

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA
FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**FUNGOS NEMATÓFAGOS EM DIFERENTES SOLOS E
CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA DE *Arthrobotrys*
*oligospora***

Eliane Ribeiro Cardoso
Engenheira Agrônoma

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Dezembro de 2007

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**FUNGOS NEMATÓFAGOS EM DIFERENTES SOLOS E
CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA DE *Arthrobotrys oligospora***

Eliane Ribeiro Cardoso

Orientador: Prof. Dr. Ely Nahas

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Microbiologia Agropecuária (Produção Vegetal).

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Dezembro de 2007

C268f Cardoso, Eliane Ribeiro
Fungos nematófagos em diferentes solos e caracterização fisiológica de *Arthrobotrys oligospora* / Eliane Ribeiro Cardoso. - - Jaboticabal, 2007
xviii, 82 f. : il.; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2007
Orientador: Ely Nahas
Banca examinadora: Drauzio Eduardo Naretto Rangel, Jaime Maia dos Santos, João Lucio de Azevedo, Rita de Cassia Panizzi
Bibliografia

1. *Arthrobotrys oligospora*. 2. Atividade enzimática. 3. Nematóide. 4. Fatores de crescimento. 5. solo. I. Fungos nematófagos em diferentes solos e caracterização fisiológica de *Arthrobotrys oligospora*. II. Jaboticabal - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 631.461:582.282

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Campus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES

ELIANE RIBEIRO CARDOSO - nascida em 20 de março de 1976 em Águas de Lindóia, SP. Engenheira Agrônoma formada pela Faculdade de Agronomia do Centro Regional Universitário de Espírito Santo do Pinhal - SP em junho de 2001. Estagiou desde 2000 no laboratório de controle biológico do Instituto Biológico em Campinas - SP onde iniciou pesquisa com fungos entomopatogênicos. Foi responsável pelo controle de qualidade do fungo *Metarhizium anisopliae* no laboratório Biocontrol Sistema de Controle Biológico em Sertãozinho – SP. Em 2004, obteve o Título de Mestre em Microbiologia (Microbiologia Agropecuária), no Departamento de Produção Vegetal pela UNESP / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Câmpus de Jaboticabal, com a pesquisa intitulada “Metodologia para avaliação em laboratório da seletividade de fungos entomopatogênicos para larvas de primeiro ínstar de *Ceraeochrysa cincta* (Neuroptera: Chrysopidae). Também em 2004, iniciou como aluna regular do curso de Doutorado do mesmo curso de Pós-Graduação. Prestou consultoria para a empresa Metha Vida – Laboratório de Controle Biológico – Catiguá – SP na implantação do controle de qualidade na produção do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* isolado IBCB 425. Participou de alguns eventos dentre eles o Fórum de Microbiologia, Simpósio de Controle Biológico e Reunião Anual do Instituto Biológico, dentre outros eventos.

À Deus por estar sempre iluminando o meu caminho

OFEREÇO

aos incomparáveis pais,

Helena Ribeiro Cardoso e Antonio de Godoi Cardoso

*Pela humildade, força, desprendimento e o amor que me serve de alicerce para a
minha vida.*

DEDICO

Para refletir:

*“Pouco conhecimento faz que as criaturas se sintam orgulhosas.
Muito conhecimento, que se sintam humildes.
É assim que as espigas sem grãos erguem desdenhosamente a cabeça para o céu, enquanto que as cheias a baixam para a terra, sua mãe”.*

Leonardo da Vinci
”

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Ely Nahas pela dedicação, confiança e oportunidade de realizar o doutorado;

Ao Prof. Dr. Jaime Maia dos Santos pela amizade e permissão de utilizar o Laboratório de Nematologia para a realização do trabalho e pelo carinho nas correções;

Aos professores Dr. Drauzio Eduardo Naretto Rangel, Dr. João Lucio de Azevedo e Dra. Rita de Cassia Panizzi por aceitarem gentilmente o convite de participar da banca examinadora e pelas valiosas sugestões e correções,

A Luiz Carlos de Assis pelo auxílio na condução dos ensaios e o companheirismo;

A meu namorado Henrique Teixeira Nunes, por seu amor e apoio constantes;

A meu irmão Celso Wagner Ribeiro Cardoso, cunhada Maria de Fátima Medeiros Cardoso e sobrinha Rafaeli Medeiros Cardoso pelo carinho;

À família Cardoso e Ribeiro por todo amor, força e incentivo;

A meu querido Vô João Rozeni Gonçalves Cardoso e tio Frei Alcides Finardi que partiram durante essa jornada deixando saudades;

À Gogóia e Anizeu pelo carinho e apoio;

Aos colegas de trabalho, Martha, Thais e Thiago pela convivência no laboratório;

À amiga Janaina Gonçalves Fernandes pela força e incentivo em todos os momentos difíceis;

À Beatriz Costa, Breno Pupim e Cinthya Babá Barroso pelo companheirismo e em saber que posso contar com amizades;

Aos colegas de pós-graduação das áreas de Microbiologia e Nematologia Agrícola;

À Rosângela e Edna do Departamento de Microbiologia por toda ajuda e amizade;

Aos funcionários do Departamento de Nematologia André, Sandra e Valmir pelo carinho e amizade;

À doutoranda Adriana Rodrigues da Silva pela amizade e disponibilidade;

À Dona Cidinha que me acolheu como filha;

A Wilson e Shirley pela presteza, carinho e transporte gratuito;
À Dona Norma Amoroso Nunes e família pelo carinho e o apoio de sempre ;
À FAPESP (Fundação de Amparo à pesquisa do estado de São Paulo) pelo auxílio à pesquisa, fundamental para a realização deste trabalho .

