperature, mineral salt and passage through gastrointestinal tract of calves on alginate formulation of

Arthrobotrys robusta. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 9, p. 55-59, 2000.

ARAÚJO, J. V.; SAMPAIO, W. M.; VASCONCELOS, R. S. & CAMPOS, A. K. Effects of different temperatures and mineral salt on pellets of *Monacrosporium thaumasium* – a nematode-trapping fungus. **Veterinarski Arhiv**, v. 80, p. 181-190, 2000a.

ARAÚJO, J. V.; STEPHANO, M. A. & SAMPAIO, W. M. Effects of temperature, mineral salt and passage through the gastrointestinal tract of calves on sodium alginate formulation of *Arthrobotrys robusta*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 9, p. 55–60, 2000b.

ARAÚJO, J. V. & RIBEIRO, R. R. Atividade predatória sobre larvas de tricostrongilídeos (Nematoda: Trichostrongyloidea) de isolados fúngicos do gênero *Monacrosporium* após a passagem pelo trato gastrintestinal de bovino. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 12, p. 76-81, 2003.

ARAÚJO, J. V.; GUIMARÃES, M. P.; CAMPOS, A. K.; SÁ, N. C.; SARTI, P.; ASSIS, R. C. L. Control of bovine gastrointestinal nematode-trapping fungus *Monacrosporium thaumasium*. **Ciência Rural**, v. 34, n. 2, p. 457-463, 2004a.

ARAÚJO, J. V.; ASSIS, R. C. L.; ALVES, P. H., CAMPOS, A. K.; GANDRA, J. R. Controle biológico de tricostrongilídeos (Nematoda: Trichostrongyloidea) gastrintetinais de bovino pelo fungo *Monacrosporium sinense*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n. 4, p. 467-471, 2004b.

BARGER, I. A. The role of epidemiological knowledge and grazing management of helminth control in small ruminants. **International Journal for Parasitology**, v. 29, p. 41-47, 1999.

BARRON, G. L. The nematode-destroying fungi. Topics in Microbiology. **Canadian Biological Publications**, n.1, 140p, 1977.

BIANCHIN, I.; HONER, M. R.; NUNES, S. G.; NASCIMENTO, Y. A. do; CURVO, J. B. E.; COSTA, F. P. Epidemiologia dos nematóides gastrointestinais em bovinos de corte nos cerrados e o controle estratégico no Brasil. **Campo Grande: EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte (Circular técnica, 24)**, 120p, 1993.

BRASIL PECUÁRIA. Disponível em: <<http://www.braspec.com.br>.> Acesso em 05/01/2009.

CRESPO, J. F.; RODRIGUES, D. M.; PRATS, V. V.; GAYTAN, J.C.H.; GIVES, P. M. Capacidad nematófaga de dos cepas del hongo *Duddingtonia flagrans* desarrollada en harina de maíz-agar. **Veterinaria México** v. 30, p. 199-202, 1999.

DALLAPRIA, M.; FERRAZ, S.; MUCMOVEJ, J. J. Isolamento e identificação de fungos nematófagos de amostras de solo de diversas regiões do Brasil. **Nematologia Brasileira**, v. 15, n. 2, p. 170-177, 1991.

DIJKSTERHUIS, J.; HARDER, N.; WYSS, V.; VEENHUIS, M. Colonization and digestion of nematodes by the endoparasitic nematophagous fungus *Drechmeria coniospora*. **Mycology Research**, v. 95, n. 7, p 873-878, 1991.

DOYLE, J. J. & DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemistry Bulletin**, v. 19, p. 11-15, 1987.

DUDDINGTON, C. L. The ecology of predacious fungi I. Preliminary Survey. **Transactions British Mycological Society**, v. 34, p. 322-331, 1951.

DUDDINGTON, C. L. Notes on the technique of handling predaceous fungi. **Transactions British Mycological Society**, v. 38, p. 93-107, 1955.

ESLAMI, A.; BAHADORI, S. R.; ZARE, R.; ABYANEH, M. R. The predatory capability of *Arthrobotrys cladodes* var. *macroides* in the control of *Haemonchus contortus* infective larvae. **Veterinary Parasitology**, v. 203, p. 263-266, 2005.

