

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO –
UENF

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR, CRESCIMENTO MICELIAL E CAPACIDADE
PREDÁTÓRIA IN VITRO E IN VIVO DE ISOLADOS DE FUNGOS
NEMATÓFAGOS DA ESTAÇÃO ECOLÓGICA DE GUAXINDIBA, RJ

TERESA PONTES

CAMPOS DOS GOYTACAZES, RJ
FEVEREIRO/2018

TERESA PONTES

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR, CRESCIMENTO MICELIAL E CAPACIDADE
PREDATÓRIA IN VITRO E IN VIVO DE DE ISOLADOS DE FUNGOS
NEMATÓFAGOS DA ESTAÇÃO ECOLÓGICA DE GUAXINDIBA, RJ**

**Dissertação apresentada ao
Centro de Biociências e
Biotecnologia da Universidade
Estadual do Norte Fluminense,
como parte das exigências para a
obtenção do título de Mestre em
Biociências e Biotecnologia, área
de concentração Biologia
Celular.**

Orientador: Prof. Dr. Clóvis de Paula Santos.
Coorientadora: Doutora Josiana Gomes de Andrade

**CAMPOS DOS GOYTACAZES, RJ
FEVEREIRO/2018**

TERESA PONTES

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR, CRESCIMENTO MICELIAL E CAPACIDADE
PREDATÓRIA IN VITRO E IN VIVO DE DE ISOLADOS DE FUNGOS
NEMATÓFAGOS DA ESTAÇÃO ECOLÓGICA DE GUAXINDIBA, RJ**

**Dissertação apresentada ao
Centro de Biociências e
Biotecnologia da Universidade
Estadual do Norte Fluminense,
como parte das exigências para a
obtenção do título de Mestre em
Biociências e Biotecnologia, área
de concentração Biologia
Celular.**

Aprovada em 28 de fevereiro de 2018
Comissão organizadora

Prof. Aleksandra Menezes de Oliveira (Dr. Ciências) – UFRJ

Prof. Ricardo Moreira de Souza (Dr. Patologia de Plantas) – UENF

Prof. Francimar Fernandes Gomes (Dr. Ciência Animal) – UENF

Josiana Gomes de Andrade (Dr. Biociências e Biotecnologia) - UENF
(Co-orientadora)

Prof. Clóvis de Paula Santos (Dr. Méd.Vet. Parasitologia Veterinária) - UENF
(Orientador)

Ofereço à:

Toda minha família, em especial Maria Tereza Pontes (Mãe), Claudio Rangel Pontes (Pai), Debora Pontes (Irmã), e ao meu namorado Mauricio Pereira Simão. Por todo apoio e dedicação em entender os momentos difíceis passadas durante a realização dessa etapa.

Dedico ao:

Meu irmão Claudio Pontes (*In Memoriam*). Que em todo seu momento de vida me deu apoio para a realização da minha vida profissional.

“Só enquanto eu respirar, vou me lembrar de você...” (O anjo mais velho - O Teatro Mágico).

Agradecimentos

- Ao meu Deus, por ter me concedido a graça da vida e por durante o mestrado eu ter tido fé, sabedoria e discernimento, sem Ele nada disso seria possível.
- A UENF, em especial, o LBCT, laboratório onde passei minha iniciação científica e onde também pude completar o mestrado.
- A FAPERJ por ter financiado todo o desenvolvimento do trabalho e por ter concedido a bolsa.
- Ao professor Fábio Olivares, pela colaboração e seus alunos, em especial Cleiton de Paula, Tatiane Sanches e Kamilla Aguiar, por terem me auxiliado nos trabalhos da biologia molecular.
- Aos meus pais Claudio Rangel Pontes e Maria Tereza Pontes, que me educaram pra ser quem sou, priorizando o que seria melhor pra minha vida, tendo assim me apoiado à vida acadêmica. A vocês minha eterna gratidão e imenso amor.
- A minha Irmã Debora Pontes e meu cunhado Ricardo Tudesco que me mostraram que o amor e união da família sempre será o melhor apoio pra qualquer decisão, que me ajudaram a achar a certeza das minhas escolhas e também pelo amor e carinho que me acolheram em suas vidas.
- A todos os familiares que de alguma forma contribuíram para a minha formação, mostrando companheirismo em momentos difíceis, em especial Ana Beatriz Pontes, que disponibilizou de seus horários para me acompanhar em finais de semana e feriados de experimento.
- Ao Mauricio Pereira Simão, pelo companheirismo, viagens ao campo, textos traduzidos, tabelas atualizadas, noites viradas esperando pelo desenvolvimento dos experimentos e escritas. Foi quem me deu a maior força e entendeu que pra eu ser uma boa namorada a UENF tinha que estar em dia.
- Ao professor Clóvis de Paula Santos, por ter me concedido um espaço em seu laboratório, ter me confiado um projeto, e também pelos ensinamentos de vida acadêmica, sua confiança, paciência e dedicação foram cruciais para montar a minha experiência científica.
- A Josiana Gomes de Andrade, pelos ensinamentos e por me direcionar a um amadurecimento profissional.

- A minha equipe, Viviane Campos, melhor companheira de campo, de laboratório, por ter feito um maravilhoso trabalho em equipe, composta por nós duas. Ir para campo mesmo que cansativo, se tornou divertido e de ótimas lembranças.
- A minha eterna coorientadora Letícia Oliveira da Rocha, que me acolheu e ensinou nos momentos em que mais precisei.
- A Coordenação do curso de Biociências e Biotecnologia com o professor Arnaldo Façanha, por manterem o programa de pós-graduação e também por me socorrer nos sufocos burocráticos.
- As técnicas do LBCT Adriana Alves e Beatriz Ferreira, pelos ensinamentos nos equipamentos do laboratório.

A todos minha eterna gratidão!

Resumo

O uso indiscriminado de anti-helmínticos para o controle das nematodioses gastrintestinais em ovinos gera nematoides resistentes, dificuldade no manejo do medicamento e gastos desnecessários. Além de causar danos à saúde dos animais e ao meio ambiente. Uma das alternativas para controle das nematodioses é a utilização de fungos nematófagos na redução da contaminação das pastagens, consequentemente diminuindo a reinfecção dos animais e o emprego de anti-helmínticos. Isolados de fungos nematófagos do gênero *Arthrobotrys* spp. e *Monacrosporium* spp. obtidos do solo da Estação Ecológica de Guaxindiba, RJ possuem poucos estudos avaliando seu potencial biotecnológico, bem como a descrição dos dados biológicos desses fungos. Assim, este trabalho avaliou o crescimento micelial e caracterizou a região do gene ITS do rDNA dos fungos *Arthrobotrys oligospora*, *A. musiformis*, *Monacrosporium thaumasium* e *M. haptotylum*, além de investigar a atividade predatória *in vitro* e a capacidade dos isolados *Arthrobotrys* spp de sobreviverem ao transito gastrintestinal de ovinos. A avaliação *in vitro* mediu o crescimento micelial, aparência, relevo e pigmentação das colônias em cultivo a 25° C por até 10 dias também foi avaliada a atividade predatória dos fungos em larvas infectantes (L₃) recuperadas de cultivos fecais com ou sem substrato a base de milho triturado contendo diferentes concentrações de esporos fúngicos por grama. Os fungos foram caracterizados geneticamente por amplificação e sequenciamento da região ITS completo com primers universais. As sequências obtidas foram comparadas com sequências depositadas no banco de dados (NCBI) utilizando o algoritmo BLAST. A análise foi conduzida com sequencias que foram importadas para o programa BIOEDIT e alinhadas utilizando o programa Clustal W. Dendogramas foram montados utilizando o algoritmo (ML) no modelo p-distância no programa MEGA. Para a avaliação do transito gastrintestinal, os isolados de *Arthrobotrys* spp. foram administrados oralmente aos ovinos e as fezes coletadas as 24, 48 e 72 horas pré e pós administração fúngica para determinar a sobrevivência e a eficácia dos isolados com base na sua atividade predatória sobre as L₃ recuperadas em coproculturas entre os períodos pré e pós administração. *M. haptotylum* apresentou maiores diferenças de crescimento da colônia em

relação aos demais isolados fúngicos. Os isolados de *Arthrobotrys* spp. reduziram as L₃ em todas as concentrações avaliadas atingindo reduções entre 63,3 – 97,7% (*A. oligospora*) e 61 – 78,7% (*A. musiformis*). Porém, nas condições avaliadas, não reduziram as L₃ nos cultivos fecais após o estresse digestivo. Na identificação molecular a árvore montada mostrou a formação de um clado distinto para as sequências de *Arthrobotrys* spp. e outro clado para *Monacrosporium* spp. O fungo *M. thaumasium* formou um grupo taxonômico com a sequência do *M. thaumasium* do GenBank, porém estes possuem o clado mais próximo do gênero *Arthrobotrys* spp. A sequência obtida de *M. haptotylum* agrupou no clado dos *Monacrosporium* spp.

Palavras Chave: Fungos nematófagos, Internal transcribed spacer; *Monacrosporium* spp., *Arthrobotrys* spp., nematoides gastrintestinais, ovinos.

Abstract

The indiscriminate use of anthelmintics to the gastrointestinal nematodiasis control in sheep generates resistant nematodes, difficulty in medication handling and unnecessary expenses. In addition to causing damage to animals health and the environment. One of the nematodiasis control alternatives is the use of nematophagous fungi in reducing contamination of pastures, consequently reducing reinfection of animals and the use of anthelmintics. Isolates of nematophagous fungi of the genus *Arthrobotrys* spp. and *Monacrosporium* spp. obtained from the soil of the Ecological Station of Guaxindiba, RJ has few studies evaluating their biotechnological potential, as well as the description of the biological data of these fungi. Thus, this work evaluated mycelial growth and characterized the ITS gene region of the rDNA of the fungi *Arthrobotrys oligospora*, *A. musiformis*, *Monacrosporium thaumasium* and *M. haptotylum*, in addition to investigating predatory activity in vitro and the ability of *Arthrobotrys* spp isolates to survive to the gastrointestinal transit of sheep. The in vitro evaluation measured the mycelial radial growth, appearance, relief and pigmentation of the colonies in culture at 25° C for up to 10 days on Sabouraud agar and the predatory activity of the fungi in infective larvae (L₃) recovered from fecal cultures with or without substrate a crushed corn base containing different concentrations of fungal spores per gram. The fungi were genetically characterized by amplification and sequencing of the complete ITS region with universal primers.

The obtained sequences were compared to sequences deposited in the database (NCBI) using the BLAST algorithm. The analysis was conducted with sequences that were imported into the BIOEDIT program and aligned using the Clustal W. program. Dendrograms were assembled using the algorithm (ML) in the p-distance model in the MEGA program. For the evaluation of the gastrointestinal transit, the isolates of *Arthrobotrys* spp. were administered orally to the sheep and feces collected 24, 48 and 72 hours before and after fungal administration to determine the survival and efficacy of the isolates based on their predatory activity on L₃ recovered in coprocultures between the pre and post administration periods. *M. haptotylum* presented greater differences in colony growth in relation to the other fungal isolates. The isolates

of *Arthrobotrys* spp. reduced L₃ in all evaluated concentrations reaching reductions between 63.3 - 97.7% (*A. oligospora*) and 61 - 78.7% (*A. musiformis*). However, under the conditions evaluated, they did not reduce L₃ in fecal cultures after digestive stress. In the morphological identification the mount showed a formation of a distinct clade for as sequences of *Arthrobotrys* spp. and another clade for *Monacrosporium* spp. The fungus *M. thaumasium* formed a taxonomic group with a sequence of *M. thaumasium* from GenBank, however these have the closest clade of the genus *Arthrobotrys* spp. The sequence obtained from *M. haptotylum* clustered in the clade of *Monacrosporium* spp.

Key words: Nematophagous fungi, Internal transcribed spacer; *Monacrosporium* spp., *Arthrobotrys* spp., gastrointestinal nematodes, sheep.

Índice de tabelas

Tabela 1:	Número de ovos por grama de fezes (OPG) obtido de ovinos tratados com o fungo A. <i>oligospora.</i>	
	44
Tabela 2:	Número de ovos por grama de fezes (OPG) obtido de ovinos tratados com o fungo A. <i>musiformis.</i>	
	46

Índice de abreviaturas

L₁	Larva de 1º estágio
L₂	Larva de 2º estágio
L₃	Larva infectante
TAE	Tampão Tris-Acetato-EDTA
dNTPs	Desoxiribonucleotídeos fosfatados
OPG	Ovos por grama de fezes
ITS	Internal transcribed spacer
PCR	Polymerase Chain Reaction
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
NCBI	National Center for Biotechnology Information
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
ML	Maximun Likelihood
K2-p+G	Kimura 2 parâmetros
RNA	ácido ribonucleico

Índice de figuras

Figura 1	Demonstração dos estádios de vida do <i>Haemonchus contortus</i> e <i>Trichostrongylus colubriformis</i>	20
Figura 2	Ciclo de vida geral dos principais nematoides parasitos do trato gastrointestinal de ruminantes.....	21
Figura 3	Representação esquemática dos fungos nematófagos.....	27
Figura 4	Órgãos de captura de fungos nematófagos predadores.....	28
Figura 5	Coprocultura incubada dos tratamentos <i>in vitro</i>	36
Figura 6	Crescimento de fungos nematófagos em Agar Sabouraud durante 10 dias de avaliação.	41
Figura 7	Avaliação do crescimento radial de fungos nematófagos.....	42
Figura 8	Atividade predatória <i>in vitro</i> dos fungos nematófagos dos gêneros <i>Arthrobotrys spp</i> em diferentes concentrações de substrato contendo os esporos.....	43
Figura 9	Número de larvas recuperadas antes, durante e depois (1 – 5) da administração da ração (3) contendo esporos fúngicos do isolado de <i>A. musiformis</i>	45
Figura 10	Número de larvas recuperadas antes, durante e depois (Dia 1 - 5) da administração da ração (Dia 3) contendo esporos fúngicos do isolado de <i>A. oligospora</i>	46
Figura 11	Gel da amplificação da região ITS dos fungos nematófagos dos gêneros <i>Arthrobotrys spp.</i> e <i>Monacrosporium spp...</i>	47
Figura 12	Análise filogenética baseada nas sequencias de RNA ribossomal ITS.....	48

Sumário

1. Introdução	16
2. Revisão Bibliográfica	19
2.1. Nematodioses na ovinocultura e o Ciclo de vida de nematoides gastrointestinais em ovinos.....	19
2.2. Resistência anti-helmíntica e o controle das nematodioses gastrintestinais	21
2.3. Medidas utilizando controle biológico.....	23
2.4. Caracterização dos fungos nematófagos para controle de nematoides em ovinos.....	25
I. <i>Arthrobotrys spp.</i>	28
II. <i>Monacrosporium spp.</i>	29
2.5. Identificação molecular dos isolados através da caracterização da região do gene ITS do rDNA	30
3. Objetivo	33
3.1. Geral:	33
3.2. Específico:.....	33
4. Material e métodos	34
4.1. Manutenção e cultivo dos fungos Nematófagos	34
4.2. Manutenção e cultivo dos nematoides de vida livre <i>Panagrellus sp</i>	34
4.3. Determinação do crescimento radial dos fungos nematófagos isolados	34
4.4. Avaliação da atividade predatória <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> dos isolados de <i>Arthrobotrys spp.</i>	35
4.4.1. Cultivo dos fungos	35
4.4.2. Avaliação da atividade predatória <i>in vitro</i> dos isolados <i>Arthrobotrys spp.</i> em diferentes concentrações de esporos	35
4.4.3. Administração dos fungos e obtenção e colheita das fezes	36
4.5. Identificação molecular dos fungos nematófagos isolados	37
4.5.1. Extração do DNA por um Kit comercial.....	37
4.5.2. Amplificação dos produtos da sequências de ITS	37
4.5.3. Análise do DNA purificado e da amplificação da região ITS.....	38
4.5.4. Purificação da Reação para Sequenciamento.....	38
4.5.5. Sequenciamento e análise filogenética.....	38
4.6. Análise estatística	39
5. Resultados	40

5.1. Avaliação macroscópica da colônia	40
5.2. Avaliação do crescimento radial do micélio	41
5.3. Avaliação da atividade predatória <i>in vitro</i> em diferentes concentrações de esporos dos fungos do gênero <i>Arthrobotrys</i> spp.	43
5.4. Avaliação da passagem de fungos nematófagos do gênero <i>Arthrobotrys</i> spp pelo trato gastrointestinal de ovinos.....	44
5.4.1. Resultados de OPG diário de ovinos tratados com <i>A. musiformis</i> ...	44
5.4.2. Passagem do fungo <i>A. musiformis</i> pelo trato gastrointestinal de ovinos	45
5.3.2. Resultados de OPG diário tratadas com <i>A. oligospora</i>	46
5.3.3. Passagem do fungo <i>A. oligospora</i> pelo trato gastrointestinal.	46
5.3.4. Sequenciamento e análise filogenéticas dos fungos dos gêneros <i>Arthrobotrys</i> spp. e <i>Monacrosporium</i> spp.	47
6. Discussão	50
7. Conclusão	52
8. Referências	53
9. Anexos	68

1. Introdução

A ovinocultura está presente em praticamente todos os continentes, pois os ovinos têm a capacidade de se adaptar aos diferentes climas, temperaturas e ambientes, tornando a ovinocultura uma atividade em expansão e que proporciona alternativas para a subsistência humana, além da exploração econômica (Zacharias, 2004). No Brasil, o efetivo de ovinos em 2014 foi de 17,61 milhões de unidades, um aumento de 1,9% em relação ao ano anterior e sendo a maioria (57,5%) criada na região nordeste (IBGE, 2015).