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE FIGURAS	xiv
RESUMO	1
SUMMARY	3
I. INTRODUÇÃO	5
II. REVISÃO DE LITERATURA	6
1. Prejuízos causados pelos nematóides.....	6
2. Fungos nematófagos.....	6
3. Fatores que influem na distribuição dos fungos nematófagos no solo.....	8
4. Caracterização fisiológica de <i>Arthrobotrys oligospora</i>	10
III. OBJETIVOS	13
1. Quantificação dos fungos totais e nematófagos em amostras de solo rizosférico e não rizosférico com plantas ornamentais (<i>Impatiens</i> sp); olerícolas (alface), frutíferas (bananal) e gramados (batatais) da FCAV/UNESP do Câmpus de Jaboticabal	13
2. Efeito de diferentes fatores químicos, físicos e enzimáticos nas condições de crescimento do <i>Arthrobotrys oligospora</i>	13
3. Produção das enzimas celulolíticas e amilolíticas em condições de indução da produção de micélio dois meios de cultura deste fungo	13
IV. MATERIAL E MÉTODOS	14
1. Agentes Biológicos	14
1.1. <i>Arthrobotrys oligospora</i>	14
1.2. <i>Panagrellus redivivus</i>	14
2. Amostragens e locais de retirada das amostras de solo e raiz	14
3. Meios de cultura	15
3.1. Meio de Martin (1950).....	15
3.2. Meio de Sabouraud	15

3.3. Meio de Czapek	16
3.4. Meio de Aveia	16
3.5. Meio de ágar-água	17
4. Frequência de fungos nematófagos em diferentes solos	17
4.1. Contagem e isolamento dos fungos totais	17
4.2. Avaliação do potencial de atividade nematófaga dos isolados	18
4.3. Frequência de nematóides	18
4.4. Determinação da densidade populacional e identificação dos nematóides	18
4.5. Atividade enzimática do solo	18
4.5.1. Atividade da amilase	18
4.5.2. Atividades da celulase e da endoglucanase	19
4.5.3. Atividade da desidrogenase	19
4.5.4. Atividade da lipase	19
4.5.5. Atividade da invertase	19
4.5.6. Atividade da protease	20
4.5.7. Atividade da quitinase	20
4.6. Característica química do solo	20
4.6.1. Carbono solúvel em água	20
4.6.2. Matéria Orgânica	21
4.6.3. Umidade	21
4.6.4. pH	21
5. Caracterização fisiológica de <i>Arthrobotrys oligospora</i>	21
5.1. Multiplicação do inóculo do fungo <i>Arthrobotrys oligospora</i>	21
5.2. Determinação do crescimento do fungo <i>Arthrobotrys oligospora</i>	22
5.3. Manutenção do <i>Panagrellus redivivus</i>	22
5.4. Manutenção do <i>Arthrobotrys oligospora</i>	22
5.5. Efeito das diferentes fontes de carbono adicionadas ao meio de cultura no crescimento do <i>Arthrobotrys oligospora</i> adicionadas ao meio de cultura.....	22
5.6. Efeito das diferentes fontes de nitrogênio adicionadas ao meio de cultura no crescimento do <i>Arthrobotrys oligospora</i>	23
5.7. Efeito das vitaminas e fatores de crescimento adicionadas ao meio de cultura	

no crescimento do <i>Arthrobotrys oligospora</i>	24
5.8. Efeito da temperatura e do período de incubação no crescimento do <i>Arthrobotrys oligospora</i>	25
5.9. Efeito do pH no meio de cultura no crescimento do <i>Arthrobotrys oligospora</i> ...	25
6. Meios utilizados para se determinar a atividade enzimática extracelular do <i>Arthrobotrys oligospora</i>	25
6.1. Determinação da atividade enzimática de <i>Arthrobotrys oligospora</i>	25
6.1.1. Determinação da α -amilase	25
6.1.2. Determinação da β -amilase	25
6.1.3. Atividade celulolítica	25
V DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA	27
1. Frequência de fungos nematófagos em diferentes solos	27
2. Caracterização fisiológica de <i>Arthrobotrys oligospora</i>	27
VI. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
1. Frequência de fungos nematófagos em diferentes solos	29
2. Caracterização fisiológica de <i>Arthrobotrys oligospora</i>	40
VII. CONCLUSÕES	54
1. Frequência de fungos nematófagos em diferentes solos	54
2. Caracterização fisiológica de <i>Arthrobotrys oligospora</i>	54
VIII. REFERÊNCIAS	55