FARRELL, F. C.; JAFFEE, B. A.; STRONG, D. R. The nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora* in soil of the Bodega marine reserve: distribution and dependence on nematode-parasitized moth larvae. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 38, p. 1422-1429, 2006.

FERNÁNDEZ, A. S.; LARSEN, M.; NANSEN, P.; GRØNVOLD, J.; HENRIKSEN, S. A.; BJØRN, H.; WOLSTRUP, J. The efficacy of two isolates of nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* against *Dictyocaulus viviparus* larvae in faeces. **Veterinary Parasitology**, v. 85, p. 289-304, 1999.

FERNANDEZ, F. G.; MEIRELES, M. C. A.; COIMBRA, A. M. Biological control of verminosis on ruminant.. In: Conference of the world association for the advancement of Veterinary Parasitology, 11., 1985, Rio de Janeiro. **Abstracts...** Rio de Janeiro, 1985. (Abstract 22).

GHAHFAROKHI, M. S.; ABYANEH, M. R.; BAHADORIS, R.; ESLAMI, A.; ZARE, R.; EBRAHIMI, M. Screening of soil and sheep faecal samples for predacious fungi: Isolation and characterization of nematode – trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. **Iranian Biomedical Journal**. v. 8, p. 135-142, 2004.

GOMES, A. P. S.; VASCONCELLOS, R. S.; RAMOS, M. L.; GUIMARÃES, M. P.; YATSUDA, A. P.; VIEIRA-BRESSAN, M. C. R. In vitro interaction of brazilian strains of the nematode-trapping fungi *Arthrobotrys* spp. on *Panagrellus* sp. and *Cooperia punctata*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 861-864, 2001.

GRAMINHA, E. B. N.; MONTEIRO, A. C.; SILVA, H. C.; OLIVEIRA, G. P.; COSTA, A. J. Controle de nematóides parasitos gastrintestinais por *Arthrobotrys musiformis* em ovinos naturalmente infectados mantidos em pastagens. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.40, n. 9, p. 927-933, 2005.

GRYNDLER, M.; JANSÁ, J.; HRSELOVÁ, H.; CHVÁTALOVÁ, I.; VOSÁTKA, M. Chitin stimulates development and sporulation of arbuscular mycorrhizal fungi. **Applied Soil Ecology**, v.22, p. 283-287, 2003.

GRØNVOLD, J.; HENRIKSEN, S. A.; LARSEN, M.; NANSEN, P. & WOLSTRUP, J. Aspects of biological control with special reference to

arthropods, protozoans and helminths of domesticated animals. **Veterinary Parasitology**, v. 64, p. 47-64, 1996.

HEINTZ, C. E. & PRAMER, D. Ultrastructure of nematode – trapping fungi. **Journal of Bacteriology**, v. 110, nº 3, p. 1163-1170, 1972.

HOOG, G. S. & GERRITS, V. D. E. Variability and molecular diagnostics of the neurotropic species *Cladophialophora bantiana*. **Studies in Mycology**, v. 43, p. 151-162, 1999.

HOOG, G. S.; GUARRO, J.; GENE, J.; FIGUERAS, M. F. **Atlas of Clinical Fungi**. 2 ed, The Netherlands, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, v.1, 2000.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em 02/02/2009.

JACKSON, F. & MILLER, J. Alternative approaches to control – Quo vadit?. **Veterinary Parasitology**, v. 139, p. 371-384, 2006.

JANSSON, H. B. & NORDBRING-HERTZ, B. Infections events in the fungus-nematode system. In: POINAR, O. G. & BORNE, J. H. (Ed.) **Diseases of Nematodes**. CRC Press, Boca Raton, Florida, 1988. p. 59-62.

JORGENSEN, R. A. & CLUSTER, P. D. Modes and temps in the evolution of nuclear ribosomal DNA: new characters for evolutionary studies and new markers for genetic and population studies. **Annual Missouri Botanical Garden**, v. 75, p. 1238-1247, 1989.