Um dos principais problemas encontrados pelos ovinocultores é a infecção por nematoides gastrintestinais que são relatados em pequenos ruminantes de vários países. Estes se infectam durante o pastejo, e dependendo de alguns fatores como raça, idade e estado nutricional, o impacto da parasitose pode promover graves quedas produtivas e econômicas (Araújo et al., 2004).

Medicamentos anti-helmínticos são utilizados mundialmente para o controle das nematodioses gastrintestinais. Porém o uso indiscriminado destes compostos tem levado a seleção de parasitas resistentes, além do elevado custo com a compra e administração do produto (Almeida et al., 2010; Gasbarre et al., 2009). Como alternativas de controle têm: o manejo do rebanho e de pastagens, pastoreio rotacionado, descontaminação prévia das pastagens, pastoreio com alternância de categorias e ou espécies de hospedeiros, melhoramento nutricional e genético do rebanho (Cezar, 2000). Além destas formas de controle já disponíveis, outras vem sendo estudadas, como: melhoramento genético (Riggio et al., 2013); marcadores genéticos para resistência aos nematoides (Davies et al., 2006); produção de vacinas (Schallig et al., 1994; Tandler et al., 2008); obtenção de novos fármacos (Kaminsky et al., 2008) e a utilização de organismos para controle biológico (Sinott et al., 2016).

A utilização de controle biológico faz parte do desenvolvimento de estudos que visam à busca de alternativas complementares aos métodos tradicionais, que sejam de baixo custo e menos prejudiciais à saúde humana e ao equilíbrio ambiental (Cruz, 2011). Neste sentido tem-se a exploração de fungos nematófagos (Murray et al., 1990; Scholler et al., (Murray et al., 1990; Scholler et al., 1994; Tavela et al., 2013).

Os fungos nematófagos são chamados de fungos destruidores de nematoides e são agrupados em: predadores; endoparasitas e oportunistas ou parasitos de ovos (Molento et al., 2013). Os predadores são os mais estudados visando o controle de nematoides gastrintestinais de animais de produção. Entre esses, destacam-se *Duddingtonia flagrans* e *Arthrobotrys oligospora* (Braga et al., 2014).

Os fungos nematófagos são encontrados em várias linhagens fúngicas, mas muitas das espécies descritas pertencem à família *Orbiliaceae* (Ascomycota). A taxonomia e a diversidade da família *Orbilialiaceae*, foram estudadas principalmente com métodos morfológicos, porém recentemente técnicas moleculares complementares vêm sendo utilizadas para a caracterização dos organismos pertencentes a essa família (Scholler et al., 1999; Porter et al., 2011). A região ITS (do inglês: *internal transcribed spacer*) é um DNA ribossômico utilizado para análises filogenéticas nos níveis de gênero e espécie. Essa região inclui convencionalmente todas as sequencias do DNA ribossomal ITS1, 5.8S e o ITS2. O fato das regiões ITS serem flanqueadas por segmentos conservados, serem relativamente curtas (500 a 800pb) e aparecerem em grande número de cópias no genoma permite que sejam amplificadas e sequenciadas com facilidade (Coleman, 2003).

Embora, *D. flagrans* e *A. oligospora*, estejam entre as principais espécies investigadas para o biocontrole visando os nematoides gastrintestinais, a obtenção de espécies autóctones é alvo importante de investigação já que possibilita o achado de outros isolados gerando, portanto, conhecimentos sobre a biodiversidade destes microrganismos. Nosso grupo isolou e identificou morfológicamente fungos nematófagos oriundos da Estação Ecológica de Guaxindiba, RJ bem como fez a correlação da ocorrência e abundância dos fungos isolados aos componentes físicos, químicos e biológicos do solo (Costa et al., 2012). Alguns destes isolados foram selecionados a fim de avaliar seu potencial biotecnológico e baseado na taxa de crescimento radial em função das diferentes temperaturas e atividade predatória *in vitro*, os isolados *Arthrobotrys oligospora*, *A. musiformis* e *Monacrosporium thaumasium* seriam aqueles mais promissores para serem avaliados em futuros ensaios visando o controle biológico de nematoides gastrintestinais dos animais de produção (Pontes, 2016).

Além disto, seria importante caracterizar geneticamente os isolados até então investigados. Sabe-se que a espécie *Monacrosporium haptotylum* não possui nenhuma descrição genética, já as espécies *Arthrobotrys oligospora*, *Arthrobotrys musiformis* e *Monacrosporium thaumasium* possuem depósito, portanto, os dados obtidos poderão ser usados para adicionar informações sobre a diversidade genética dos isolados, podendo assim comparar os dados morfológicos aos genéticos. Neste sentido, a proposta contida neste trabalho avaliou a atividade predatória *in vitro* e *in vivo* dos isolados de *A. oligospora* e *A. musiformis* frente a nematoides de ovinos bem como a caracterização da região do gene ITS do rDNA dos fungos dos gêneros *Arthrobotrys* spp. e *Monacrosporium* spp e parâmetros no crescimento destes isolados.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Nematodioses na ovinocultura e o Ciclo de vida de nematoides gastrointestinais em ovinos

A ovinocultura é fortemente prejudicada com infecções por nematoides gastrointestinais que causam graves danos aos rebanhos, como retardo de crescimento, perda de peso e até mesmo a morte (Vieira et al., 2013). A perda de características substanciais na produção de ovinos traz consigo perdas econômicas ao produtor como redução na produção de carne e leite e declínio da fertilidade (Bastos et al., 2017). Outro aspecto que pode estar relacionado a perdas econômicas ao produtor é a resistência dos nematoides gastrointestinais a anti-helmínticos, que foram relatados em várias regiões do Brasil (Salgado e Santos, 2016).

As nematodioses gastrointestinais representam um dos principais problemas sanitários de ovinos criados em sistema de pastejo, o principal fator apontado como causa de baixa produção de pequenos ruminantes é o estado sanitário dos animais associado à ausência ou ao uso inadequado de tecnologias (Vieira et al., 1997). Sendo assim, a variedade de espécies que parasitam os animais é influenciada pela frequência de tratamentos com anti-helmíntico, pelo manejo e pelas condições ambientais (Amarante, 2014). As espécies *Haemonchus contortus* (Figura 1 A, B e C) e *Trichostrongylus colubriformis* (Figura 1 D, E e F) são os maiores responsáveis pelos prejuízos econômicos da ovinocultura brasileira e mundial. *H. contortus* é um parasito hematófago que tem por habitat o abomaso dos ruminantes. Os nematoides adultos apresentam de 1 cm a 3 cm de comprimento. *T. colubriformis* é parasito do intestino delgado que, além de muito comum, também com frequência apresenta resistência aos anti-helmínticos (Gill 1996; Molento et al., 2004;). Os nematoides adultos são pequenos, apresentam de 4 mm a 12 mm de comprimento, e vivem em túneis nas vilosidades (Amarante, 2014). É importante citar, ainda, outros gêneros de nematoides, tais como: *Cooperia*, *Oesophagostomum*, *Ostertagia* e *Strongyloides* envolvidos na infecção parasitária nestes animais (Periasamy et al., 2014; Bricarelo et al., 2007; Knight; Bisset, 2015).

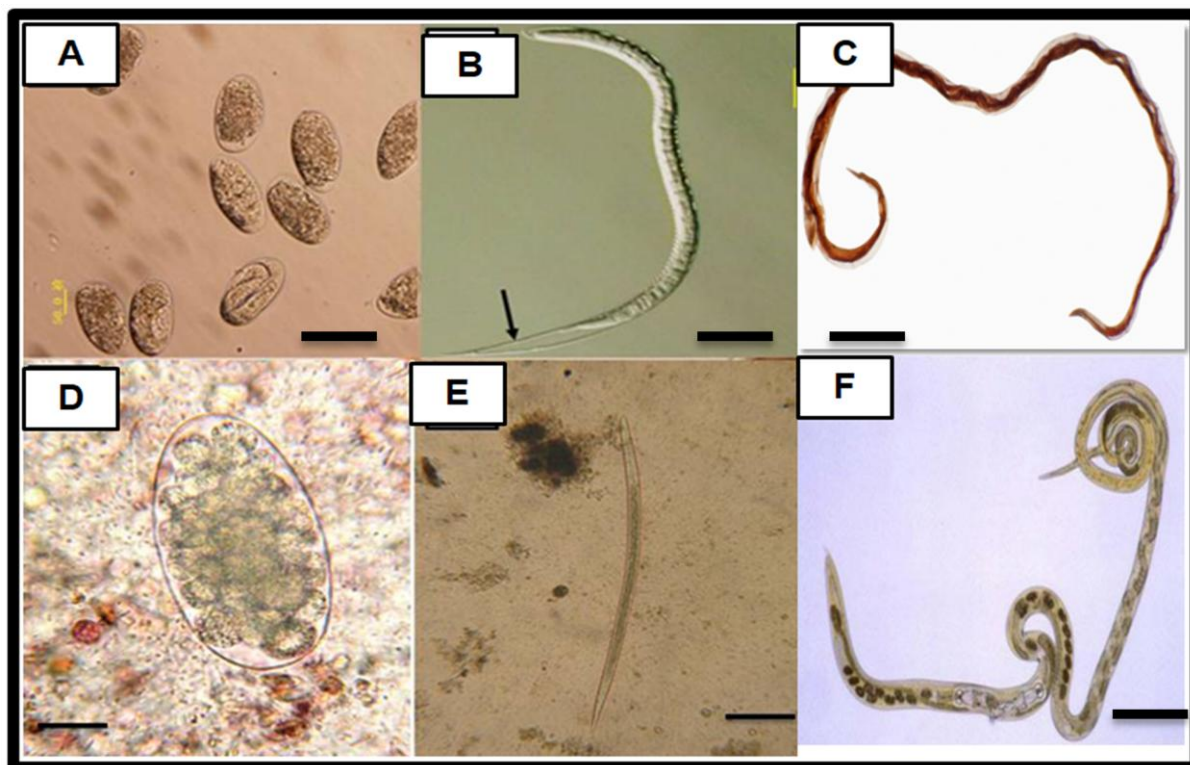


Figura 1: Demonstração dos estádios de vida do *Haemonchus contortus* e *Trichostrongylus colubriformis* (A) Ovos de *H. contortus* (B) Larva infectante (L₃) de *H. contortus*. (El-Ashram et al., 2017) (C) Fêmea adulta do *H. contortus* (D) Ovo do *T. colubriformis*. (E) L₃ *T. colubriformis* (Latters et al., 2011). (F) Fêmea adulta do *T. colubriformis* adulto.

O ciclo biológico geral dos nematoides gastrintestinais (Figura 2) é bem semelhante e pode ser dividido em duas fases: a de vida parasitária e a de vida livre. A fase parasitária caracteriza-se pela ingestão da larva infectante (L₃) na pastagem e posterior evolução para estágio larval seguinte (L₄). A L₄ passa um período inserida no tecido e ao emergir já é um adulto jovem. Posteriormente, atingem maturidade sexual e entre três a quatro semanas após a ingestão das L₃ as fêmeas adultas depositam ovos no estômago (abomaso) ou intestino do animal dependendo da espécie envolvida na infecção. Os ovos são eliminados com as fezes no meio ambiente, dando início a fase de vida livre do parasito. Dos ovos são originados o primeiro estágio larval (L₁) que evoluem para L₂, posteriormente L₃. Durante o desenvolvimento larval os estádios L₁ e L₂ se alimentam de microrganismos, crescem e sofrem uma muda para o estágio seguinte. L₃ não se alimenta e obtém energia através do metabolismo de reserva nas células intestinais. Em condições de umidade e

temperatura adequadas o desenvolvimento até larva infectante ocorre em quatro a sete dias. Esse desenvolvimento envolve o bolo fecal e as pastagens (Taylor et al., 2010; Girão et al., 1998).

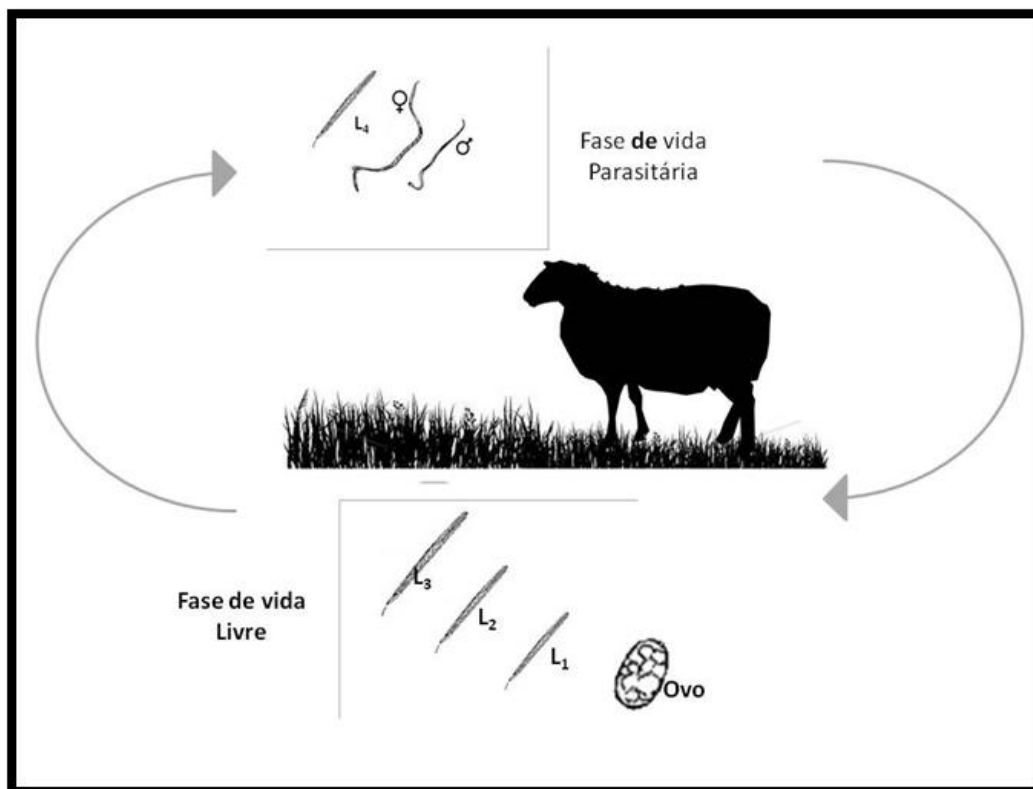


Figura 2: Ciclo de vida geral dos principais nematoides parasitos do trato gastrointestinal de ruminantes: A fase de vida livre é caracterizada pelo desenvolvimento dos ovos até larvas infectantes (L_3). A fase parasitária ocorre durante o desenvolvimento das larvas infectantes até se tornarem adultos dentro do hospedeiro (Adaptado de Cruz et al., 2011).

2.2. Resistência anti-helmíntica e o controle das nematodioses gastrintestinais

As estratégias de controle das nematodioses mundialmente são baseadas no uso de medicamentos anti-helmínticos pertencentes a diversos grupos químicos (Zvinorova et al., 2016). Estes podem ser de amplo ou reduzido espectro de ação ou seja, agindo em respectivamente em vários ou pontualmente em alguns tipos de helmintos e podem ser categorizados em: amplo espectro (1) benzimidazóis (thiabendazol, mebendazol, parbendazol, albendazol, fenbendazol, oxbendazol, oxfendazol e triclabendazol); (2)

imidazotiazóis (levamisol e tetramisol) e pirimidinas (pirantel e morantel); (3) lactonas macrocíclicas (avermectinas: ivermectina, abamectina, doramectina, eprinomectina e selamectina; e milbemicinas: moxidectina, nemadectina e milbemicina oxima; (4) Derivado de amino acetonitrila (monopantel) (Niciura et al., 2009); (5) spiroindoles (derquantel) (Little et al., 2010, 2011). Os anti-helmínticos de reduzido espectro são: (1) salicilanilidas (closantel, rafxanida niclosamida e oxiclozamida) e nitrofenóis ou substitutos fenólicos (disofenol, nitroxinil, niclofan, nitroscanato e bitionol), e (2) organofosforados (diclorvós, triclorfon, coumafós e fention) (Niciura et al. , 2009).