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Composição do meio de cultura de Martin.....	15
Tabela 2. Composição do meio de cultura de Sabouraud	15
Tabela 3. Composição do meio de cultura líquido de Czapek.....	16
Tabela 4. Meio de cultura de aveia (p/v) para a multiplicação do <i>Panagrellus redivivus</i>	16
Tabela 5. Meio de cultura ágar-água para o teste da patogenicidade atividade nematocida	17
Tabela 6. Composição físico-química dos solos sob alface, banana, grama-batatais e Impatiens.	28
Tabela 7. Fungos totais e nematófagos das frações não rizosférica e rizosférica dos solos sob alface, banana, grama-batatais e Impatiens	29
Tabela 8. Frequência e gêneros dos nematóides encontrados nas amostras de solo e raízes de alface, banana, grama-batatais e Impatiens.	31
Tabela 9. Atividade enzimática da amilase, carbono solúvel, desidrogenase, lipase, invertase, protease, celulase e da endoglucanase do solo sob alface, banana, grama-batatais e Impatiens.	33
Tabela 10. Coeficiente de correlação simples entre as variáveis dos solos sob alface, banana, grama-batatais e Impatiens	39

Tabela 11. Efeito de diversas fontes de carbono no crescimento de <i>Arthrobotrys oligospora</i> e no pH final do meio de cultura	50
Tabela 12. Efeito de diversas fontes de nitrogênio no crescimento do <i>Arthrobotrys oligospora</i> e no pH final do meio de cultura	52
Tabela 13. Efeito de diversas vitaminas no crescimento do <i>Arthrobotrys oligospora</i> e no pH final do meio de cultura	53

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Teor de umidade das frações não rizosférica e rizosférica dos solos sob alface, banana, grama-batatais e Impatiens.	35
Figura 2. Teor de matéria orgânica das frações não rizosférica e rizosférica dos solos sob alface, banana, grama-batatais e Impatiens.....	36
Figura 3. Carbono solúvel das frações não rizosférica e rizosférica dos solos sob alface, bananal, grama batatais e Impatiens	37
Figura 4. Crescimento do <i>Arthrobotrys oligospora</i> em meio de cultura suplementado com sacarose como fonte de carbono, pH final e micélio	41
Figura 5. Efeito da temperatura no crescimento do <i>Arthrobotrys oligospora</i> , pH final e micélio	43
Figura 6. Efeito do pH inicial no crescimento do <i>Arthrobotrys oligospora</i> , pH final e micélio	45
Figura 7. Atividade da celulase, da endoglucanase do <i>Arthrobotrys oligospora</i> crescido em meios de cultura com sacarose, celulose microcristalina e carboximetil-celulose. Inserção, peso seco e pH final.	46
Figura 8. Atividade dextrinizante e sacarificante do <i>Arthrobotrys oligospora</i> crescido em meios de cultura com sacarose, amido e maltose. Inserção, peso seco e pH final	47

FUNGOS NEMATÓFAGOS EM DIFERENTES SOLOS E CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA DE *Arthrobotrys oligospora*

RESUMO - O uso de agentes biológicos para controle de nematóides é considerado uma das várias medidas a serem empregadas em um manejo integrado de pragas, sendo uma preocupação de caráter mundial. Contudo, foram estudados os fatores determinantes da frequência de fungos totais e nematófagos, da atividade enzimática e da distribuição de nematóides de solos não rizosféricos e rizosféricos sob alface (*Lactuca sativa* L.); banana (*Musa cavendishii* L.); grama batatais (*Paspalum notatum*) e Impatiens (*Impatiens valleriana*). A atividade predadora dos fungos nematófagos foi avaliada contra o nematóide *Panagrellus redivivus*. O número de fungos totais variou de $6,9 \times 10^5$ a $31,2 \times 10^5$ UFC g⁻¹ solo seco no solo não-rizosférico e de $6,9 \times 10^5$ a $25,6 \times 10^5$ UFC g⁻¹ solo seco no solo rizosférico. As contagens dos fungos nematófagos corresponderam a 23-41 % e 23-34 % dos fungos totais encontrados no solo rizosférico e não-rizosférico, respectivamente. Enquanto as contagens dos fungos totais do solo rizosférico se distribuíram na seguinte seqüência: alface > banana > grama-batatais > Impatiens, os nematófagos diminuíram na seguinte ordem: alface > Impatiens > banana > grama-batatais. A matéria orgânica e a umidade do solo influenciaram a distribuição tanto dos fungos totais como dos nematófagos do solo não-rizosférico. A distribuição dos nematóides nas amostras de solo e raiz foram *Rotylenchulus* sp., *Helicotylenchus* sp. e *Tylenchus* sp. para alface, *Meloidogyne* sp., *Helicotylenchus* sp., *Pratylenchus* sp. e *Rotylenchulus* sp. para banana, *Meloidogyne* sp., *Helicotylenchus* sp., *Pratylenchus* sp. e *Rotylenchulus* sp. para grama-batatais, *Meloidogyne* sp., *Helicotylenchus* sp., *Pratylenchus* sp., *Rotylenchulus* sp. e *Tylenchus* sp. para Impatiens. Em termos gerais, as atividades da desidrogenases, amilases, celulases e endoglucanases distribuíram-se no solo não-rizosférico de acordo com a frequência de fungos totais e nematófagos. As condições de crescimento e os requerimentos nutricionais de *Arthrobotrys oligospora*, um fungo que tem sido citado por sua atividade no controle de nematóides, foram também estudadas em meio líquido. O crescimento do fungo ajustou-se a uma curva ascendente de 3^o grau, mesmo após 15 dias de incubação. A temperatura