KAHN, L. P.; NORMAN, T. M.; WALKDEN-BROWN, S. W.; CRAMPTON, A.; O'CONNOR, L. J. Trapping efficacy of *Duddingtonia flagrans* against *Haemonchus contortus* at temperature existing at lambing in Australia. **Veterinary Parasitology**, v. 146, p. 83-89, 2007.

KONEMAM, E. W.; ROBERTS, G. D. **Micologia Prática de Laboratório**. 3.ed. Buenos Aires: Panamericana, 1992.

LACAZ, C. da S.; PORTO, E.; HEINS-VACCARI, E. M. e MELO, N. T. **Guia para identificação de Fungos Actinomicetos e Algas de interesse médico**. 8.ed. São Paulo: Savier, 1998.

LARONE, D. H. **Medically Important Fungi**. A Guide to identification. 3. Ed. Whashington D.C. ASM Press, 1995.

LARSEN, M.; FAEDO, M.; WALLER, P. J. The potential of nematophagous fungi to control the free-living stages of nematode parasites of sheep: survey for the presence of fungi in fresh faeces of grazing livestock in Australia. **Veterinary Parasitology**, v. 53, p. 275-281, 1994.

LARSEN, M.; NANSEN, P.; GRØNVOLD, J.; WOLSTRUP, J.; HERIKSEN, S. A. Biological control of gastro-intestinal nematodes – facts, future or fiction?. **Veterinary Parasitology**, v. 72, p. 479-492, 1997.

LARSEN, M. Prospects for controlling animal parasitic nematodes by predacious micro fungi. **Parasitology**, v. 120, p. 5121-5131, 2000.

LE JAMBRE, L. F. Eradication of targeted species of internal parasites. **Veterinary Parasitology**, v. 139, p. 360-370, 2006.

LI, Y.; JEEWON, R.; HYDE, K. D.; MO, M.; ZHANG, K-Q. Two new species of nematode-trapping fungi: relationships inferred from morphology, rDNA and protein gene sequence analyses. **Mycological Research**, v. 110, p. 790-800, 2006.

MACRAE, J. C. Metabolic consequences of intestinal parasitism. **The Proceedings of the Nutrition Society**, v. 52, p. 121-130, 1993.

MANUELI, P. R.; WALLER, P. J.; FAEDO, M.; MAHOMMED, F. Biological control of nematode parasites of livestock in Fiji: screening of fresh dung of small ruminants for the presence of nematophagous fungi. **Veterinary Parasitology**, v. 81, p. 39-45, 1999.

MARTIN NIETO, L.; MARTINS, E. N.; MACEDO, F. A. F.; ZUNDT, M. Observações epidemiológicas de helmintos gastrintestinais em ovelhas mestiças manejadas em pastagens com diferentes hábitos de crescimento. **Ciência Animal Brasileira**, v.4, 2003.

MATSUMOTO, Y.; SAUCEDO – CASTAÑEDA, G.; REVAH, S.; SHIRAI, K. Production of β -N-acetylhexosaminidase of *Verticillium lecaniiby* solid state and submerged fermentation utilizing shrimp waste silage as substrate and inducer. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 665-671, 2004.

MEKHTIEVA, N. A. New nematophagous fungi from Azerbaijan. **Mycological Research**, v.102, p. 683-684,1998.

MINISTÉRIO AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em 05/02/2009.

MINISTÉRIO DO PLANEJAMENTO, ORÇAMENTO E GESTÃO. Disponível em: <<http://www.planejamento.gov.br>>. Acesso em 05/02/2009.

MOTA, M. A.; CAMPOS, A. K.; ARAÚJO, J. V. Controle biológico de helmintos parasitos de animais: estágio atual e perspectivas futuras. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 23, n.3, p. 93-100, 2003.

NANSEN, P.; GRØNVOLD, J.; HENRIKSEN, S. A. & WOLSTRUP, J. Predaceous activity of the nematode-destroying fungus *Arthrobotrys oligospora* on preparasitic larvae of *Cooperia oncophora* and on soil nematodes. **Proceedings of Nematology**, v.53, p.237-243. 1986.