A eficácia do tratamento anti-helmíntico irá depender do grau de absorção do fármaco utilizado, intensidade da infecção, o tempo de meia vida do fármaco no interior do organismo animal e outros efeitos (Zacharias et al. 2004). Os anti-helmínticos citados têm sido associados a vários casos de parasitas resistentes, pois a utilização desses não consideram fatores epidemiológicos que são predominantes na região que irão interferir diretamente na população parasitária daquele ambiente (Zhang et al., 2016). Além do uso indiscriminado das drogas anti-helmínticas, os produtores não realizam uma alternância dos mesmos, com o uso inadequado de um determinado anti-helmíntico, há uma seleção de indivíduos que possuem capacidade de resistirem aos fármacos. Segundo Papadopoulos (2008), qualquer ação que contribua para um maior percentual de sobreviventes ao tratamento gerarem uma próxima geração, contribuirá para o desenvolvimento da resistência, enquanto qualquer ação que aumente a prevalência da população não tratada diminuirá seu desenvolvimento. Por esses fatores existe uma necessidade de métodos alternativos de controle de parasitas no sistema de produção animal.

Diversos estudos vêm sendo feitos com estratégias de controle alternativo de verminoses, um deles é o princípio de refugia (Van Wyk et al., 2001), O termo refugia é utilizado para definir um grupo de larvas que não foram expostas a ação das drogas anti-helmínticas pois se encontravam nas pastagens, sendo consideradas como um estoque de larvas não susceptíveis. Parasitos que estão dentro dos animais e não receberam a administração de tratamento anti-helmíntico são, também, uma população de refugia (Costa, 2011). Baseia-se a partir dessa teoria que essa pequena parte de nematoides

não resistentes, não recebam o tratamento, o que permite a existência de abundante parcela da população de parasitos não expostos ao vermífugo (Molento et al., 2013). Essas larvas estarão livres de qualquer pressão de seleção para a resistência e, portanto, podem contribuir para a não propagação dos genes de indivíduos resistentes (Van Wyk 2011). Outra medida também para o controle das nematodioses é o método Famacha, e sua significativa vantagem é a diminuição dos tratamentos aplicados, o que auxilia na redução do desenvolvimento da resistência a anti-helmínticos. Esse método é considerado seletivo, ou seja, objetiva vermifugar somente os animais do rebanho que apresentam anemia, que pode ser observada na mucosa ocular dos ovinos. Cinco graus de coloração, ilustrados em um cartão, direcionam a vermifugação dos animais (Van Wyk et al., 1997; Kaplan et al., 2004; Embrapa, 2007). Contudo, é limitado aqueles helmintos hematófagos tal qual *H. contortus*.

Várias alternativas para o controle alternativo de verminoses também vem sendo estudadas, como: melhoramento genético que oferecem uma opção mais sustentável, identificando variação de regiões do genoma que indicam resistência aos nematoides (Riggio et al., 2013); desenvolvimento de esquemas de reprodução seletiva para resistência ao parasita, caracterizando o quantitativo de traços fenotípicos que são associados geneticamente a resistência a parasitas (Davies et al., 2006); produção de vacinas, avaliando as respostas imunitárias humorais provenientes de produtos de *H. contortus* (Schallig et al., 1994) e outras espécies, identificação de novos fármacos (Kaminsky et al., 2008) e a utilização de organismos como controle biológico (Sinott et al., 2014) principalmente a exploração de fungos nematófagos (Murray et al., 1990; Scholler 1994).

2.3. Medidas utilizando controle biológico

Gonçalves (1996) citou que o controle biológico vem sendo utilizado desde 2200 antes de Cristo onde os egípcios faziam referência a doenças em abelhas e os gregos um pouco depois as doenças do bicho da seda e das abelhas. Um dos exemplares clássicos do uso de controle biológico, que nesse caso foi um inseto em plantas, foi à invasão da pastagem na Austrália por um cacto exótico *Opuntia*, que foi em poucos anos controlado com a introdução da mariposa Argentina *Cactoblatis cactorum* (Krebs et al., 1972). No Brasil já em

1923 se fazia referência ao fungo *Metarhizium anisopliae* como um potencial agente antagonista do *Tomaspis spp.* (Gonçalves et al., 1996). Normalmente, o termo controle biológico refere-se ao controle natural por um antagonista disponível no ambiente (Gronvold et al., 1996) é um fenômeno natural que na ausência da ação humana é algo que ocorre de forma espontânea na natureza, baseia-se na regulação do número de plantas, animais ou microorganismos por organismos naturais, que são os agentes bióticos de mortalidade, envolve o mecanismo no qual uma população é regulada por outra população. Na ausência dos agentes de controle de uma população de um dado organismo esta poderia aumentar de forma indiscriminada, sendo assim, o controle biológico mantém o equilíbrio natural (Bueno et al., 2002; Jackson et al., 2006).

Na prática, o controle biológico geralmente não atua diretamente nos parasitos adultos, em alguns casos sua ação irá ocorrer sobre o estágio intermediário, ou seja, vetores e estágios larvais de vida livre, diminuindo indiretamente a infecção de parasitos através do controle de seus agentes intermediários. Existem algumas características essenciais que os organismos antagonistas devem possuir, como: especificidade de ação, alta capacidade reprodutiva e suportar as condições ambientais no local em que o controle é realizado (Mota et al., 2003). Para que um agente seja selecionado como antagonista, com destinação a controle biológico de âmbito maior, há algumas restrições a serem consideradas, para que haja segurança aos produtores, aos consumidores aos animais tratados e também ao ambiente. Além desses fatores, o antagonista deve ter capacidade para ser produzido o suficiente em escala industrial, os custos relacionados a esta produção devem ser favoráveis, na competitividade com as drogas tradicionais estabelecidas no mercado e no tempo de sobrevivência do organismo em formulações comerciais (Mota et al., 2003; Gronvold et al., 1996). Para a utilização do controle biológico é preciso um estudo minucioso antes que esses organismos antagônicos sejam ministrados no ambiente, pois podem trazer problemas como: a) mesmo sendo bem caracterizado em laboratório, um organismo pode ter propriedades não esperadas no campo, tanto danosas quanto benéficas; b) pode haver a possibilidade de um distúrbio do balanço de ecossistema pela liberação intencional de um organismo; c) a possibilidade de transferência não

intencional de informações genéticas entre organismos, de forma que aqueles originalmente não patógenos se tornariam patógenos (Valicente et al., 2009). Agentes biológicos com atividade nematicida visando a higienização das pastagens, é uma alternativa estudada nas últimas décadas na ovinocultura. Os fungos nematófagos são os microorganismos mais estudados com este objetivo. Nas últimas décadas diversos estudos vêm sendo realizados demonstrando o potencial dos fungos nematófagos no controle dos nematoides gastrointestinais dos animais de produção (Faedo et al., 1997; Larsen, 1999; Silveira et al., 2017; Cai et al., 2017).

2.4. Caracterização dos fungos nematófagos para controle de nematoides em ovinos

Os fungos nematófagos estão catalogados com mais de 700 espécies (Ooij, 2011). que estão distribuídas entre os grupos Ascomycotina, Basidiomycotina e Zygomycotina. Esses fungos vivem no solo utilizando matéria orgânica onde desenvolvem relações parasíticas ou predatórias com os nematoides (Barron et al., 1977). Dado ao modo peculiar de vida, os fungos nematófagos se tornaram alvo de estudos como agentes de controle biológico de nematoides e podem ser considerados efetivos para esse controle pois diminuem o número de L₃ nas pastagens (Silveira et al., 2012).

A forma mais prática de se administrar esses fungos aos animais é pela via oral. Ao passar pelo trato gastrintestinal é esperado que seja eliminado nas fezes para o ambiente, e colonize o bolo fecal, estabelecendo um contato com as larvas infectantes que as leve à morte. O fungo que apresenta uma resistência à passagem pelo trato gastrintestinal, é considerado como promissor para desenvolver com ele uma formulação de via oral que permita o controle biológico (Araújo et al., 1999; Graminha et al., 2005).

Os fungos nematófagos são classificados de acordo com sua ação, e podem ser divididos em quatro grupos: o primeiro grupo são os fungos oportunistas, parasitos de ovos. As hifas penetram a casca do ovo, através dos pequenos poros existentes na camada vitelínica, causando alteração na permeabilidade da casca e expandindo seu volume (Figura 3A). A hifa aumenta de tamanho ao passar pela camada vitelínica e atravessa a camada adjacente quitínica e lipídica. Como consequência do processo, a camada vitelínica se divide, a camada de quitina se torna vacuolizada e a camada de lipídios se

torna dispersa. Hifas endógenas emergem do ovo e produzem conidióforos, funcionando como fonte de conídios. Estes tipos de fungos colonizam o conteúdo do ovo, ou ainda a larva em desenvolvimento (Kunert, J 1992; Padilha, 1996). O segundo grupo, são os endoparasitos, estes apresentam esporos que quando ingeridos pelos nematoides germinam no esôfago (Figura 3B). Os conídios, ao germinarem, dão origem a hifas que parasitam o corpo do nematoide (Barron, 1977; Padilha, 1996). Não produzem hifas vegetativas fora do corpo do hospedeiro, mas hifas férteis ou conidióforos contendo. Os esporos também podem ter ação adesiva, onde o início da infecção se dá pela adesão da hifa na cutícula do nematoide, o esporo germina penetra na cavidade do corpo e produz um talo que absorve o conteúdo corporal do mesmo (Padilha, 1996). O terceiro grupo são os produtores de metabólitos tóxicos, pouco se sabe sobre esses fungos mas estudos sugerem que os metabólitos dos fungos considerados como tóxicos possam afetar a mobilidade e a capacidade de penetração dos nematoides (Khan et al., 1984; Ferraz et al., 1995). O Quarto grupo é classificado para maioria das espécies, são os fungos predadores de nematoides, ou fungos nematófagos estes produzem estruturas em forma de anéis constritores e não constritores, hifas, botões e redes tridimensionais adesivas ao longo do micélio (Figura 3C). O aprisionamento à armadilha é seguido pela penetração das hifas na cutícula do nematóide. Dentro, ocorre o crescimento das hifas e a digestão dos conteúdos internos (Figura 4). As estruturas fúngicas (conídios e clamidósporos) dos fungos passam através do trato gastrointestinal do animal sem sofrer alterações morfológicas, desenvolver e colonizar os bolos fecais e formar armadilhas para capturar o estágio de vida livre como alimento (Barron 1977; Padilha, 1996).

Pesquisas demonstram que a atividade das proteases causam um efeito na interação entre fungo e nematoide, auxiliando na predação, esses dados foram relatados para o gênero *Arthrobotrys* (Tunlid et al., 1991; Zhao et al., 2004), onde evidenciam que as proteases extracelulares foram implicadas na penetração e digestão dos tecidos do hospedeiro por esses fungos parasitas, e na espécie *Duddingtonia flagrans* (Cruz et al., 2015; Braga et al., 2012), que mostram as serino proteases envolvidas no processo de infecção do fungo.

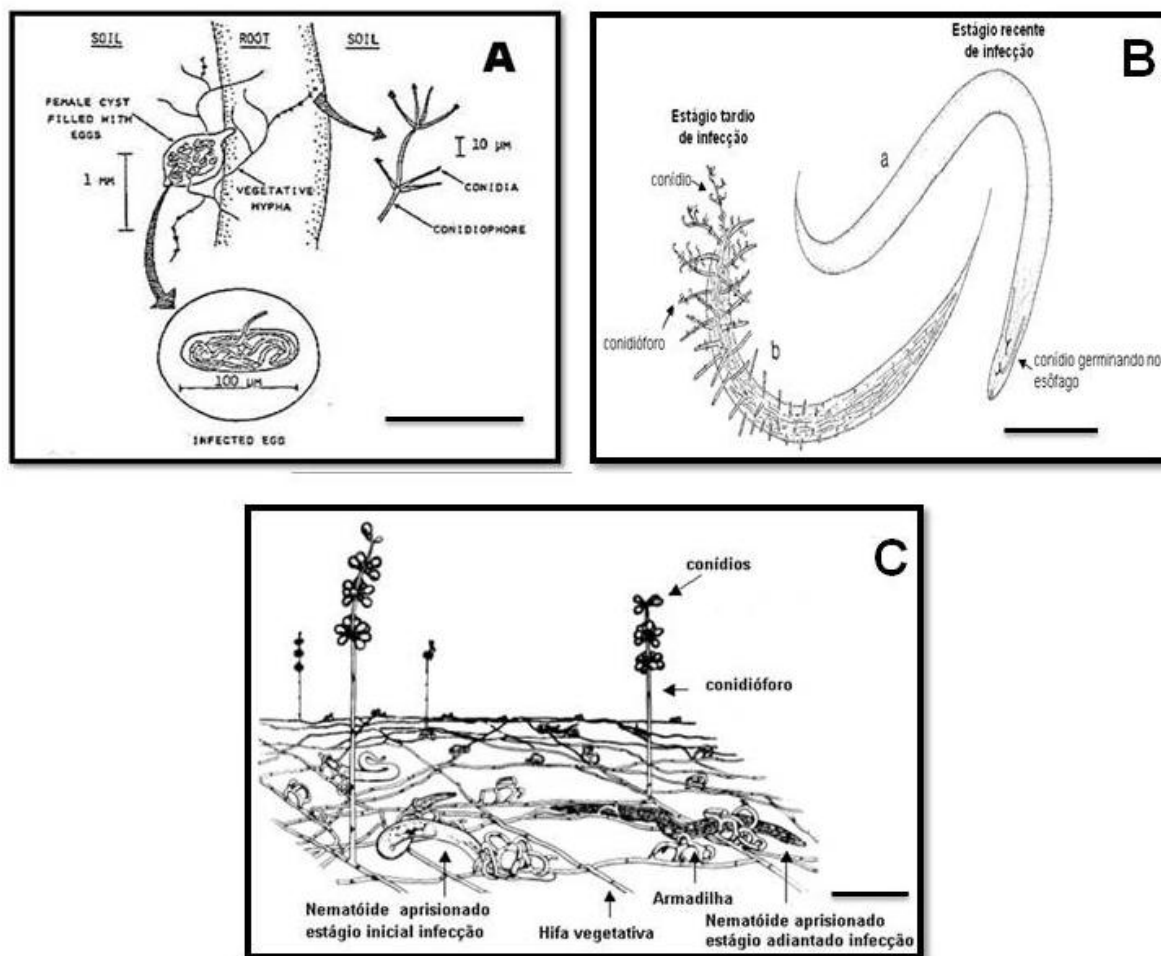


Figura 3: Representação esquemática dos fungos nematófagos. (A) Fungo *ovicida* *Verticillium* parasita de ovos de nematoides. E alguns desses ovos foram infectados pela hifa vegetativa, que penetra a parede cística e em seguida a casca do ovo. É notável também a representação de um conidióforo com seu conídio (Fao, 1998) **(B)** (a) Estágio recente de infecção com conídios germinando no esôfago do nematoide e (b) Estágio tardio de infecção com conidióforos rompendo a cutícula do nematoide (Cruz et al., 2011). **(C)** Fungo nematófago predador *Arthrobotrys oligospora* na superfície de uma placa contendo ágar. A esquerda mostra o estágio inicial de infecção com capturados recentemente pelas armadilhas do fungo. A direita mostra o estágio adiantado de infecção com o nematoide capturado após 24 h de interação. Conidióforos verticais contendo grupos de conídios estão espalhados ao longo do substrato (Barron, 1977; Cruz et al., 2011).

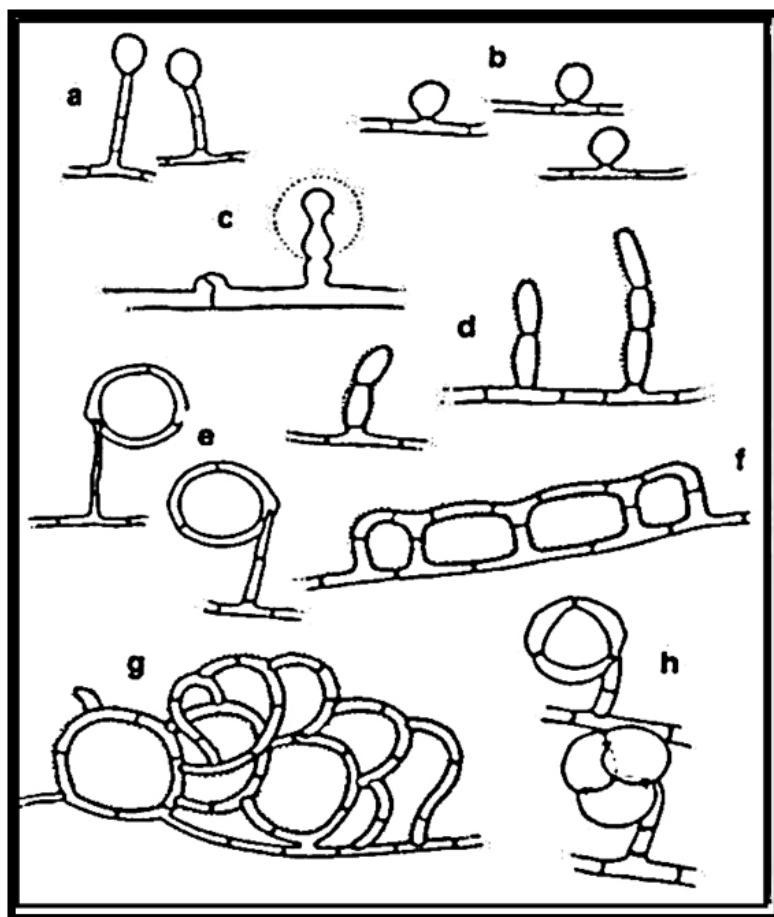


Figura 4: Órgãos de captura de fungos nematófagos predadores: a) botões adesivos pedunculados; b) botões adesivos sésseis; c) botão adesivo; d) hifas adesivas; e) anéis não-constritores; f) hifa adesiva bidimensional; g) hifa adesiva tridimensional; h) anéis constritores. (Adaptado Barron, 1977).