ótima de crescimento foi de 25° C e decresceu de 10%, 26% e 71% quando o fungo foi incubado a 30° C, 20° C e 35° C, respectivamente. O pH ótimo foi igual a 5,0 e o crescimento do fungo reduziu-se até 69 % e de até 21 % para pH inferior ou

superior ao ótimo. Várias fontes de carbono foram utilizadas pelo fungo, porém a maior produção de micélio foi encontrada com maltose e sacarose. As fontes de nitrogênio utilizadas pelo fungo incluíram várias proteínas (triptona, extrato de levedura, caseína, peptona e casaminoácidos), uréia, nitrato de sódio e cloreto de amônio. Das várias vitaminas experimentadas, a riboflavina propiciou um aumento do crescimento do fungo de 2,2 vezes e a mistura biotina e tiamina de 2,3 vezes em relação ao controle, sem vitamina. De modo geral, constatou-se, após o período de incubação, uma tendência de alcalinização do meio de cultura para até 8,4. As atividades celulolítica e a-amilolítica do fungo *A. oligospora* também foram avaliadas em meio de cultura líquido de Czapek a fim de se estabelecer as condições ecológicas para seu crescimento no solo.

Palavras- Chave: atividade enzimática, fatores de crescimento, fungos nematófagos, nematóide, solo rizosférico, solo não rizosférico.

**TITLE - NEMATOPHAGOUS FUNGI IN DIFFERENT SOILS AND PHYSIOLOGICAL
CHARACTERIZATION OF *Arthrobotrys oligospora***

SUMMARY - Biological control of nematodes is considered one of the many practices that can be used in integrated pest management. We investigated the factors affecting the frequency of the total and the nematophagous fungi, soil enzymatic activity as well as the distribution of the nematodes in rhizospheric and bulk soil of lettuce (*Lactuca sativa* L.); Impatiens (*Impatiens valleriana*); banana (*Musa cavendishii* L.) and Bahiagrass (*Paspalum otatum*). The effect of the nematophagous fungi were evaluated against the nematode *Panagrellus redivivus*. The total fungal number ranged from $6,9 \times 10^5$ to $31,2 \times 10^5$ UFC g⁻¹ dry soil in the bulk soil and from $6,9 \times 10^5$ to $25,6 \times 10^5$ UFC g⁻¹ dry soil in the rhizosphere. Nematofagous fungi counts were to 23-41 % and 23-34 % of the total fungi found in the rhizosphere and bulk soil, respectively. While the total fungi counts of the rizosphere were distributed in the following sequence: lettuce > banana > Bahiagrass > Impatiens, the nematophagous fungi decreased in the following order: lettuce> Impatiens > banana > Bahiagrass. Moisture and organic matter contents of the bulk soil influenced the distribution of the total and nematophagous fungi of the soil. The following phytonematodes found in the samples of soil and roots were *Rotylenchulus* sp., *Helicotylenchus* sp. and *Tylenchus* sp. (lettuce), *Meloidogyne* sp., *Helicotylenchus* sp., *Pratylenchus* sp. and *Rotylenchulus* sp (banana), *Meloidogyne* sp., *Helicotylenchus* sp., *Pratylenchus* sp. and *Rotylenchulus* sp. (Bahiagrass), *Meloidogyne* sp., *Helicotylenchus* sp., *Pratylenchus* sp., *Rotylenchulus* sp. and *Tylenchus* sp. (Impatiens). In general, the activities of the enzymes desidrogenase, amylase, celulase and endoglucanase followed the distribution of the frequency of the soil total and nematophagous fungi. The conditions of the growth and nutritional requirements of *Arthrobotrys oligospora*, a fungi that has been cited for its activity to the control of nematodes, were also studied. The time course was adjusted to an ascending curve of 3^o degree, exactly after 15 days of incubation. The maximal temperature of growth was of 25^o C and decreased of 10%, 26% and 71% when the fungi was incubate 30^o C, 20^o C and 35^o C, respectively. Maximal pH was 5.0 and the fungus growth decreases up to 69 % and up to 21

% to values inferior or higher of the maximal pH. Some carbon sources had been used by the fungus, however the biggest production of mycelia was found with maltose and sucrose. The nitrogen sources used included some proteins (triptone, yeast extract, casein, peptone and casaminoacids), urea, sodium nitrate and ammonium chloride. Of the vitamins tried, riboflavin propitiated an increase of the fungus growth of 2,2 times and biotin and thiamine mixture of 2,3 times in relation to the control, without vitamin. In general, it was evidenced, the pH enhanced up to 8.4 after the incubation period. Celullolytic and amilolytic activities of *A. oligospora* had been also evaluated in Czapek liquid culture in order to establish the ecological conditions for its soil growth.

Keywords: enzyme activities, growth factors, nematophagous fungus, nematode, pH, soil rhizosphere, non- rhizosphere.

I. INTRODUÇÃO

Com o avanço da agricultura moderna e seus manejos culturais, tais como monocultura e melhoramento genético, além do uso indiscriminado de agrotóxicos, ocorreu o surgimento de altas populações de pragas. Uma tendência nos dias atuais para reverter essa questão é a utilização do controle biológico.