NANSEN, P.; FOLDAGER, J.; HANSEN, J. W.; HENRIKSEN, S. A. & JØRGENSEN, R. J. Grazing and acquisition of *Ostertagia ostertagi* in calves. **International Journal for Parasitology**, v. 27, p. 325-335, 1988.

NORDBRING-HERTZ, B. N.; JANSSON, H. B.; FRIMAN, E. Nematophagous Fungi. Film nº C 1851. Göttingen, Germany: Institut für den Wissenschaftlichen Film, 1995.

NORDBRING-HERTZ, B. N.; JANSSON, H. B.; TUNLID, A. Nematophagous fungi. **Enciclopedia of Life Sciences**, p. 1-10, 2002.

OLIVO, C. J. ; PEREIRA, L. E. T.; CARVALHO, N. M.; VOGEL, F. F.; HEINZMANN, B. M.; NEVES, A. P. Uso da bananeira (*Musa* spp.) no controle de parasitas de animais domésticos: do empirismo à ciência. **Livestock Research for Rural Development** ,v.19, 2007.

PAOLINI, V.; BERGEAUD, J. P.; GRISEZ, C.; PREVOT, F.; DORCHIES, P. and HOSTE, H. Effects of condensed tannins on goats experimentally infected with *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, v. 113, p. 253-261, 2003.

PEÑA, M. T.; MILLER, J. E.; FONTENOT, M. E.; GILLESPIE, A.; LARSEN, M. Evaluation of *Duddingtonia flagrans* in reducing infective larvae of *Haemonchous contortus* in faeces of sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 103, p. 259-265, 2002.

PERRY, B. D. & RANDOLPH, T. F. Improving the assessment of the economic impact of parasitic diseases and their control in production animals. **Veterinary Parasitology**, v. 84, p. 145-168, 1999.

PERSMARK, L. & NORDBRING-HERTZ, B. Conidial trap formation of nematode-trapping fungi in soil and soil extracts. **FEMS Microbiology Ecology**, v.22, p. 313-324, 1997.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D.; BHUDHASAMAI, K.; MISCAMBLE, B. F.; WHEELER, K. A.; TANBOON-EK, P. The normal mycoflora of commodities from Thailand. **Interantional Journal of Food Microbiology**, v.23, p. 35-43, 1994.

QUADROS, D. G. **Nematodioses de ovinos e caprinos mantidos em pastagens no oeste da Bahia**. 2004. T.104 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

RATTANAKIT, N.; PLIKOMOL, A.; YANO, S.; WAKAYAMA, M.; TACHIKI, T. Utilization of shrimp shellfish waste as a substrate for solid-state cultivation of *Aspergillus sp.* S1-13: Evaluation of a culture based on chitinase formation which is necessary for chitin-assimilation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 93, nº 6, p. 550-556, 2002.

REW, R. S. Production-based control of parasitic nematode of cattle. **International Journal for Parasitology**, v. 29, p. 177-184, 1999.

RUBNER, A. Predacious fungi from Ecuador. **Mycotaxon**, v. 51, p.143-151, 1994.

SANTOS, M. A.; FERRAZ S.; MUCHOVEJ, J. J. Detection and ecology of nematophagous fungi from Brazilian soils. **Nematologia Brasileira**, v. 15, p. 121-134, 1991.

SANTOS, L. E.; CUNHA, E. A.; BUENO, M. S.; Manejo de pastagens para a produção de ovinos. SIMPÓSIO MINEIRO DE OVINOcultura, 2., WORKSHOP SOBRE CORTES DIFERENCIADOS, 2002, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, p. 105-140. 2002.

SAXENA, G. Observations on the occurrence of nematophagous fungi in Scotland. **Applied Soil Ecology**, v. 39, p. 352-357, 2008.

SKIPP, R. A.; YEATES, G. W.; CHEN, L. Y.; GLARE, T. R. Occurrence, morphological characteristics and ribotyping of New Zealand isolates of *Duddingtonia flagrans*, a candidate for biocontrol of animal parasitic nematodes. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, v. 45, p. 187-196, 2002.