I. *Arthrobotrys* spp.

Os fungos nematófagos do gênero *Arthrobotrys* spp. possuem conidióforos eretos podendo ter em sua extremidade até seis conídios e em grande quantidade (Barron, 1977). Estes fungos são caracterizados por produzir armadilhas ao longo de suas hifas para a captura de nematoides, podendo estas serem do tipo adesivas ou não (Nordbring-hertz, 1989). Após a captura do nematoide, o fungo penetra e se desenvolve no interior do corpo de sua presa que foi previamente aprisionado nas armadilhas e consumindo o seu interior e lançando para o meio externo as suas estruturas vegetativas e reprodutivas, que são os esporos. O gênero *Arthrobotrys* spp. reúne um grande número de espécies de fungos nematófagos. O gênero foi descrito por Corda

em 1839, a partir de esporos e hifas originários de amostras de material orgânico (Ferraz et al., 1995). Todos os isolados do gênero são capazes de produzir armadilhas na presença de nematoides de vida livre. O gênero é classificado como nematofago facultativo (Cooke et al., 1964).

Arthrobotrys oligospora é um dos fungos mais comumente utilizado nos estudos para controle biológico, pois suas características já são encontradas e descritas desde 1852, onde a espécie foi descrita por Fresenius, através de conidióforos dispersos em material orgânico originário de amostras de solo, porém somente em 1888, Zopf descreveu a característica de atividade predatória da espécie (Barron, 1977). Esta espécie captura nematoides através de redes adesivas tridimensionais, produzidas pelas hifas e pelos esporos (Nordbring-hertz, 1988), essas armadilhas são produzidas através de resposta a substâncias difundidas no meio ambiente. Um fornecimento limitado de nutrientes governa a mudança da fase saprófita do fungo para a predadora, especialmente aquelas em que os nematoides estavam presentes como indutor da morfogênese (Saxena et al., 1987).

De acordo com Barron (1977), o fungo nematófago *Arthrobotrys musiformis* (Drechsler, 1937), foi descrito como *Trichothecium musiformis* por Soprunov em 1958, em 1966 Rifai e Cooke caracterizaram o mesmo fungo como *Candelabrella musiformis* e em 1975 como *Dactylella musiformis* por Mats). Posteriormente o gênero *Arthrobotrys* foi revisado por Oorschot (1985) sendo aceita a nomenclatura de *Arthrobotrys Musiformis*. Esta espécie apresenta armadilhas adesivas bidimensionais que se diferenciam em uma única argola semelhante a um laço, os conidióforos são eretos descreveu Drechsler (1937). Monoson (1963) descreveu que o substrato de nematoide estimula a produção de uma substância no fungo predador, fungos que não possuem essa propriedade predatória não produzem a substância. Essas substâncias podem ser orgânicas e inorgânicas como o CO₂ (Barron, 1977) e ácido siálico (Nordbring-Hertz et al. 1989).

II. ***Monacrosporium* spp.**

De acordo com o que foi descrito por Rubner (1996), o gênero *Monacrosporium* foi introduzido por Oudemans em 1885, em 1963 Subramanian, classificou as características do gênero como: hifas septadas, ramificadas, seus conidióforos são eretos, geralmente simples e hialínicos. Os

conídios estão presentes isoladamente na ponta dos conidióforos, são hialinos, com dois ou mais septos transversais, com uma das células (usualmente intermédios) mais larga e maior do que as outras. Existem isolados em diversas regiões do mundo (Liu et al., 1994) inclusive no Brasil (Ribeiro et al., 1999). Trabalhos realizados por diversos pesquisadores demonstram a capacidade predatória de fungos do gênero *Monacrosporium* (Braga et al., 2013; Graminha et al., 2005; Soares et al., 2006; Silva et al., 2017).

O fungo *M. haptotylum* foi descrito pela primeira vez como *Dactylaria haptotyla* por Drechsler em 1950, como *Dactyllela haptotyla* em 1985 por Hoog e Oorschot, e como *M. haptotylum* por Xing e Liu em 1994, e essa é a nomenclatura usada até os dias de hoje (Rubner, 1996). Os fungos pertencentes a essa espécie infectam nematoides usando estruturas unicelulares chamados de botões, que se desenvolvem sobre os ápices dos ramos de hifas. A vantagem da utilização desse fungo é que quando cultivado em cultura líquida, os botões se separam do micélio por meio de filtração, estes botões podem ser isolados e mesmo assim eles conservam sua estrutura de infecção podendo assim “capturar” e infectar nematoides (Ahrén et al., 2005).

O fungo *M. thaumasium*, descrito como *Dactylaria thaumasia* por Drechsler em 1937, *Arthrobotrys thaumasia* em 1977 por Kendr e Pramer. A nomenclatura utilizada nos dias de hoje é *Monacrosporium thaumasium*, que foi descrita por Hoog e van Oorschot em 1985 (Rubner, 1996). A forma de predação de nematoides é através de redes tridimensionais adesivas (Drechsler, 1937). A capacidade de sobrevivência do *Monacrosporium thaumasium* ao passar pelo trato gastrintestinal de ruminantes, sem perder a atividade predatória, é uma de suas principais características no controle biológico das helmintoses (Assis et al., 2013; Braga et al., 2009; Silva, et al., 2013).

2.5. Identificação molecular dos isolados através da caracterização da região do gene ITS do rDNA

A taxonomia, identificação e a diversidade *Orbiliiales*, representada por fungos de captura de nematoides, em estudos anteriores dependiam principalmente dos métodos de avaliação morfológica. Essa observação era feita através de microscopia e na medição de diferentes estruturas fúngicas, isto é, micélios, esporos, conídios, conidióforos, dispositivos de armadilha.

Porém tal classificação exige do pesquisador uma avaliação subjetiva que não têm limites bem definidos, requerem experiência e alta capacidade de discernimento (Ramirez et al., 2016). Infelizmente, tais métodos não são suficientes para determinar a espécie, pois os fungos são instáveis em condições culturais variadas ou mesmo após subculturas repetidas (Liou et al., 1997). Essa característica de variação dos fungos pode ser observada desde quando o mesmo fungo, porém, em localidades e isolados diferentes, recebiam uma nova taxonomia, um exemplo é o fungo *Arthrobotrys musiformis* (Drechsler, 1937), descrito como *Trichothecium musiformis* por Soporunov em 1958, em 1966 Rifai e Cooke *Candelabrella musiformis* e em 1975 como *Dactylella musiformis* por Mats (Hoog et al., 1985). Para que não houvesse dúvidas, mesmo levando em consideração as características morfológicas, há técnicas moleculares, que identificam regiões conservadas no rDNA dos fungos e são complementares as pesquisas morfológicas. (Das et al., 2014). Assim, a classificação dos fungos exige uma reavaliação através do DNA ribossômico na exploração da filogenia e classificação natural dos fungos (Liou et al., 1997).

A abordagem genética do estudo de qualquer organismo exige a utilização de marcadores precisos e facilmente detectáveis. A filogenia fúngica incluem principalmente marcadores nucleares de DNA ribossomal (rDNA), (Hibbett et al., 2007). Uma alternativa para a identificação e diferenciação de espécies de fungos com o uso de PCR, é a utilização de primers específicos para determinadas regiões. As regiões ITS (Internal Transcribed Spacer) do RNA ribossomal são regiões conservadas do DNA capazes de auxiliar no estabelecimento de relações filogenéticas e distinção de espécies. O DNA que codifica para RNA ribossômico apresenta-se como um cluster gênico e aparece diversas vezes no genoma, no qual se tem o gene 18S, o gene 5,8S e o gene 28S. Estes genes são separados por regiões denominadas ITS1 é o primeiro espaço, seguido pelo gene do RNA 5.8 logo em seguida o ITS2, as quais são transcritas e processadas para dar origem ao RNA ribossômico (Figura 4) (Shouche et al., 2015). O ITS (Internal Transcribed Spacer) do rDNA é um marcador popular no nível de espécie em estudos filogenéticos de fungos e plantas (White et al., 1991; Bruns et al., 1991; Schoch et al., 2012), pois as regiões ITS evoluem rapidamente e, então, são apropriadas para discriminar espécies relacionadas ou até mesmo variedades de uma mesma espécie. Por

ser uma região altamente conservada e com alto grau de variabilidade possibilita a distinção ao nível intra e interespecífico de várias espécies de fungos (Coleman et al., 2003).

A identificação taxonômica exata de isolados de fungos nematófagos é o primeiro passo na seleção de possíveis candidatos para avaliar a atividade contra nematoides tanto em laboratório quanto em ensaios de campo. Logo, as ferramentas moleculares são essenciais na identificação de fungos nematófagos. Isso se torna uma ferramenta valiosa para fins biotecnológicos contribuindo com o setor pecuário e agrícola (Liou et al., 1997). Além disso, as relações filogenéticas entre as cepas podem ser comparadas e servirem como objeto de estudo em futuras pesquisas. Portanto, o isolamento e a caracterização de cepas de fungos nativos *Arthrobotrys* e *Monacrosporium* além de suas características de crescimento e a atividade predatória *in vitro* e *in vivo* são essenciais para seleção de estirpes de fungos para o controle biológico de nematoides gastrointestinais parasitas em ruminantes.

3. Objetivo

3.1. Geral:

- Determinar características morfológicas dos isolados dos fungos dos gêneros *Arthrobotrys spp.* e *Monacrosporium spp.*, como a velocidade do crescimento dos isolados em meio nutritivo, atividade predatória *in vitro* e a passagem dos clamidósporos desses isolados obtidos, pelo trato gastrointestinal de ovinos. Além de confirmar os parâmetros moleculares através da caracterização da região ITS do rDNA

3.2. Específico:

- Avaliar o crescimento radial de cada isolado fúngico;
- Avaliar a atividade predatória *in vitro* em diferentes concentrações de esporos dos isolados;
- Avaliar a Passagem dos clamidósporos pelo trato gastrointestinal de ovinos da raça Santa Inês oriundos de uma fazenda, localizada em Gargaú - São Francisco de Itabapoana, Rio de Janeiro;
- Amplificar e analisar as região ITS do rDNA dos fungos *Arthrobotrys oligospora*, *Arthrobotrys musiformis*, *Monacrosporium thaumasium* e *Monacrosporium haptotylum* como confirmação da técnica morfológica;
- Comparar as sequências obtidas com sequências depositadas no banco de dados (NCBI) utilizando o algoritmo BLAST;

4. Material e métodos

4.1. Manutenção e cultivo dos fungos Nematófagos

Foram utilizados os fungos *A. musiformis*, *A. oligospora*, *M. thaumasium*, *M. haptotylum*, oriundos da Estação Ecológica Estadual de Guaxindiba, que fica situada no distrito de Guaxindiba na cidade de São Francisco de Itabapoana. Estes fungos foram isolados previamente por Costa (2012) e preservados no laboratório em placas de Petri ou tubos de ensaio sob refrigeração a -70°C ou 4°C . Periodicamente eles eram reativados e repicados em meios a base de agar e nematoides a fim de estimular o crescimento, a esporulação e manutenção das atividades biológicas dos fungos nematófagos e novamente refrigerados.

4.2. Manutenção e cultivo dos nematoides de vida livre *Panagrellus spp.*

Foram utilizados nematoides de vida livre *Panagrellus spp.*, mantidos em placas de *Petri* contendo meio de aveia em flocos amassada e umedecidas com água destilada (Anexo 3) (Heintz et al., 1978). Esses nematoides foram extraídos do meio de cultura após serem invertidos do Erlenmeyer para a placa de *Petri*, onde ficam imersos sobre a placa. Em seguida estes foram lavados (quatro vezes), com água destilada, e recuperados após centrifugação a 2400 rpm por 5 min. A cada centrifugação era desprezado o sobrenadante. Esses nematoides foram utilizados como modelo biológico para estimular atividade predatória do fungo e produção de esporos. A manutenção do nematoide foi feita a cada 15 dias e consiste no repique do mesmo para um novo meio de ágar aveia.

4.3. Determinação do crescimento radial dos fungos nematófagos isolados

A identificação das características morfológicas macroscópicas e determinação do crescimento radial de cada fungo filamentoso isolado, foram realizadas pela inoculação de um repique de aproximadamente 1cm^2 no centro de placas de *Petri* contendo 20 ml de meio de cultura sólido sabouraud (Anexo 2) as placas foram mantidas em BOD a $25^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, (V. SIDRIM, JJC et al., 2004). As fotos para a macroscopia foram realizadas com câmara digital CANON- IXUS.

4.4. Avaliação da atividade predatória *in vitro* e *in vivo* dos isolados de *Arthrobotrys* spp.

4.4.1. Cultivo dos fungos

Foram feitos cinco repiques por *plug* de 1cm² dos isolados no meio de cultura Agar/ milho (Anexo 4) em garrafas de Roux contendo 107g milho triturado (canjiquinha) (Anexo 5) esterilizado em 43ml de água destilada como o meio de crescimento, com uma temperatura de 25 °C ±3 na ausência de luz por 15 a 21 dias. Após o crescimento do fungo no meio o material foi retirado das garrafas sendo acondicionado em camadas finas em caixas plásticas para secagem em estufa a 32°C. Posteriormente, o meio seco foi homogeneizado e realizado uma maceração numa amostragem de 10 g para 100 ml de água destilada. A suspensão foi filtrada em uma peneira com malha fina de abertura de 100 micras. Uma alíquota foi retirada para contagem na câmara de Neubauer, para obtenção do número de esporos por mL e a correlação entre o volume utilizado e o peso, para obtenção da quantidade de clamidósporos por grama (Cruz et al., 2009).

4.4.2. Avaliação da atividade predatória *in vitro* dos isolados *Arthrobotrys* spp. em diferentes concentrações de esporos

A avaliação da atividade predatória foi feita com base no quantitativo de L₃ recuperadas nas coproculturas. Para a obtenção das L₃ foi utilizado o método de Roberts and O'Sullivan (1950) modificado. Para isto, os esporos dos fungos *Arthrobotrys* spp. foram inseridos em coproculturas, onde 4g de fezes foram pesadas em copos de 50ml. Foram utilizadas no tratamento as seguintes concentrações de canjiquinha onde cada grama continha 200 mil esporos: 0,5g (100.000 esporos), 1,0g(200.000 esporos), 1,5g(300.000 esporos) e 2,0g(400.000 esporos). O controle foi apenas canjiquinha sem adição de esporos. Para cada tratamento e controle foram feitas 10 repetições. As coproculturas foram incubadas por sete dias em um recipiente coberto com uma vedação plástica contendo furos que permitem a entrada de ar suficiente para o desenvolvimento das larvas, além de 100 ml de água destilada no fundo do recipiente que é para manter a umidade do local (Figura 5A). Estas foram incubadas por sete dias. Após a incubação, esses copos foram preenchidos com água destilada e vertidos sobre estes uma placa de *Petri*. A placa e o copo

foram invertidos e adicionado 10 ml de água na placa, dessa forma as L₃ por hidrotropismo migram das fezes para a água (Figura 5B). Após 4 horas, as larvas foram pipetadas e armazenadas em garrafas de cultura a 4°C até a quantificação. A contagem das larvas recuperadas foi feita em lâminas com auxílio de microscopia ótica.