O uso de agentes biológicos para controle de nematóides é considerado uma das várias medidas a serem empregadas em um manejo integrado de pragas, sendo uma preocupação de caráter mundial. Muitos fungos de solo possuem capacidade de infectar os nematóides e seu potencial no controle biológico de fitonematóides vem sendo estudado há muitos anos. Atualmente a possibilidade de encontrar um agente de controle que viabilize sua aplicação no solo tem sido de interesse para muitos pesquisadores. Contudo, poucos estudos têm averiguado os fatores que influem na sua prevalência no solo. Portanto, a frequência destes fungos em diversos solos apresentando diversidade de características físico-químicas, coberturas vegetais e a frequência e diversidade de nematóides, características estas que foram contempladas nos solos selecionados, foram considerados para este estudo. Na maioria dos relatos os fungos nematófagos têm sido associados a solos ricos de matéria orgânica. Outros fatores não têm sido abordados claramente.

Para o sucesso, dentro de um programa de controle biológico de fitonematóide é necessário compreender os fatores envolvidos na prevalência dos fungos nematófagos. Dentre as diferentes espécies de fungos predadores que capturam e matam nematóides no solo, *Arthrobotrys oligospora* é considerado um efetivo agente nematófago e tem sido encontrado em diferentes ambientes.

O crescimento deste fungo no solo e sua atividade predadora podem ser afetados por inúmeros requisitos nutricionais, com esta idéia em mente, estudou-se a fisiologia do fungo *A. oligospora*. Considerando que a introdução de um agente nematófago no solo depende da existência de condições ecológicas adequadas e enquanto não se conhecer mais sobre os fatores que afetam a atividade deste fungo, sua eficácia como agente de controle não terá sucesso (KERRY, 1988).

II. REVISÃO DE LITERATURA

1. Prejuízos causados pelos nematóides

Os nematóides podem causar perdas totais na agricultura e tornarem-se limitantes à produção de muitas culturas (KLAN 1993 e TIHOHOD, 1993). Dentre elas, inclusive as plantas ornamentais, que, via de regra, têm pelo menos uma espécie de nematóide considerada praga-chave. Em plantas ornamentais os nematóides que infestam as raízes incluem *Meloidogyne* spp., *Pratylenchus* spp., *Radopholus similis*, *Rotylenchulus reniformis*, *Cactodera* spp, *Aphelenchoides* spp. etc (CHASE et al. 1983). Nas principais culturas como feijão, algodão, soja, café e tomate as perdas anuais variam de 11 a 25% (SANTOS & FERRAZ, 1991). As perdas causadas por *Meloidogyne* spp. em diferentes culturas à produção agrícola no Brasil são estimadas em 12,7 %, sendo 8% em bananeira (*Musa* spp.) (COSTA, 2000). De acordo com ZEM & ALVES (1981); COSTA et al. (1998) e COSTA (2000), as estimativas de perdas por esse fitonematóide podem chegar a 100% entre as bananeiras do subgrupo Cavendish.

Em solos agrícolas, o número dos nematóides pode alcançar vinte milhões por metro quadrado (BARRON 2003). No Brasil, as perdas variam, também segundo estimativas, de 5 a 35 %, em média, para os diferentes tipos de culturas (anuais, semi-perenes e perenes), sendo impossível cultivar economicamente certas plantas em áreas infestadas sem que rigorosas e sistemáticas medidas de controle venham a ser implementadas.

De acordo com KERRY (2000) e PERSSON & JANSSON (1997), os nematóides de plantas são parasitas obrigatórios e estão presentes em abundância na maioria do solo rizosférico. A identificação dos gêneros e espécies de fitonematóides existentes nos solos é de extrema importância para o controle biológico desses patógenos.

2. Fungos nematófagos

Fungos nematófagos são os microrganismos antagonistas de nematóides mais pesquisados, pois sua eficácia no controle biológico tem sido capaz de reduzir populações de nematóides em condições de laboratório e campo (LARSEN, 1999).

De acordo com MELO (1986), os fenômenos antagônicos podem ser observados em todo tipo de solo e envolvem predação (nematóides por *Arthrobotrys oligospora*), lise

(Actinomicetos), antibiose (*Streptomyces*, *Penicillium* spp., *Trichoderma* spp.) e competição (por nutrientes).

Segundo PRAMER (1964), o processo de formação das armadilhas, ao longo de suas hifas, ocorre dentro de 24 horas após a interação fungo e nematóide em resposta à presença do nematóide ou suas excretas, de compostos biológicos ou ainda, é induzido por condições de estresse fisiológico, como na escassez de nutrientes e água (BALAN & GERBER, 1972). Quanto maior a motilidade dos nematóides, maior o estímulo ao fungo para a produção de armadilhas (NANSEN et al. 1986, NANSEN et al. 1988). A formação de armadilhas pode ser atribuída também aos conídios (DACKMAN & NORDBRING-HERTZ 1992).

A maioria das espécies são classificadas como fungos predadores de nematóides. Estes fungos produzem estruturas em forma de anéis constritores e não constritores, hifas, botões e redes tridimensionais adesivas ao longo do micélio. O aprisionamento à armadilha é seguido pela penetração das hifas na cutícula do nematóide. Dentro do nematóide, ocorre o crescimento das hifas e a digestão dos conteúdos internos.

O papel dos nematóides na nutrição dos fungos nematófagos ainda não é bem claro na interação entre fungos e nematóides. Fungos predadores são capazes de invadir e consumir a carcaça de nematóides em decomposição, porém o processo de invasão é mediado apenas por hifas vegetativas através de orifícios naturais, numa velocidade muito menor do que a invasão mediada por armadilhas em nematóides vivos (NORDBRING-HERTZ & STÄLHAMMAR-CARLEMALM 1978). Embora muitos fungos predadores de nematóides tenham sido isolados e identificados durante o final do século dezenove (ZOPF 1988), muitas informações sobre as características ecológicas, nutricionais e fisiológicas destes microrganismos só recentemente foram geradas.