STEVENS, R. B. **Micology Guidebook**. University of Washington Press Seattle, 1981.

STROMBERG, B. E. Environmental factors influencing transmission. **Veterinary Parasitology**, v. 72, p. 247-264, 1997.

STROMBERG, B. E. & AVERBECK, G. A. The role of parasite epidemiology in the management of grazing cattle. **International Journal for Parasitology**, v. 29, p. 33-50, 1999.

THAMSBORG, S. M.; ROEPSTORFF, A. & LARSEN, M. Integrated and biological control of parasites in organic and conventional production systems. **Veterinary Parasitology**, v. 84, p. 169-186, 1999.

VAN OORSCHOT, C. A. N. Taxonomy of the *Dactylaria* complex. A review of *Arthrobotrys* and allied genera. **Studies in mycology**, v.26, p. 61-95, 1985.

WALLER, P. J.; FAEDO, M.; ELLIS, K. The potential of nematophagous fungi to control the free-living stages of nematode parasites of sheep: towards the development of a fungal controlled release device. **Veterinary Parasitology**, v. 102, p. 299-308, 2001a.

WALLER, P. J.; KNOX, M. R.; FAEDO, M. The potential of nematophagous fungi to control the free-living stages of nematode parasites of sheep: feeding and block studies with *Duddingtonia flagrans*. **Veterinary Parasitology**, v. 102, n. 4, p. 321-330, 2001b.

WILLIAMS, J. C. Integrated control (international experiences). **International Journal for Parasitology**, v. 29, p. 183-184, 1999.

ZHANG, K. Q.; LIU, X. Z.; CAO, L.; GAO, R. H. A new species of *Arthrobotrys* from China. **Mycological Research**, v. 100, p. 527-530, 1996.

ANEXOS

ANEXO 1

Método Baermann modificado por Santos *et al.* (1991) para obtenção de NVL

Colocar a tela metálica sobre o funil e posteriormente o material (caldo e aveia) para a obtenção das larvas.

Encher o funil com água a 45°C, de modo que o material fique parcialmente submerso. Este conjunto fica em repouso durante 60 minutos. Neste período, as larvas vivas passam do material para a água morna e se acumulam na porção inferior do funil.

Após 60 minutos, a pinça deve ser aberta e coletar o volume de 3 a 5 ml em placa de Petri.

Observar a viabilidade dos nematóides em microscópio estereoscópico no aumento de 10x e 40x.

ANEXO 2

Agar-água 2%

Quantidade	Reagentes
20g	agar
500ml	água destilada q.s.p.

Aquecer a água à temperatura de 40°C, acrescentar agar e distribuir a mistura em Erlenmeyer, tampar com tampão de algodão. Envolver o bocal com papel e prender com elástico de borracha.

Autoclavar por 20 minutos a 120°C e 1 atm.

ANEXO 3

BDA (Batata Dextrose Agar) - Laboratório SIGMA

Quantidade	Reagentes
20g	agar
1000ml	água destilada q.s.p.

Aquecer a água à temperatura de 40°C, adicionar 20 g de BDA. Distribuir em Erlenmeyers e tampar com tampão de algodão. Envolver o bocal com papel e prender com elástico de borracha. Autoclavar por 20 minutos a 120°C e 1 atm.

ANEXO 4

CMA (Corn Meal Agar) – Laboratório SIGMA

Quantidade	Reagentes
20g	CMA
1000ml	água destilada q.s.p.

Aquecer a água à temperatura de 40°C, adicionar 20 g de CMA. Distribuir em Erlenmeyers e tampar com tampão de algodão. Envolver o bocal com papel e prender com elástico de borracha. Autoclavar por 20 minutos a 120°C e 1 atm.

ANEXO 5

Meio de cultura sólido com quitina e sais

Meio de cultura para 1 litro, contendo 5% de concentração de quitina.

Quantidade	Reagentes
50g	quitina
4g	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
2,5g	KH_2PO_4 ,
20g	agar
1000 ml	água destilada q.s.p.

Obs: Para 2,5% de concentração de quitina, utilizou-se 25g e para 7,5%, utilizou-se 75g de quitina.