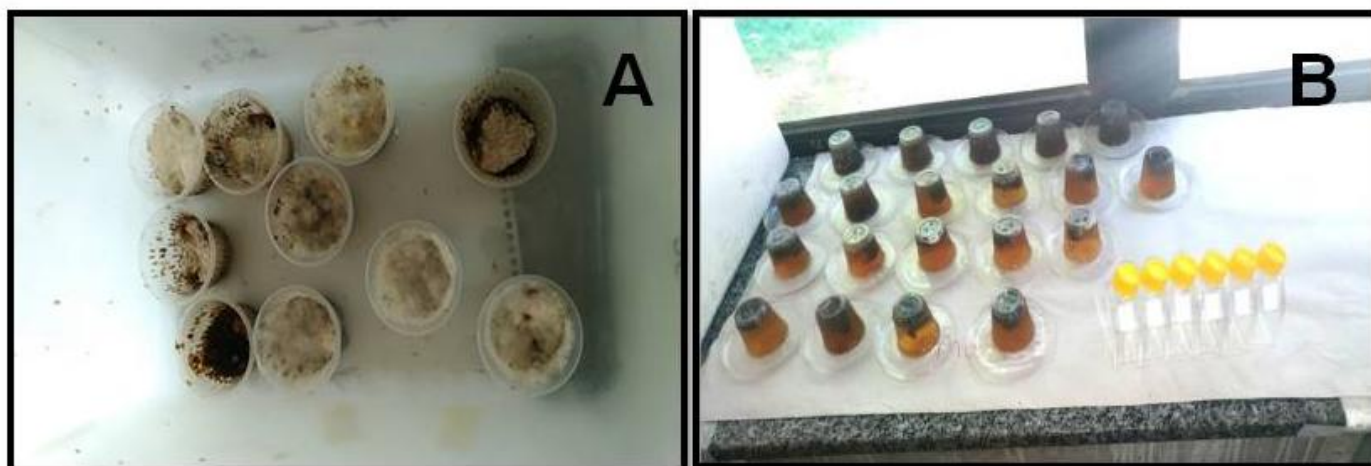


Figura 5 coprocultura incubada dos tratamentos *in vitro*: (A) As coproculturas dos tratamentos foram incubadas por sete dias para a contagem da atividade predatória.(B) Coprocultura dos tratamentos *in vitro* vertidas após sete dias: As coproculturas dos tratamentos foram retiradas após sete dias e vertidas em placas de *Petri* contendo 10ml de água destilada onde as larvas migram para posterior contagem.

4.4.3. Administração dos fungos e colheita das fezes

A coleta das fezes para posterior análise da contagem de ovos por grama de fezes (OPG) e coprocultura, foram feitas durante 5 dias, onde no terceiro dia os fungos foram administrados oralmente aos ovinos por via da ração contendo 200 mil esporos/grama de fezes, foram 6 animais para cada fungo. As fezes foram coletadas direto da ampola retal 4 vezes ao dia em um intervalo de 3 em 3 horas. Com as fezes foram feitas coproculturas como previamente descritas para recuperação das L₃ e determinar a sobrevivência e a eficácia dos isolados. A determinação da contagem de ovos por grama (OPG) foi feita de acordo com Gordon e Whitlock (1939).

4.5. Identificação molecular dos fungos nematófagos isolados

4.5.1. Extração do DNA por um Kit comercial

A extração foi feita de acordo com o kit de extração comercial Wizard Genomic DNA purification (Pinho et al., 2012). As hifas foram retiradas do meio, onde os fungos estavam inoculados em placas com aproximadamente 10ml de ágar/ sabouround (Anexo 2), com o auxílio de palitos autoclavados, esse processo foi feito dentro do fluxo para a não contaminação do material. Logo após essas hifas foram maceradas com o auxílio de um pistilo e um eppendorf que estava resfriado através do nitrogênio líquido em contato com a parte externa do mesmo. Foram adicionados 100µl de Nuclei Lysis Solution e aproximadamente 100 mg de PVP (polivinilpirrolidona), dando assim continuidade a maceração. Posteriormente foi adicionado 500µl de Nuclei Lysis Solution e homogeneizado em vortex por 15 seg. Em seguida, a amostra ficou 5 min no freezer à -20°C, após esse tempo foi adicionado 200µl de Protein Precipitation Solution e homogeneizado em vortex por 20s em 3000rpm. O precipitado formado foi removido e o sobrenadante contendo DNA foi transferido para um novo eppendorf contendo 600µl de isopropil resfriado. Essa solução foi misturada por aproximadamente 5 min e depois incubada por 20 min à -20°C. Após esse período foi centrifugado por 5 min a 14000 rpm para a formação de um precipitado. O sobrenadante foi removido cuidadosamente e ao precipitado foi adicionado 600µl de etanol 70% resfriado e centrifugado a 14000 rpm por 5 min. O etanol foi removido, os tubos foram deixados em posição horizontal para a secagem do etanol por aproximadamente 15 min. Após esse período foi adicionado 75µl de DNA Rehydration Solution e 3 µl de RNA solution verter por aproximadamente 2 min e incubado a 37°C por 15 min. Após a extração, o DNA foi armazenado a -20 °C.

4.5.2. Amplificação dos produtos da sequências de ITS

O DNA dos fungos foi caracterizado por sequenciamento do rDNA 5,8S assim como os ITS1 e ITS2 com os primers universais ITS1 (50-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-30) e ITS4 (50-TCCTCCGCTTATTGATATGC-30) (White et al., 1990). A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada num volume final de 25µl contendo: 3µl de molde de DNA, 2µl de 5pM para cada primer, 0,5µl de 2,5 mM de dNTPs, 0.25µl de Taq DNA polimerase e 1,5µl

tampão de PCR (10X) e 13,5 µl de de água deionizada estéril. As condições de reação foram as seguintes: 94°C durante min para desnaturação inicial, seguido por 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 52°C e 1 min a 72°C, com uma extensão final a 72°C durante 10 min (Liu et al., 2015).

4.5.3. Análise do DNA purificado e da amplificação da região ITS

A qualidade da extração do DNA genômico foi verificada por meio da eletroforese em gel de agarose 1 % em tampão TAE (1X). Essa mistura foi dissolvida em forno micro-ondas e posteriormente resfriada para aplicação dos DNAs. Uma alíquota de 1µL de cada amostra de DNA foi misturada a 3µL de gel red e 3µL de blue Juice e aplicados ao gel de eletroforese em tampão TAE (1X). A corrida de eletroforese foi realizada a 10V por 1h. Em seguida, o gel foi visualizado sob luz ultravioleta em foto documentado. Foi utilizado o padrão Kasvi DNA Ladder, RTU modelo K9-100 L.

4.5.4. Purificação da Reação para Sequenciamento

Os produtos amplificados foram purificados utilizando o sistema comercial de purificação Agencourt AMPure XP (Ambion Magnetic Stand-96), seguindo as recomendações do fabricante. Foi adicionado cuidadosamente 36 µL do reagente AMPure em cada poço da placa contendo 20 µL dos produtos de PCR de cada fungo. As amostras foram incubadas por 5 min à temperatura ambiente. A placa com a reação foi colocada sobre a placa magnética (Agencourt SPRIPlate 96) durante 2 min. Em seguida, a solução foi retirada da placa e descartada. Alíquotas de 200 µL de etanol 70% foram adicionados em cada poço e incubados durante 30s à temperatura ambiente. Logo após, o etanol foi descartado e o processo repetido por 2 vezes. Essas etapas foram realizadas com a placa de reação sobre a placa magnética. Em seguida, foram adicionados 40 µL de tampão Tris-acetato pH 8,0 em cada poço da placa de reação, ficando por 1 min sobre a placa magnética. As amostras purificadas foram transferidas para uma nova placa para realização do sequenciamento.

4.5.5. Sequenciamento e análise filogenética

As amostras foram enviadas para sequenciamento no Laboratório de Agrobiologia da EMBRAPA. As sequências obtidas foram comparadas com sequências depositadas no banco de dados (NCBI) utilizando o algoritmo

BLAST. A análise foi conduzida com sequencias importadas para o programa MEGA e alinhadas utilizando o programa Clustal W. A árvore filogenética foi montado utilizando o algoritmo Neighbor-Joining (NJ), (Saitou e Nei, 1987), utilizando o programa MEGA 7(Kumar et al.,2016). Os valores de suporte foram baseados com bootstrap de 1000 replicações.

4.6. Análise estatística

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Foi utilizado teste t - student foi feito para comparar as médias, sendo considerado o nível de significância $p < 0,05$. As análises foram obtidas com o auxílio do programa GraphPad Prism 5.0.

5. Resultados

5.1. Avaliação macroscópica da colônia

Os isolados de *Arthrobotrys* spp. apresentaram relevo apiculado, bordas de crescimento com a morfologia bem delimitada, aparência algodonosa e coloração esbranquiçada (Figura 6A – E). *Arthrobotrys musiformis* no 8º dia demonstrou relevo irregular contendo ondas de crescimento (Figura 6B) que foram ampliadas no dia 10 (Figura 6C). Já *A. oligospora* demonstrou um padrão de relevo regular ao longo dos 10 dias de observação (Figura 6D-E).

Os isolados de *Monacrosporium* spp. também apresentaram relevo apiculado, bordas de crescimento com a morfologia bem delimitada e aparência algodonosa. Ondas de crescimento do micélio semelhante à observada em *A. musiformis* foram observadas em *M. thaumasium* no 4º dia. Tais ondas tinham um contorno bem definido acentuando a irregularidade do relevo micelial. Este isolado manteve um padrão de coloração esbranquiçada. *Monacrosporium haptotylum* apresentou coloração esbranquiçada e relevo regular até o dia 8. No décimo dia, o centro da colônia apresentava um colorido levemente acastanhado e uma irregularidade no relevo.

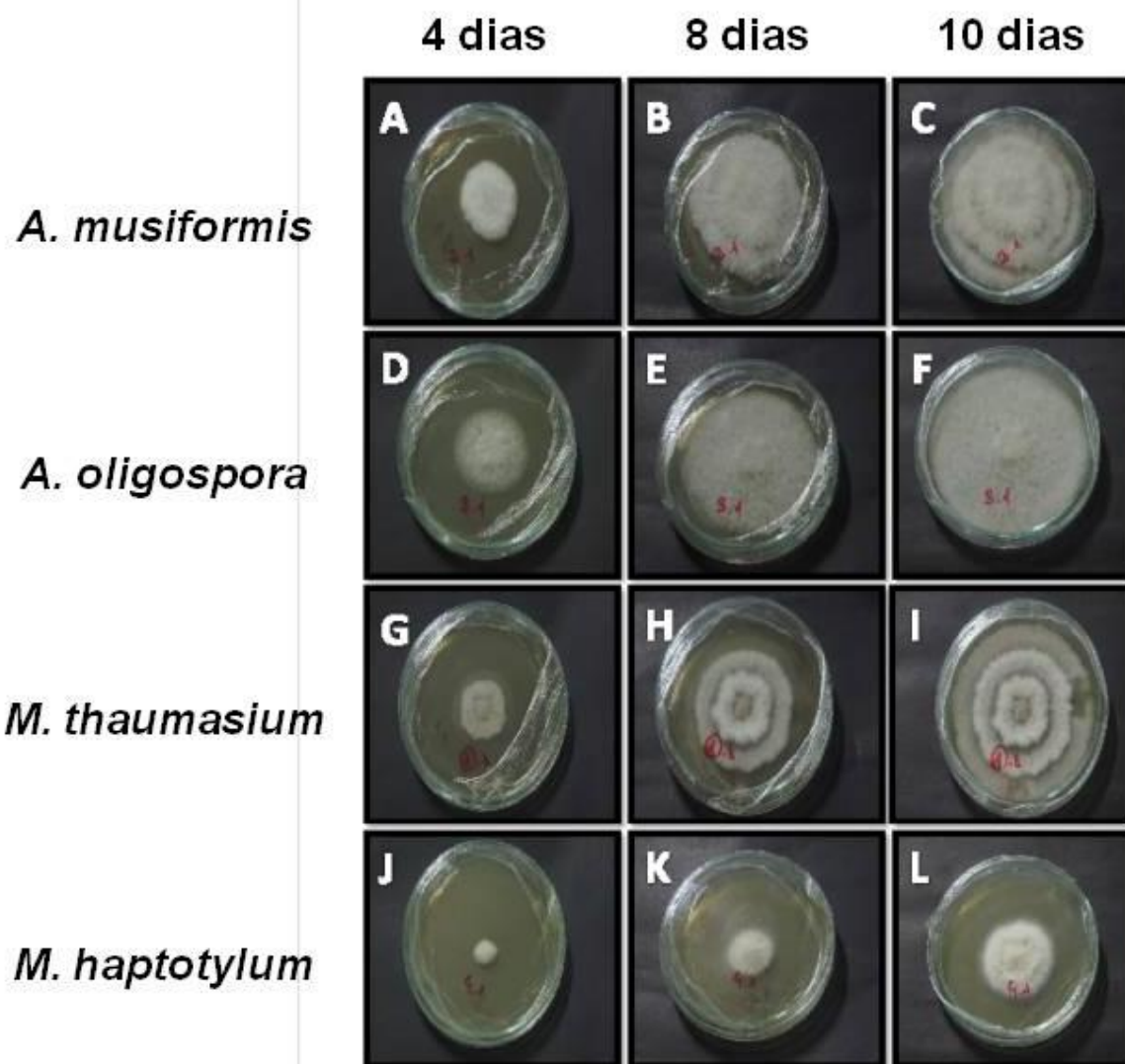


Figura 6: Crescimento de fungos nematófagos em Agar Sabouraud durante 10 dias de avaliação. A, B e C: *A. musiformis*; D, E e F: *A. oligospora*; G, H e I: *M. thaumasium*; J, K e L: *M. haptotylum*, respectivamente com 4, 8 e 10 dias de cultivo.

5.2. Avaliação do crescimento radial do micélio

O crescimento radial do micélio dos isolados *M. thaumasium* e do gênero *Arthrobotrys* spp. quando comparados não apresentaram diferença significativa ($p > 0.05$). Porém, *M. haptotylum* apresentou tamanho significativamente menor quando comparado com os demais isolados fúngicos avaliados (Figura 7). Ao final do décimo dia de cultivo *M. haptotylum* apresentou um crescimento radial médio de 1,7 cm, enquanto os outros fungos atingiram uma média de 4,0 cm crescendo praticamente até o bordo da placa.

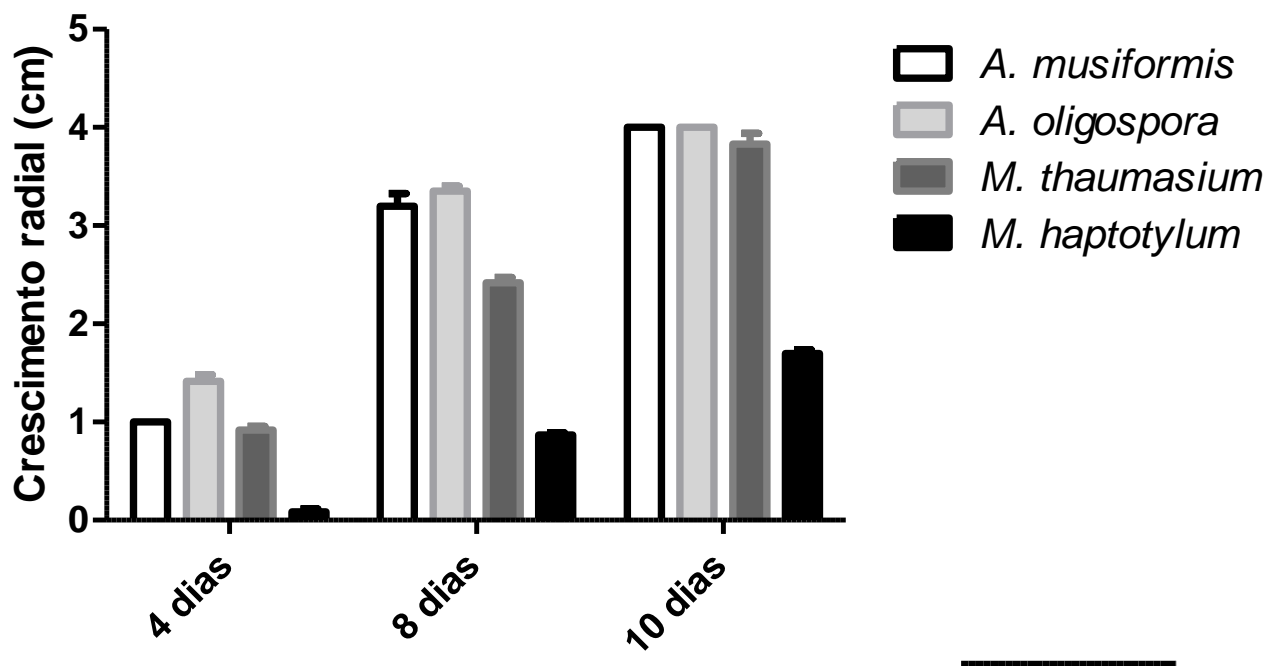


Figura 7 - Avaliação do crescimento radial de fungos nematófagos: Gêneros *Arthrobotrys* spp. e *Monacrosporium* spp. durante 10 dias de cultivo em meio Agar Sabouraud. ($p < 0,001$).

O crescimento radial do micélio dos isolados *M. thaumasium* e do gênero *Arthrobotrys* spp. quando comparados não apresentam diferença significativa ($p > 0,05$). Porém o fungo *M. haptotylum* apresentou tamanho significativamente menor quando comparado com os demais isolados avaliados (Figura 7). Ao final do décimo dia de cultivo *M. haptotylum* apresentou um crescimento radial médio de 1,7 cm, enquanto os outros fungos atingiram uma média de 4,0 cm crescendo praticamente até o bordo da placa. Essa característica macroscópica foi confirmada a partir do teste ANOVA ($p < 0,001$).

5.3. Avaliação da atividade predatória *in vitro* em diferentes concentrações de esporos dos fungos do gênero *Arthrobotrys* spp.