Os fungos nematófagos estão catalogados com mais de 150 espécies (BARRON 1977). Eles são divididos em três grupos: A) Fungos que capturam os nematóides com armadilhas: estes fungos produzem estruturas em forma de anéis constritores e não constritores, hifas, botões e redes tridimensionais adesivas ao longo do micélio. B) Fungos parasitas de ovos de nematóides: estes fungos não produzem hifas vegetativas fora do corpo do hospedeiro, mas hifas férteis ou conidióforos contendo esporos e C) Fungos endoparasitas: suas hifas penetram a casca do ovo, através de pequenos poros existentes na camada vitelínica, causando alteração na permeabilidade da casca e expandindo seu volume. Devido a imensa diversidade de formas de vida no solo, muitos fungos são especializados na utilização de nematóides como fontes de nutrientes. Estes

são genericamente chamados de fungos nematófagos e produzem diferentes tipos de armadilhas com as quais capturam os nematóides (ZHANG & MO, 2006; NORDBRINGHERTZ et al, 2000; BARRON, 1977). AHMAN et al. (2002) observaram que quando ocorre a patogenicidade, os fungos nematófagos que capturam os nematóides com armadilhas desenvolveram uma seqüência de processos, para atuar como predadores.

3. Fatores que influem na distribuição dos fungos nematófagos no solo

No solo, onde prevalecem condições nutricionais estressantes para o desenvolvimento dos fungos, a habilidade em predar nematóides propicia a estes microrganismos vantagens adicionais de sobrevivência. Algumas espécies desenvolvem estruturas de captura como resultado de estímulos externos, enquanto outras desenvolvem-nas espontaneamente, sendo as mais dependentes de nematóides como fonte de nutrientes.

JAFFEE (2002) estudou a influência da matéria orgânica e a atividade de fungos predadores *Arthrobotrys oligospora* e *A. eudermata* para o controle biológico de nematóides em solo cultivado com vinhedo e relatou que a adição de folhas de vinhedo aumentou a densidade e a atividade predatória de *Dactylellina haptotyla*. GHAFAROKHI et al (2004) selecionaram 150 amostras de solo com pastagem e 138 amostras de fezes de carneiros do Irã e observaram a presença de 11 isolados diferentes do gênero *Arthrobotrys* no solo, mas nenhum fungo nematófago foi encontrado nas fezes. Fungos nematófagos foram observados também em fezes de ovinos (KHAN et al. 2001; HAY et al. 2002) e de vacas leiteiras na região da Mata do estado de Minas Gerais - Brasil (SAMUEL et al. 1999).

DUPONNOIS et al. (2001) estudaram o efeito de diferentes fontes de matéria orgânica na interação com o fitonematóide *Meloidogyne mayaguensis*, que causa danos em plantas de tomate e verificaram redução dos nematóides na raiz do tomate. A conclusão principal deste estudo é que a atividade antagônica de *Arthrobotrys oligospora* foi aumentada na presença de folhas moídas *Acacia holosericea*, mostrando um efeito diferenciado entre as diferentes fontes de matéria orgânica.

Segundo GRAY (1987), a maioria das espécies de fungos nematófagos é distribuída amplamente, existindo poucas espécies restritas geograficamente. Entre os inimigos naturais, tais como fungos, nematóides predadores, bactérias, vírus, ácaros e insetos tem sido identificados como antagonistas de nematóides (AGRIOS, 2005;

SIDDIQUI & MAHMOOD, 1996; CARNEIRO, 1992; STIRLING, 1991; KERRY, 1990; POINAR JUNIOR & JANSSON, 1988; VAN GUNDY, 1985; BARRON, 1977). Os fungos nematófagos são também freqüentes em solos cultivados e em ecossistemas naturais e destacam-se como os mais promissores para o controle biológico de fitonematóides (DACKMAN et al. 1992; FERRAZ, 1992; STIRLING, 1988; MANKAU, 1980), pois ocorrem em abundância no solo.

Contudo, não foi encontrada nenhuma relação entre ocorrência, origem e distribuição das espécies isoladas *Arthrobotrys oligospora* variedade *oligospora*, *Arthrobotrys musiformis*, *Arthrobotrys robusta*, *Arthrobotrys conoides* e *Arthrobotrys oviformis*, *Arthrobotrys superba*, *Arthrobotrys oligospora* variedade *microspora*, *Arthrobotrys brochopaga* e *Arthrobotrys* spp. de diferentes localidades brasileiras e de diferentes culturas (OLIVEIRA et al., 2002).

As espécies formadoras de armadilhas são mais abundantes em solo contendo disponibilidade de matéria orgânica e esta habilidade confere a estas espécies vantagem sobre as espécies não formadoras de armadilhas em solo com fauna e microbiota rica (GRAY 1987).