Houve redução significativa do número de L₃ nas coproculturas cultivadas com os isolados de *A. musiformis* e *A. oligospora* em todas as concentrações ao se comparar com os cultivos controles. *A. oligospora*, apresentou uma redução de larvas proporcional à concentração de esporos sendo estas de 63,6%, 85,5%, 91% e 97,7% respectivamente nas concentrações de 100.000, 200.000, 300.000 e 400.000 esporos por gramas de fezes. Enquanto, em *A. musiformis*, para as mesmas concentrações a redução foi respectivamente de 61%, 78,7%, 80,5% e 78,7%. Não houve diferença significativa entre os fungos e as concentrações (Figura 8).

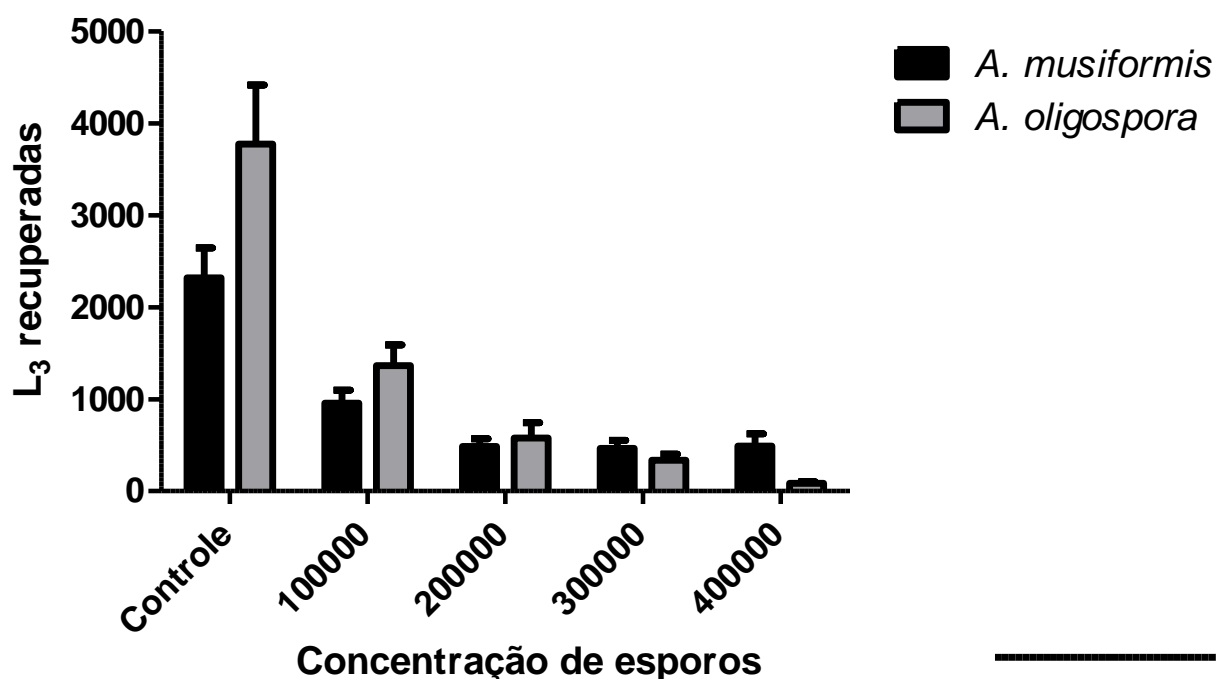


Figura 8: Atividade predatória *in vitro* dos fungos nematófagos dos gêneros *Arthrobotrys* spp em diferentes concentrações de substrato contendo os esporos: Número de larvas recuperadas com diferentes concentrações de esporo por grama de fezes. Comparação entre as duas espécies com significância a partir do teste ANOVA ($p < 0,001$).

5.4. Avaliação da passagem de fungos nematófagos do gênero *Arthrobotrys spp* pelo trato gastrointestinal de ovinos.

5.4.1. Resultados de OPG diário de ovinos tratados com *A. musiformis*

A média diária do OPG das ovelhas variou de 150 a 3550.

Tabela 1: Número de ovos por grama de fezes (OPG) obtido de ovinos tratados com o fungo *A. musiformis*: Amostras coletadas durante o dia das ovelhas que foram utilizadas no tratamento com *A. musiformis*, onde o tratamento teve início no dia 3.

	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5
Animal	Pré- administração	Administração	Administração	Pós - administração	
1	150	250	150	250	150
2	1500	450	450	1500	600
3	5350	2650	1750	3550	1850
4	700	900	600	1050	1350
5	2250	1000	350	600	600
6	1450	1150	650	550	650

5.4.2. Passagem do fungo *A. musiformis* pelo trato gastrointestinal de ovinos

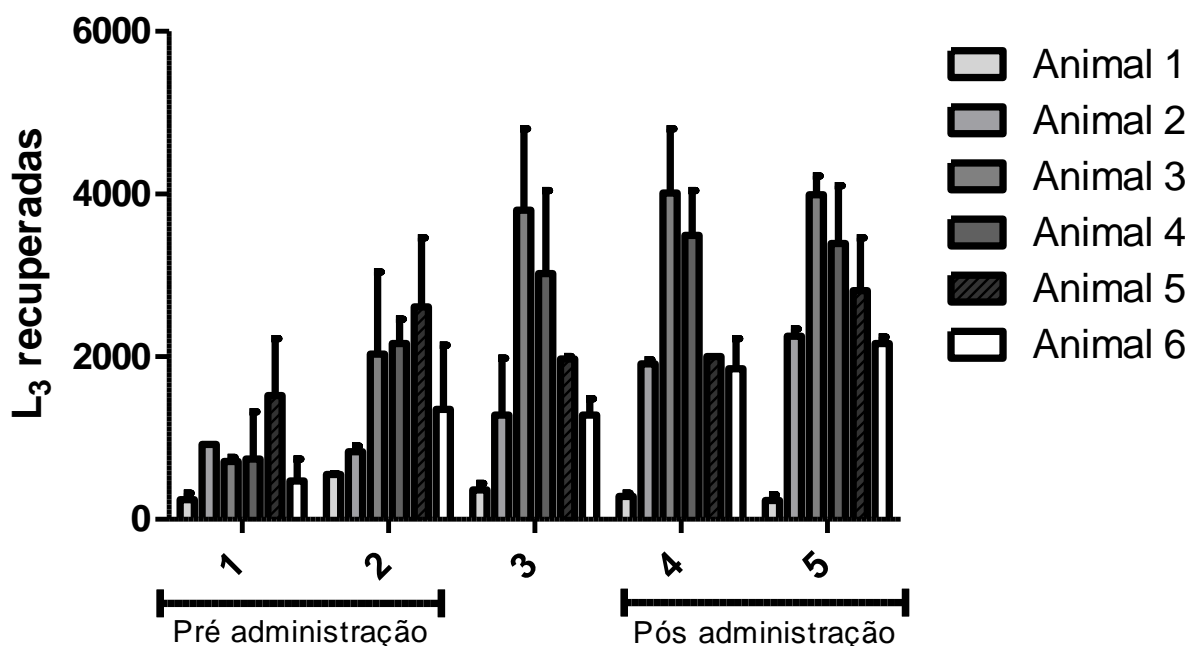


Figura 9: Número de larvas recuperadas antes, durante e depois (1 – 5) da administração da ração (3) contendo esporos fúngicos do isolado de *A. musiformis*. Larvas recuperadas das coletas diárias. A contagem foi a partir de 3 alíquotas feitas de 0,05ml da amostra de 10 ml.

Os resultados demonstram que o fungo *A. musiformis* não apresentou atividade predatória após passagem pelo trato gastrointestinal dos ovinos. Os testes ANOVA não foram significativos ($p > 0.05$). Ainda é possível observar um aumento no número de larvas recuperadas pela coprocultura, que é uma atividade normal levando em consideração que os animais vivem em pasto e há uma ciclagem das formas infectantes dos nematoides, dando assim continuidade ao ciclo e evidenciando que a atividade não foi promissora.

5.3.2. Resultados de OPG diário tratadas com *A. oligospora*

A média diária do OPG das ovelhas variou de 0 a 7400.

Tabela 2: Número de ovos por grama de fezes (OPG) obtido de ovinos tratados com o fungo *A. oligospora*: Amostras coletadas durante o dia das ovelhas que foram utilizadas no tratamento com *A. oligospora* onde o tratamento teve início no dia 3.

	Dia 1 Pré administração	Dia 2 pré administração	Dia 3 administração	Dia 4 pós administração	Dia 5 pós administração
Animal 7	650	450	2500	100	500
Animal 8	4400	3700	2600	5550	3100
Animal 9	0	0	0	0	0
Animal 10	6350	3000	4950	2950	3500
Animal 11	8400	2200	7400	3950	2300
Animal 12	1450	1000	850	400	200

5.3.3. Passagem do fungo *A. oligospora* pelo trato gastrointestinal.

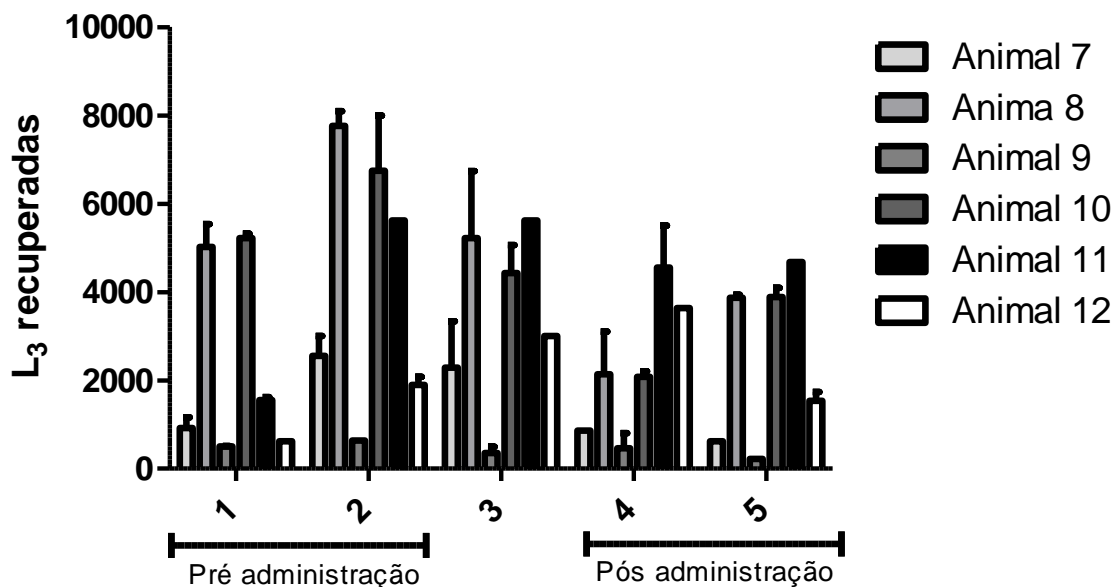


Figura 10: Número de larvas recuperadas antes, durante e depois (Dia 1 - 5) da administração da ração (Dia 3) contendo esporos fúngicos do isolado de *A. oligospora*. (A) larvas recuperadas das coletas diárias. A contagem foi a partir de 3 alíquotas feitas de 0,05ml da amostras.

As análises estatísticas foram feitas através do teste Tukey. É possível observar diminuição do número de larvas a partir do dia 4. As ovelhas 7 e 9 não houveram diferença significativa, enquanto as ovelhas 8,10,11 e 12, tiveram uma diminuição do número de larvas, quando comparadas ao dia 3. No dia 5, ainda é observado diminuição das larvas predadas. É observável diminuição do número de larvas na ovelha 8 a partir do dia 3, ou seja, no dia do tratamento. Os dias que antecederam apresentaram número elevado de larvas como o esperado. No dia 4 as ovelhas 7 e 8 apresentaram diminuição significativa do número de larvas, enquanto as ovelhas 9 e 10, apresentaram diminuição mas não foi significativo. Por fim, no dia 5, a ovelha 7 continuou diminuindo, enquanto as ovelhas 10,11 e 12 já voltaram a apresentar elevação do número de larvas.

5.3.4. Sequenciamento e análise filogenéticas dos fungos dos gêneros *Arthrotrrys* spp. e *Monacrosporium* spp.

O DNA foi satisfatoriamente extraído das quatro espécies, *A. oligospora*, *A. musiformis*, *M. thaumasium*, *M. haptotylum*. As sequencias de ITS completo

foram amplificadas (Figura 11) e sequenciadas. Foram obtidas sequencias de ITS completo para as espécies *M. thaumasium* e *M. haptotylum* de 618 nucleotídeos para *M. thaumasium* e 537 nucleotídeos para *M. haptotylum*. Essas sequencias serão futuramente depositadas no GenBank.

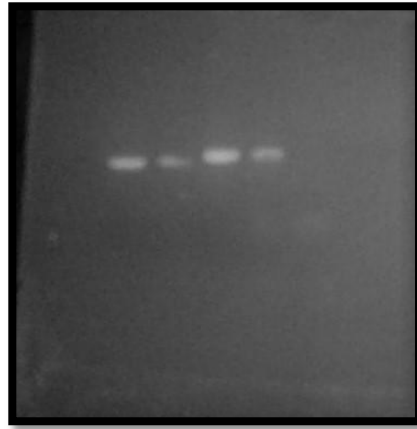


Figura 11: Gel da amplificação da região ITS dos fungos nematófagos dos gêneros *Arthrobotrys spp.* e *Monacrosporium spp.*: (1) *A. musiformis*; (2) *M. thaumasium*; (3) *A. oligospora*; (4) *M. haptotylum*.

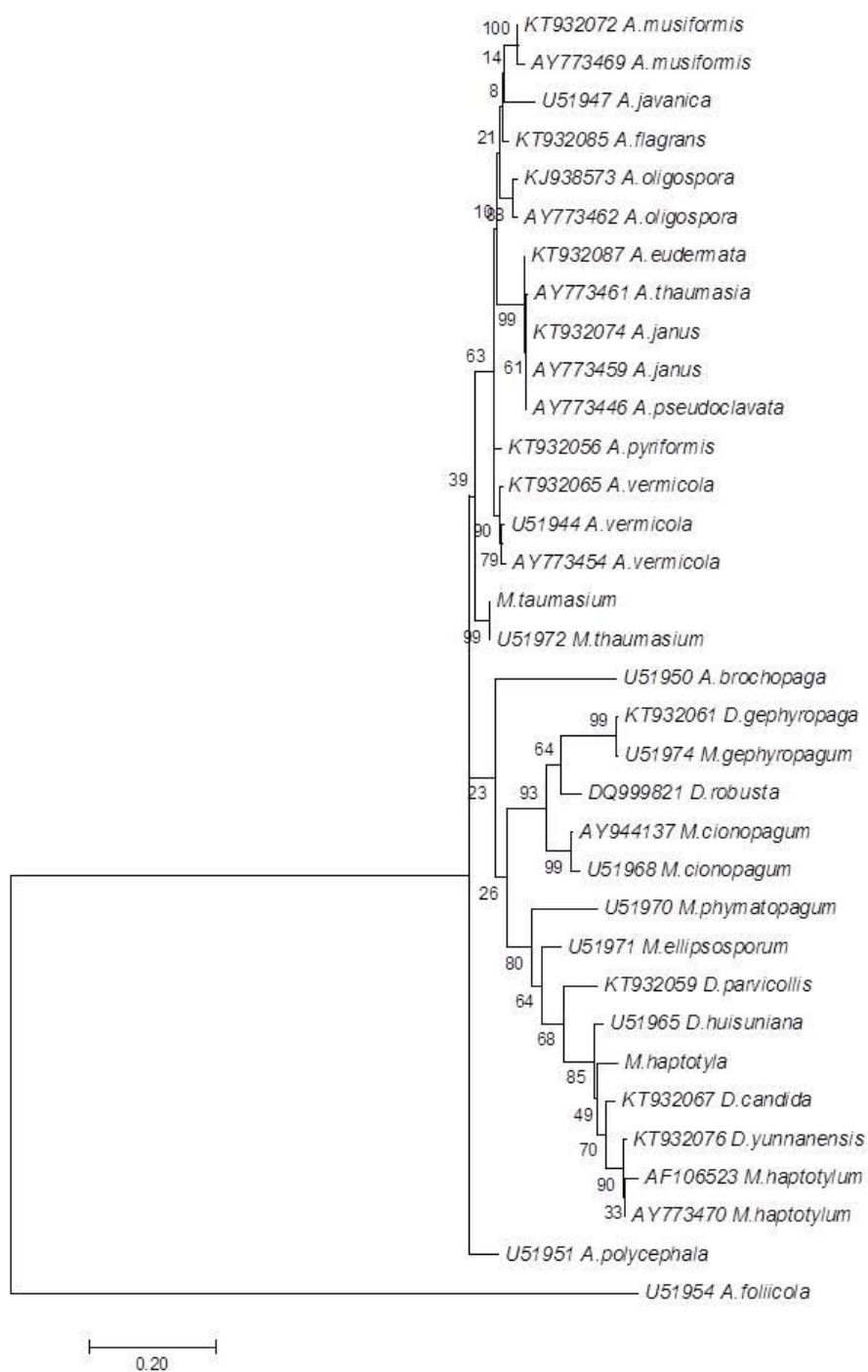


Figura 12: Análise filogenética baseada nas sequências de RNA ribossomal ITS. A árvore filogenética foi construída com o método Neighbor-Joining (NJ) com teste de bootstrap de 1000 replicatas. Além das sequências obtidas, foram usadas 27 sequências do NCBI.

6. Discussão

No presente trabalho foram avaliadas características morfológicas macroscópicas onde os fungos do gênero *Arthrobotrys spp.* apresentaram velocidade rápida de crescimento, com relevo apiculado, bordas com a morfologia bem delimitada, textura algodonosa e não apresentaram nenhuma coloração tanto nas hifas quanto nos esporos. *M. thaumasium* apresentou as mesmas características dos fungos do gênero *Arthrobotrys spp.*, enquanto para *M. haptotylum* foi possível observar uma desregularidade no relevo, observável a partir do décimo dia de cultivo. Apesar de serem do mesmo gênero, as espécies *M. thaumasium* e *M. haptotylum* apresentam características macroscópicas distintas. Em um experimento que avaliou o crescimento e a esporulação dos fungos nematófagos do gênero *Arthrobotrys spp.* em diferentes meios de cultura, foi observado que todos os fungos avaliados em meios químera de arroz, bagaços de cana, casca de café, BDA e fubá – Agar, na temperatura de 25°C cresceram e desenvolveram bem seus micélios (Dias et al. 1993). Esse estudo sugere que em meios nutritivos os fungos possuem um bom desenvolvimento micelial, o que pode ser observado também com os isolados de *Arthrobotrys spp.* e *Monacrosporium spp.* da atual pesquisa

Durante a atividade predatória *in vitro* os fungos nematófagos do gênero *Arthrobotrys spp.*, apresentaram eficiência significativa comparável. Levando em consideração essas características, estudos feitos com finalidade de estabelecer as concentrações eficientes de predação dos isolados, são importantes, inclusive para pesquisas futuras a fim de avaliar a atividade predatória de outros fungos nematófagos incluindo isolados de *Monacrosporium spp.*

Assim como atividade predatória *in vivo* dos fungos do gênero *Arthrobotrys spp.*, a passagem pelo trato gastrointestinal também é um fator importante a ser analisado. Em ensaios *in vivo*, Braga et al. (2007), demonstraram que o fungo *M. thaumasium* peletizado em doses semanais apresentou eficácia no controle de nematodioses gastrointestinais em ovinos. Waller et al. (1994), demonstrou que conídios de *Arthrobotrys oligospora*, *A. oviformis* e *Geniculifera eudermata* sobreviveram à passagem pelo trato gastrointestinal de ovinos *in vitro*. No presente trabalho o isolado de *A. musiformis* não apresentou capacidade predativa após passagem pelo trato

gastrointestinal. Já o isolado *A. oligospora*, apresentou atividade predatória, essa característica pode ser confirmada em outros isolados de *A. oligospora* estudos (Larsen et al., 1999; Wang et al., 2017;). O tempo médio gasto na passagem dos conídios através do sistema digestivo dos bovinos após a administração oral é de cerca de 24 h (Waller et al. 1994) em Araújo et al., (1999) esse tempo variou de 15 a 110 h após a administração oral de fungos em bezerros, com maior isolamento principalmente às 15 h. No presente estudo, a atividade pode ser observada após 5h da administração oral da ração aos ovinos. Graminha et al., (2005) demonstraram em teste *in vivo* que um isolado de *A. musiformis* administrado em concentrações de 2×10^6 predou 73,7% das larvas, . É possível que em concentrações maiores de esporos por grama de canjiquinha o isolado de *A. musiformis* avaliado apresente alguma atividade predatória mensurável. Entretanto, independe desta suposição, já é possível sugerir que o isolado de *A. oligospora* é o mais promissor pois, foi reduziu as L3 na concentração de esporos analisada..

Com o alinhamento da árvore onde mostrou a formação de um grupo taxonomico distinto para as sequencias de *Arthrobotrys spp.* e outro grupo taxonomico para *Monacrosporium spp.*, corroboram com as informações obtidas por Li et al., (2016). Em seu trabalho ele demonstra análise filogenética dos genes relacionados à adesão Mad1 que revela uma seleção positiva para a evolução dos dispositivos de captura de nematoides, nesse caso , as árvores filogenéticas baseadas nos fragmentos de ITS mostram topologias semelhantes com as árvores filogenéticas de Mad1. Mesmo a sequencia de *M. thaumasium* tendo formado um grupo taxonomico com a sequencia do *M. thaumasium* do GenBank, seu clado ficou próximo ao clado formado pelos *Arthrobotrys spp.*. Já a sequencia obtida de *M. haptotylum* agrupou no clado dos *Monacrosporium spp.* Esse dado molecular é semelhante as características morfológicas do *M. thaumasium* de se assemelhar com o gênero *Arthrobotrys spp.*, porém não suficiente para classificá-lo. Sendo assim, esse estudo sugere que novas análises sejam feitas no âmbito molecular para melhor descrever as características dos fungos nematófagos estudados.

7. Conclusão

Os fungos do gênero *Arthrobotrys* spp. possuem características macroscópicas semelhantes e a velocidade de crescimento micelial de ambos é de forma rápida. Porém os fungos do gênero *Monacrosporium* spp., *M. thaumasium* segue o mesmo padrão de desenvolvimento e características dos fungos do gênero *Arthrobotrys* spp. enquanto o fungo *M. haptotylum* obedece a um padrão particular que vai desde ao desenvolvimento lento e limitado do micélio até uma coloração gradativa no reverso do crescimento do fungo.

Os fungos do gênero *Arthrobotrys* spp. reduziram eficazmente as L₃ em todas as concentrações analisadas *in vitro*. *A. oligospora* foi mais eficaz que *A. musiformis*. Porém, nas condições analisadas não houve redução na quantidade de L₃ após passagem pelo trato digestivo.

A análise molecular confirmou similaridade com os dados morfológicos para as espécies sequenciadas, ou seja, *M. thaumasium* se agrupou aos fungos do gênero *Arthrobotrys* spp. enquanto *M. haptotylum* possui características próprias.

8. Referências

Ahren D, Tholander M, Fekete.; (2005) “Comparison of gene expression in trap cells and vegetative hyphae of the nematophagous fungus *Monacrosporium haptotylum*”. *Mic.* 151: 789–803.

Almeida F.A., Garcia K.C.O.D., Torgerson P.R., Amarante F.T., (2010). “Multiple resistance to anthelmintics by *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* in sheep in Brazil”. *Parasit. Inter.* 59:622-625.

Amarante, F.T. “Os parasitas de ovinos [online]”. São Paulo: Editora UNESP, (2014), p.263 ISBN 978-85-68334-42-3. Available from SciELO Books <http://books.scielo.org>.

Araújo J. V. , Stephano M. A., Sampaio W. M.; (1999). “Passage of nematode-trapping fungi through the gastrointestinal tract of calves”. *Vet. Arhiv.* 69: 69-78.

Araújo JV, Mota MA, Campos AK (2004a) “Controle biológico de helmintos parasitos de animais por fungos nematófagos”. *Rev Bras Parasitol Vet* 13:165–170.

Araújo, A.K.C.J.V; Mota, M.A (2004) “Controle biológico de helmintos parasitos de animais por fungos nematófagos”; **In:** XIII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária & I Simpósio LatinoAmericano de Ricketisioses, Ouro Preto, MG.

Assis R. C. L.; Araújo J. V. (2003) “Avaliação da viabilidade de duas espécies de fungos predadores do gênero *monacrosporium* sobre ciatostomíneos após a passagem pelo trato gastrintestinal de equinos em formulação de alginato de sódio” *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 12, 3, 109-113.

Barron, G.L. (1977) “The Nematode-destroying fungi.” **Canadian Biological Publications. Guelph**, 140.

Bastos G.A Fonseca L.D., Ferreira A.V.P., Costa M. A. S., Silva M. L. F., Vasconcelos V. O., Souza R. M. S., Duarte E. R., (2017) "Helminthiasis characterization and anthelmintic efficacy for ewes and lambs raised in tropical semiarid region". Trop. Anim. Health Prod 49: 937.

Braga F. R., Araújo, J. V., Soares F. E. F., Araujo J. M., Ferreira S. R., Tavela A. O., Silveira W. F., (2012). "An extracellular serine protease of an isolate of *Duddingtonia flagrans* nematophagous fungus". Biocont. Scie. Techn. 22:10, 1131-1142.

Braga F. R.; Araújo J. V.; Soares F. E. F.; Araujo J. M.; Ferreira S. R.; Tavela, A. O.; Silveira, W. F.; Queiroz, J. H. (2014). "Proteolytic action of the crude extract *Duddingtonia flagrans* on *Cyathostomin* (Nematoda: Cyathostominae) in coprocultures". Rev. Bras. Parasit Vet, 2:143-146.

Braga F. R.; Araújo J. V.; Soares F. E. F.; Araujo J. M.; Ferreira S. R.; Tavela, A. O.; Silveira, W. F.; Queiroz, J. H. (2013). "Proteolytic action of the crude extract *Duddingtonia flagrans* on *Cyathostomin* (Nematoda: Cyathostominae) in coprocultures". Rev. Bras. Parasit Vet, 2:143-146.

Braga FR, Araújo JV, Campos AK, Carvalho RO, Silva AR, Tavela AO, Maciel AS (2007) "Observação in vitro da ação dos isolados fúngicos *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium* e *Verticillium chlamydosporium* sobre ovos de *Ascaris lumbricoides* (Lineu, 1758)". Rev Soc Bras Med Trop, (3):356-358.

Braga, F. R., Silava, A. R. E., Araújo, J. M., Carvalho, R. O., Araújo, J. V. D. & Frassy, L. N. (2010). "Predatory activity of the nematophagous fungi *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium* and *Artrobotrys robusta* on *Strongyloides stercoralis*". Trop. Med., 43, 588-590.

Braga, F., Carvalho, R., Araujo, J., Silva, A., Araújo, J., Lima, W., Ferreira, S. (2009). "Predatory activity of the fungi *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium*, *Monacrosporium sinense* and *Arthrobotrys robusta* on *Angiostrongylus vasorum* first-stage larvae". *Helminthol.*, 83:303–308

Brasil (2015); Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – **IBGE** Produção da Pecuária Municipal volume 43.

Bricarello, P. A. Zaros, L.G., Coutinho, L.L., Rocha, R.A., Kooyman, F.N.J. De Vries, E., Gonçalves, J.R.S., Lima, L.G., Pires, A.V., Amarante, A.F.T. (2007). "Field study on nematode resistance in Nelorebreed cattle." *Vet. Parasit.*, 148, 3-4, 272-278.

Bruns, T.D., White, T.J., Taylor, J. W., (1991) "Fungal Molecular Systemics". *An. rev. Ecol. Syst.*, 22:525-564.

Bueno, V. H. P.(2002) "Controle Biológico e Manejo de Pragas na Agricultura Sustentável". 52.

Cai, K.-Z., Wang, F.-H., Wang, K.-Y., Liu, J.-L., Wang, B.-b., Xu, Q., Xue, Y.-J., Wang, F., Zhang, C., Fang, W.-X., Cai, B., Liu, Y.-Q., Cao, X., (2017), "In vitro predatory activity of *Arthrobotrys oligospora* and after passing through gastrointestinal tract of small ruminants on infective larvae of trichostrongylids," *Experimental Parasitology*. 61., 10-16.

Cezar, I. M. "Conhecendo melhor os pecuaristas e suas relações com a Embrapa Gado de Corte. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte" (2000). 49 p. (Embrapa Gado de Corte. Boletim de Pesquisa, 9).

Coleman A. W. (2003) "ITS2 is a double-edged tool for eukaryote evolutionary comparisons". *T. Gen.* 19:370 - 375.

Cooke R. C., Godfrey (1964) B. E. S. "A key to the nematode-destroying fungi". Trans. Brit. mycol. Soc. 47: 61-74.

Costa, V.M.M. Simões, S. V.D. e Riet-Correa F. (2012) "Controle das parasitoses gastrintestinais em ovinos e caprinos na região semiárida do Nordeste do Brasil". Pesq. Vet. Bras. 31:65-71.

Cruz D. G., Costa L. M. , Rocha L. O., Retamal C. A., Vieira R. A. M., Seabras H., Silva C. P., DaMatta R. A., Santos C. P.:(2015) "Serine proteases activity is important for the interaction of nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* with infective larvae of trichostrongylides and free-living nematodes *Panagrellus* spp". Fung, Biol. 22:1131-1142.

Cruz, D. G. (2011) "Determinação da Atividade de Protease e Fosfatases ácidas durante a interação do fungo nematófago *Duddingtonia flagrans* com as Larvas infectantes de nematóides Trichostrongilídeos e nematóide de vida livre *Panagrellus* sp". Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia) Universidade Estadual do Norte Fluminense – Brasil.

Cruz, D.G.; Silva, C.P.; Carneir, C.N.B. ; Retamal, C.A. I; Thiébaud, J.T.L. ; DaMatta, R.A.; Santos, C.P. (2009) "Acid phosphatase activity during the interaction of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* with the nematode *Panagrellus* sp" Invert. Pat. 102 238–244

Das, S.; Dash, H, R.; Mangwani, N.; Chakraborty, J.; Kumari, S. (2014) "Understanding molecular identification and polyphasic taxonomic approaches for genetic relatedness and phylogenetic relationships of microorganisms. J. Mic. Met., 103, 80-100.

Davies, G. (2006). "Quantitative trait loci associated with parasitic infection in Scottish blackface sheep". Heredity, 96:252–258.

Dias, W. P.; Ferraz, S. (1993) "Crescimento e esporulação de *Arthrobotrys* spp. em diferentes substratos, meios de cultura, pH e níveis de temperatura." *Nematol. Bras.* 17, 2, 169-181.

El-Ashram S., Suo X., (2017). "Exploring the microbial community (microflora) associated with ovine *Haemonchus contortus* (macroflora) field strains". *Sci. Rep.* 7, 70.

EMBRAPA., Carvalho C. O., Molento M. B. (2007); Método Famacha®: Um recurso para o controle da verminose em ovinos; circular técnica 52, São Carlos, SP.

Faedo, M., Larsen, M., Waller P.J., (1997). "The potential of nematophagous fungi to control the free-living stages of nematode parasites of sheep: Comparison between Australian isolates of *Arthrobotrys* spp. and *Duddingtonia flagrans*". *Vet. Parasit.* 72: 149-155.

FAO. "Biological control of gastro-intestinal nematodes of ruminants using predacious fungi". (1998). *FAO animal production and health papers*, Rome, 94.

Ferraz, S., Santos, M. A., (1995) "Controle biológico de fitonematóides pelo uso de fungos". *RAPP* 3:283-314.

Fonte: IBGE, Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Agropecuária, Pesquisa da Pecuária Municipal 2016, **Disponível em:** https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2016_v4_4_br.pdf Acessado em Março de 2018.

Freitas, A. C. B. , Quirino, C. R., Bastos, R. (2017) "Bem-estar de ovinos" *Revisão PUBVET* . 1:18-29.

Gasbarre, L. C., Smith, L. L., Lichtenfels, J. R., Pilitt, P. A. (2009) "The identification of cattle nematode parasites resistant to multiple classes of

anthelmintics in a commercial cattle population in the US". *Vet. Parasitol.* 166: 281–285.

Gill, B.S.,(1996) "Anthelmintic resistance in India. *Vet. Parasitol*". 63:173-176.

Girão E.S.; Girão R.N.; Medeiros, L.P. (1998) "Verminose em ovinos e seu controle". Teresina: EmbrapaMeio-Norte,.(EmbrapaMeio-Norte, Circular Técnica, 19).

GONÇALVES, L. 1996. "Fatos históricos do controle biológico". *Floresta e Ambiente* 3: 96-101.

Gordon, H. M.; Whitlock, H. V. (1939) "A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. *CSI.* 12,50-52.

Graminha, E. B. N., Costa A. J., Oliveira G. P. , Monteiro A. C., Palmeira, S. B. S.(2005). "Biological control of sheep parasite nematodes by nematode-trapping fungi: in vitro activity and after passage through the gastrointestinal tract". *World J. Micro. Biotec.* 21:717–722.

Grønvold J., Henriksen S.A., Larsen M., Nansen P. & Wolstrup J. (1996). "Aspects of biological control with special reference to arthropods, protozoans and helminths of domesticated animals". *Vet. Parasitol.* 64:47-64.

Hibbett DS, Gilbert L-B, Donoghue MJ (2000) "Evolutionary instability of ectomycorrhizal symbioses in basidiomycetes". *Nature* 407:506–508.

Hoog, G.S. (1985). "Taxonomy of the Dactylaria Complex, IV. Dactylaria, Neta, Subulispora and Scolecobasidium". *Stud. Mycol.* 26: 1-60.

Jackson F, Miller J (2006) "Alternative approaches to control Quo vadit?" *Vet Parasitol* 139:371–384.