PERSMARK et al. (1996) relataram que o fungo *A. oligospora* tem sido considerado um fungo sapróbio, podendo crescer em substratos disponíveis do solo, diferentemente dos fungos essencialmente parasitas. O crescimento rápido e a produção abundante de micélio são dois importantes fatores para a disseminação e sobrevivência dos fungos em condições ambientais, embora o crescimento micelial não esteja relacionado com a capacidade de um isolado em predação de nematóides (DACKMAN et al. 1987). Portanto, o conhecimento dos requerimentos nutricionais podem indicar as condições de seu desenvolvimento no ambiente

De acordo com PERSSON (1997) os fungos nematófagos possuem duas fases: uma fase sapróbia em que empregam como fonte de carbono (energia) e aminoácidos (nitrogênio) a matéria orgânica do solo e uma outra fase parasítica na qual se nutrem somente do corpo dos nematóides capturados. Foi comprovado que na presença de nematóides os fungos são capazes de passar rapidamente da fase sapróbia à parasítica. Além disso, a presença de nematóides provoca a germinação dos esporos e o desenvolvimento dos órgãos de captura.

Portanto, nenhum efeito foi constatado mostrando a prevalência dos fungos nematófagos nos solos estudados, além do conteúdo de matéria orgânica e a diversidade de materiais vegetais.

4. Caracterização fisiológica de *Arthrobotrys oligospora*

Há mais de 50 espécies de fungos predadores que capturam e matam nematóides no solo, sendo *Arthrobotrys* e *Duddingtonia* os gêneros mais importantes estudados em programas de controle biológico (SIDDIQUI & MAHMOOD, 1996 e DIJKSTERHUIS et al., 1994; SANTOS et al., 2001).

A. oligospora foi relatado pela primeira vez no Irã em amostras de solos e de fezes de ovinos (GHAHFAROKHI et al. 2004). O produto "nematophagin" tem sido preparado com *Arthrobotrys oligospora* para o controle de nematóides de raízes de culturas agrícolas (FONDAZIONE LANZA, 2003).

De acordo com GRAY (1985), os fatores que influem na distribuição dos fungos nematófagos são o conteúdo de matéria orgânica e de umidade, o pH do solo e os fatores edáficos. Espécies do gênero *Arthrobotrys* têm sido encontrados em solos com alto conteúdo de matéria orgânica, em substratos para cultivo de cogumelos e em solos próximos às excreções de gado estabulado (KANITKAR & KANITKAR, 2003). Alguns experimentos falharam na tentativa de indicar os requerimentos nutricionais para o desenvolvimento de culturas de fungos nematófagos (COSCARELLI & PRAMER 1962), porém foi demonstrado que esses fungos nematófagos crescem bem em meio de cultivo contendo ácido oléico e o aminoácido D-alanina como fonte de carbono e energia para o processo de formação de armadilhas (ROSENWEIG 1983, DIJKSTERHUIS et al. 1993).

Recentemente BARRON (2003), relatou que espécies de *Arthrobotrys* (Ascomycetes: Ascomycota) são provavelmente os fungos predadores mais importantes e certamente o gênero mais promissor dentre os fungos nematófagos.

Segundo MAIA et al. 2001 os fungos nematófagos tem habilidade de colonizar a rizosfera e isso tem sido apontado como uma característica importante para um agente de controle biológico. Os microrganismos, para seu crescimento, têm necessidade de vários nutrientes, além de temperatura e umidade.

Mais especificamente, NGUYEN et al. (2007) relataram que o crescimento de *A. oligospora* esta relacionado à relação carbono: nitrogênio (C:N). A atividade predadora é estimulada pela presença de nematóides ou substâncias derivadas dos nematóides

(ARAÚJO, 2001). Segundo JAFFEE (2004) *A. oligospora* é um fungo celulolítico e o nematóide constitui uma fonte potencial de nitrogênio.

Diferentes meios líquidos têm sido citados pela literatura para crescimento de *Arthrobotrys oligospora*, dentre estes, CMA (corn meal agar) acrescido de 2 g $K_2HPO_4 L^{-1}$ (ROSÉN et al. 1997; TUNLID & JANSSON 1991, BALOGH et al. 2003, AHMAN et al. 2002), TSB - tryptic soy broth (Difco) + ágar (DUPONNOIS et al 2001) e PDA - potato dextrose e ágar (GREUNING et al., 1992). O meio líquido LNM (low-nutrient medium) suplementado com fontes de C, N e P foi utilizado para produção de lectinas (ROSÉN et al. 1997 e BALOGH et al. 2003). Para produção de proteínas, o meio com 0,01% peptona de soja suplementado com fenilalanina e valina foi empregado para produção de micélio com anéis constritores (TUNLID & JANSSON 1991; AHMAN et al. 2002;). A adição de fosfato a este meio inibiu a produção de micélio com anéis constritores (TUNLID et al. 1999; AHMAN et al. 2002). Este fungo cresce bem em meios de cultura naturais ou sintéticos em condições adequadas de temperatura e pH (JATALA 1986; KIM & RIGGS 1992). OLIVEIRA et al. (2002) compararam o crescimento de cinco isolados da espécie *Arthrobotrys* em três meios de cultura e constataram que o melhor meio foi o de KADO & HESKETT (1970).

SAXENA Et al. (1989) reportaram que para um bom crescimento do fungo há necessidade de tiamina, biotina e ácido 4-aminobenzóico. Contudo, estudos com *A. oligospora* sugerem que a formação da hifa adesiva seja menos dependente da temperatura e do nutriente que o desenvolvimento de redes adesivas morfológicamente mais complexas BELDER & JANSEN (1994). Estes resultados sugerem que o fungo *A. oligospora* responde de modo diferente a diferentes fontes de carbono e de nitrogênio quando crescido no ambiente do solo em condições de captura ou não de nematóides.