Kaminsky R. N. G. S. Schorderet W. Skripsky T., Bouvier J., Wenger A. Schroeder F., Desaulles Y., Hotz R. Goebe T. B. Hosking C., Pautrat F., Wieland-Berghausen S. Ducray P. (2008) "Identification of the amino-acetonitrile derivative monepantel (AAD 1566) as a new anthelmintic drug development candidate". *Parasit. Res.*, 103:931–939.

Kaplan R.; Burke J. M.; Terrill T. H.; Miller J. E.; Getz W. R.; Mobini S.; Valencia E.; Williams M. J.; Williamson L. H.; Larsen M.; Vatta A. (2004) "Validation of the FAMACHA© eye colour chart for detecting clinical anaemia in sheep and goats on farms in the southern United States". *Vet. Parasitol.*, 123:105-120.

Khan, T. A., Azam, M. A., & Husain, S. I. (1985). "Effect of fungal filtrates of *Aspergillus niger* and *Rhizoctinia solani* on penetration and development of root knot nematode and the plant growth of tomato var". *Marglobe. Indian J. Nematol*, 14, 106-109.

Knight, J. S.; Bisset, S. A. (2015) "Real-time PCR/DNA melting curve-based assay to identify individual strongylid larvae recovered from ovine faecal cultures". *Vet. Parasit.*, 214: 337-341.

Krebs, C. J. (1972). "Ecology: an Experimental Analysis of Distribution and Abundance". Harper and Row, New York.

Kunert, J. (1992). "On the mechanism of penetration of ovicidal fungi through egg-shells of parasitic nematodes. Decomposition of chitinous and ascaroside layers". *F. Parasitol.*, 39, 61–66.

Larsen, M., (1999). "Biological control of helminths". *Int. J. Parasitol.* 29, 139–146.

Lattes S, Ferte H, Delaunay P, Depaquit J, Vassallo M, Vittier M, (2011) "Trichostrongylus colubriformis Nematode Infections in Humans", France. *Emerg Infect.* 17: 1301-1302.

Li, J.; Liu, Y.; Zhu, H.; Zhang, K.Q. (2016) “Phylogenic analysis of adhesion related genes Mad1 revealed a positive selection for the evolution of trapping devices of nematode-trapping fungi”. *Sci. Rep.* 6:22609 | DOI: 10.1038/srep22609.

Liou and Shean S. Tzean. (1997) “Phylogeny of the Genus *Arthrobotrys* and Allied Nematode-Trapping Fungi Based on rDNA Sequences”. *Myc.* 89:6.

Little P.R., Hodge A, Maeder S.J., Wirtherle N.C., Nicholas D.R., Cox G.G., (2011) “Efficacy of a combined oral formulation of derquantel–abamectin against the adult and larval stages of nematodes in sheep, including anthelminticresistant strains.” *Vet Parasitol* 181(2-4): 180-193.

Liu, X.-Z., and K.-Q. Zhang (1994). “Nematode-trapping species of *Monacrosporium* with special reference to two new species”. *Mycol. Res.* 98: 862-868.

Melo, L. M., Bevilaqua, C. M. Araújo, L. J. V. Melo, A. C. F. L. (2003) “Predatory activity of nematophagous fungus *Monacrosporium thaumasium* against *Haemonchus contortus*, after passage through the gastrointestinal tract of goats”. *Ciência Rural*,33,1.

Molento M. B.(2013) “Alternativas Para O Controle De Nematoides Gastrintestinais De Pequenos Ruminantes”. *Arq. Inst. Biol.* 80:253–263.

Molento M.B. (2004). “Resistência de helmintos em ovinos e caprinos”. *Revta Bras. Parasitol. Vet.* 13:82-87.

Mota MA, Campos AK, Araújo JV (2003) “Controle biológico de helmintos parasitos de animais: estágio atual e perspectivas futuras”. *Pesq Vet Bras* 23:93–100.

Murray, D. S. & Wharton, D. A (1990). "Capture and penetration processes of the free-living juveniles of *Trichostrongylus colubniformis* (Nematoda) by the nematophagous fungus *Arthrobotrys oligospora*". *Parasitol.*101, 93-100.

Niciura S.C.M., Veríssimo S.J., Molento, M. B. (2009) "Determinação da eficácia anti-helmintíca em rebanhos ovinos: metodologia de colheita de amostras e de informações de manejo zoossanitário: documento 91 [online]". São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste.

Nordbring-Hertz, B., E. Frimnan, and M. Veenhuis. (1989). "Hyphal fusion during initial stages of trap formation in *Arthrobotrys oligospora*". *Antonie van Leeuwenhoek.J.Microbiol.* 55: 237–244.

Padilha, T. (1996) "Controle da verminose gastrintestinal em pequenos ruminantes nas regiões áridas e semi-áridas do nordeste do Brasil". In: Padilha, T. (Ed.), *Controle dos nematódeos gastrintestinais em ruminantes*. EMBRAPA, CNPGL, Coronel Pacheco, Brasil, p. 77-93.

Papadopoulos E. (2008) "Anthelmintic resistance in sheep nematodes Small" *Rum.* 76, 99–103.

Periasamy K. , Pichler R. , Poli M. , Cristel S. , Cetra B. , Medus D.I , Basar M. , Thiruvenkadan A. K., Ramasamy S. , M. Ellahi B. ,F. Mohammed F. , Teneva A. , Shamsuddin M. , Podesta M. G. , Diallo A.; (2014) "Candidate gene approach for parasite resistance in sheep - Variation in immune pathway genes and association with fecal egg count". *PLoS ONE*, 9: 2.

Pinho DB, Firmino AL, Ferreira-nior WG, Pereira OL (2012) "An efficient protocol for DNA extraction from *Meliolales* and the description of *Meliola centellaesp*". *nov. Mycotaxon* 122(1):333–345.

Pontes, T. (2016) "Crescimento radial e atividade predatória de fungos nematófagos do gênero *arthrobotrys e monacrosporium* isolados na estação

ecológica estadual de guaxindiba, rj.”(Monografia em ciências biológicas) – UENF, Campos dos Goytacazes, 12.

Porter TM, Golding GB (2011) “Are similarity- or phylogeny-based methods more appropriate for classifying internal transcribed spacer (ITS) metagenomic amplicons?” *New Phytol* 192:775–782.

Ramírez. C G.S., Gives M., P., Aguilar M., L., Arellano L., M. E. Romano H. J., (2016) "Phylogenetic Analysis of Nucleotide Sequences from the ITS Region and Biological Characterization of Nematophagous Fungi from Morelos, Mexico," *J. Mycol. ID* 8502629, 13.

Ribeiro, R.C.F.; Ferraz, S.; Mizobutsi, E.H. Menezes, M.; (1999). “Levantamento de espécies de *Monacrosporium* predadoras de nematóides de diversas regiões brasileiras”. *Nemat. Bra.*, 23:41-47.

Riggio, V. (2013) “Genome-wide association and regional heritability mapping to identify loci underlying variation in nematode resistance and body weight in Scottish Blackface lambs”. *Hered.* 110:420–9.

Roberts, F. H. S.; O’Sullivan, P. J. (1950). “Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infecting the gastrointestinal tract of cattle”. *Acad J Agric Res*, 1:99-102.

Rubner, A. (1996). “Revision of predacious Hyphomycetes in the *Dactylella*-*Monacrosporium* complex.” *St. Mycol.*, Berlin. 39,

Salgado, J. A. ; Santos, C. D. P. (2016) “Overview of anthelmintic resistance of gastrointestinal nematodes of small ruminants in Brazil.” *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária (Online)*, 25, 3-17.

Santos, C.P.; Padilha, T.; Rodrigues, M.L.A. (2001)”.Predatory activity of *Arthrobotrys oligospora* and *Duddingtonia flagrans* on pre-parasitic larval

stages of cyathostominae under different constant temperatures. *Ciência Rural*, 31:839-842.

Saxena G, Dayal R, Mukerji KG (1987) "Interaction of nematodes with nematophagous fungi: induction of trap formation, attraction and detection of attractants". *FEMS Microbiol Lett* 45: 319–327.

Schallig, H. D.; VAN L., M. A; HENDRIKX, W. M.(1994) "Immune responses of Texel sheep to excretory/secretory products of adult *Haemonchus contortus*". *Parasit.*,108:351–357.

Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, et al. (2012). "Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi". *Proceedings of the National Academy of Sci.* 109: 6241–6246.

Scholler M, Hagedorn G, Rubner A (1999) "A reevaluation of predatory oryziaceae fungi II". A new generic concept. *Sydowia* 51:89–113.

Scholler, M.; Rubner, (1994). "A. Predacious activity of the nematode-destroying fungus *Arthrobotrys oligospora* in dependence of the medium composition. *Microbiol.* 149, 145-149.

Shouche S., Nema Z., Bhati P., (2015) "Fungal Identification method by RDNA sequence analysis: Molecular approach to reveal the role of microbial community in vermicomposting". *IOSR-JCE*, 17: 103-106.

Sidrin J.J.C; Rocha ,M.F.G. (2004) "Micologia médica a luz de autores contemporâneos". Rio de Janeiro:Guanabara Koogan S. A.,388

Silva ME, Araújo JV, Braga FR, Soares FEF (2013). "Control of infective larvae of gastrointestinal nematodes of heifers by isolates of the nematophagous fungi". *Rev Bras Parasitol Vet* 26:1–6

Silva, M. E., Braga, F. R., de Gives, P. M., Millán-Orozco, J., Uriostegui, M. A., Marcelino, L. A., Soares, F. E., Araújo, A. L., Vargas, T. S., Aguiar, A. R., Senna, T., Rodrigues, M. G., Froes, F. V. and de Araújo, J. V. (2015). "Fungal antagonism assessment of predatory species and producers metabolites and their effectiveness on *Haemonchus contortus* infective larvae. BioMed Research International" BioMed Research International, 6.

Silva, M.E., Uriostegui, M.A., Millán-Orozco, J., Gives, P.M., Hernández, E.L., Braga, F.R., Araújo, J.V. (2017). "Predatory activity of *Butlerius* nematodes and nematophagous fungi against *Haemonchus contortus* infective larvae". Rev. Bras. Parasitol. Vet. 26:92- 95.

Silveira, W. F.; BORGES, L. A. (2012) "In vitro association of diferente nematophagus fungi to control cyatostomin (Nematoda: Strongylidae)". Bioc. Sci. and tec.22:607-610.

Silveira, F. Braga, W. F., Tavela A., D. S., L., Domingues R., Aguiar A., Ferraz C., Carvalho L., Hollanda Ayupe T., Zanuncio J., Araújo J., (2017) "Pathology Nematophagous fungi combinations reduce free-living stages of sheep gastrointestinal nematodes in the Field". J. of Inv.. 150,1-5

Simplício, A. A., Wander, A. E., Leite, E. R. & Lopes, E. A. (2004). A caprino- ovinocultura de corte como alternativa para a geração de emprego e renda. In: EMBRAPA (ed.) Embrapa Caprinos. Documentos. EMBRAPA, Mossoró.

Sinott, M. C., Dias de Castro, L. L., Leite, F. L. L., Gallina, T., DeSouza, M. T., Santos, D. F. L. and Leite, F. P. L. (2014). "Larvicidal activity of *Bacillus circulans* against the gastrointestinal nematode *Haemonchus contortus* in sheep". J. Hel.90, 68–73.

Soares ACF, Sousa CS, Coimra JL, Garrido MS, Machado GS. (2006). "Predatory ability of *Arthrobotrys musiformis* and *Monacrosporium thaumasium* on *Scutellonema bradys*". Sci Agricola 63:396–398.

Sudhir Kumar, Glen Stecher, Koichiro Tamura; (2016),MEGA7: “Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets, *Molecular Biology and Evolution*”, 33:1870–1874.

Tavela A.O. (2009). “Predatory activity of nematophagous fungi on infective larvae of *Ancylostoma* sp.:evaluation in vitro and after passing through the gastrointestinal tract of dogs”. *J. Helmint.* 83:231–236.

Taylor, M. A. Coop, R. L., Wall, R. L.; (2010). “Parasitologia Veterinária – Cap Taxonomia e morfologia parasitária”. Revisão técnica Maria Cecília R. V. Bressan, tradução Cid Figueiredo, Idília Ribeiro Vanzelloti, Ronaldo Frias Zanon. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.

Tendler, M. & Simpson.(2008) “The biotechnology-value chain: Development of Sm14 as a schistosomiasis vaccine”. *Acta Tropica*, 108:263-266.

Tunlid, A., and Jansson, S. (1991) “Proteases and their involvement in the infection and immobilization of nematodes by the nematophagous fungus *Arthrobotrys oligospora*”. *Appl Environ Microbiol* 57: 2868-2872.

Valicente F. H., Mourão A. H. C., (2008).”Use of byproducts rich in carbon and nitrogen as a nutrient source to produce *Bacillus thuringiensis* (Berliner)-based biopesticide”.*Neotropical Entomology*, 37 (6):702-708.

Valicente F.H.,(2009) “Controle biológico de pragas com entomopatogênicos”. Informe agropecuário Belo Horizonte. 30:48-55.

VAN wyk, J. A.; Malan, F. S.; Bath, G. F.(1997). “Rampant anthelmintic resistance in sheep in South África – What are the opinions?” In: workshop of managing anthelmintic resistance in endoparasites. Sun City, South Africa. Proceedings 51-63.

Van Wyk, J.A., (2001). "Refugia—overlooked as perhaps the most potent factor concerning the development of anthelmintic resistance". *Onderstepoort J. Vet. Res.* 68, 55–67.

Van Wyk, J.A., Reynecke, D.P., (2011). "Blueprint for an automated specific decision support system for countering anthelmintic resistance in *Haemonchus* spp. at farm level". *Vet. Parasitol.* 177, 212–223.

Vieira L. S., Cavalcante A. C. R., Ximenes L. J. F.(1997) "Epidemiologia e Controle das principais parasitoses de caprinos nas regiões semi-áridas do nordeste". EMBRAPA/CNPC, Ministério da agricultura e do abastecimento, Sobral, Ceará, 50.

Vieira V.D., Feitosa T.F., Vilela V.L.R., Azevedo S.S., Almeida Neto J.L., Morais D.F., Ribeiro A.R.C. & Athayde A.C.R. (2014). "Prevalence and risk factors associated with goat gastrointestinal helminthiasis in the Sertão region of Paraíba State, Brazil". *Trop. Anim. Health Prod.* 46:355-361.

Waller, P. J e Fao.(1997). "Biological control of gastro-intestinal nematodes of ruminantes using predacious fungi".National Veterinary Institute P.O. Box 7073, S-750 07 Uppsala, Sweden;

Waller, P. J. (1998). "Possible means of using nematophagous fungi to control nematode parasites of livestock. In: Biological control of gastrointestinal nematodes ruminants 59 using predacious fungi".FAO Animal Production and Health. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome,11-14.

Wang, B. B., Wang, F. H., Xu, Q., Wang, K. Y., Xue, Y. J., Ren, R., ... Cao, X. (2017). "In vitro and in vivo studies of the native isolates of nematophagous fungi from China against the larvae of trichostronglides." *The J.I of B. Mic.*

White, T.J., Taylor, J. W., (1991) "Fungal Molecular Systemics". An. rev. Ecol. Syst., 22:525-564.

Zacharias, F. (2004) "Controle Alternativo Da Infecção Por *Haemonchus contortus* Em Ovinos: Avaliação Do Tratamento Homeopático". Dissertação apresentada à Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia, 116.

Zhang Z. (2016). "Two benzimidazole resistance-associated SNPs in the isotype-1 β -tubulin gene predominate in *Haemonchus contortus* populations from eight regions in China". International J. Parasit: Drugs and Drug Resistance, 6:199–206.

Zhang Y, Yu Z-F, Xu J, Zhang K-Q (2011) Divergence and dispersal of the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora* from China. Environ Microbiol Rep 3:763–773

Zhao, M. Mo, et al., (2004). "Characterization of a neutral serine protease and its full-length cDNA from the nematode-trapping fungus *Arthrobotry oligospora*". Myc. 96 16–22.

Zvinorova PI, Halimani TE, Muchadeyi FC, Matika O, Riggio V, Dzama K. (2016). "Breeding for resistance to gastrointestinal nematodes - the potential in low-input/output small ruminant production systems". Vet Parasitol. 225:19-28.

9. Anexos

Meios de cultura

Para todos os meios de cultura foram utilizados de água destilada que foram esterilizados na autoclave por 20 minutos.

- **Anexo 1:** Ágar-água 1000 mL de H₂O destilada ----- 24 g de agar-agar
- **Anexo 2:** Agar-sabouraud 1000 mL de H₂O destilada ----- 47 g de sabouraud.
- **Anexo 3:** Agar-aveia 1000 mL de H₂O destilada ----- 375 g de aveia -----15 g de ágar-bacteriológico.
- **Anexo 4:** Agar – milho 1000mL de H₂O destilada ----- 17g de Agar-milho
- **Anexo 5:** Meio canjiquinha 107g de milho tritura (canjiquinha) ----- 43ml de água destilada