De acordo com KERRY (1988), a introdução de um agente nematófago no solo depende da existência de condições ecológicas adequadas ou que podem ser criadas e enquanto não se conhecer mais sobre os fatores que afetam a atividade destes fungos, seu potencial como agente de controle biológico não terá sucesso.

Dentre os meios de cultura sólidos testados (BDA, BDA-peptona, CMA, fubá-ágar e YPSSA) utilizados, os dois últimos foram os que propiciaram maior crescimento e esporulação (DIAS & FERRAZ, 1993). CARDOSO & NAHAS (2005) estudaram o crescimento do *A. oligospora* nos meios sólidos: Sabouraud-EL com 1 g L^{-1} de extrato de levedura, Czapek com 200 $\mu g L^{-1}$ de tiamina e 200 $\mu g L^{-1}$ de biotina, Corn Meal suplementado com 2 g L^{-1} KH_2PO_4 , Malte, e Low Nutrient Medium (LNM) com 200 $\mu g L^{-1}$

de tiamina e $5\mu\text{g L}^{-1}$ de biotina e constataram que o diâmetro da colônia no meio de Czapek foi significativamente maior comparados com os diâmetros observados nos meios de Malte, Sabouraud-EL e LNM.

O meio com 0,01% peptona de soja suplementado com fenilalanina e valina foi empregado para produção de micélio com anéis constritores (TUNLID & JANSOON 1991; AHMAN et al. 2002;). O meio BDA foi utilizado por ZUCCONI et al. (2002) para se avaliar o efeito da radiação UV em esporos deste fungo. Contudo, o meio mínimo tem sido o mais adequado para se avaliar os requerimentos nutricionais dos fungos (BARROSO et al., 2006).

Comparando-se o efeito de diferentes fontes de C e N, constatou-se ótimo crescimento quando no meio de cultura foram utilizadas manose e uréia, respectivamente (GREUNING et al., 1992). Carboidratos como glicose e sorbose inibiram a captura de *Cooperia punctata* por *Arthrobotrys musiformes* e *Arthrobotrys robusta* (ARAÚJO, 2001).

III. OBJETIVOS

1. Quantificação dos fungos totais e nematófagos em amostras de solo rizosférico e não rizosférico com plantas ornamentais (*Impatiens* sp); olerícolas (alface), frutíferas (banana) e gramados (batatais) da FCAV/UNESP do Câmpus de Jaboticabal;

1.1. Contagem e isolamento de fungos totais

1.2. Avaliação dos isolados da capacidade predatória de *Panagrellus redivivus*

1.3. Determinação da frequência de fungos nematófagos

1.4. Contagem e identificação dos nematóides

1.5. Avaliação das características químicas dos solos

1.6. Correlacionar a frequência de fungos totais com os parâmetros químicos e enzimáticos dos diferentes solos.

2. Efeito de diferentes fatores químicos, físicos e enzimáticos nas condições de crescimento do *Arthrobotrys oligospora*

2.1. Efeito do tempo de incubação;

2.2. Efeito da temperatura de incubação;

2.3. Efeito do pH do meio de cultura;

2.4. Efeito da fonte de carbono;

2.5. Efeito da fonte de nitrogênio;

2.6. Efeito das vitaminas;

3. Produção das enzimas celulolítica e amilolítica em condições de indução da produção de micélio em dois meios de cultura deste fungo;

IV MATERIAL E MÉTODOS

1. Agentes Biológicos

1.1. *Arthrobotrys oligospora*

O fungo *A. oligospora* pertence ao filo Ascomycota, classe Ascomycetes, família Orbiliaceae e foi gentilmente cedido pelo Laboratório de Nematologia do Departamento de Fitossanidade da FCAV/UNESP.

1.2. *Panagrellus redivivus*

O nematóide de vida livre *Panagrellus redivivus* foi gentilmente cedido pelo Laboratório de Nematologia do Departamento de Fitossanidade da FCAV/UNESP de Jaboticabal - SP e utilizado como substrato para teste da atividade predatória dos isolados de fungos totais do solo.

2. Amostragens e locais de retirada das amostras de solo e raiz:

Amostras de solo não rizosférico foram coletadas na profundidade de 0-15 cm. A coleta do solo rizosférico foi feita pela retirada da camada aderente às raízes (1-3 mm). O material estranho (folhas, insetos, galhos etc.) foram retirados e as amostras peneiradas em peneiras de 2 mm de malha. As plantas selecionadas para retirada das amostras dos solos rizosférico e não rizosférico foram: alface (*Lactuca sativa* L.), banana (*Musa cavendishii*), Impatiens (*Impatiens valleriana*) e grama batatais (*Paspalum notatum*).

As áreas estudadas foram de um canteiro com a planta ornamental Impatiens e de 0,5 hectare de Grama batatais ambos localizados no Horto Florestal; uma área de 1 ha de Bananal com aproximadamente 10 anos no setor de Fruticultura da FCAV/UNESP de Jaboticabal e também de um canteiro 10 x 1 m² de Alface de uma horta particular de Jaboticabal que recebeu uma adubação compostada de esterco de galinha. De cada área foram coletadas cinco amostras e cada amostra foi constituída por quatro subamostras. As subamostras de solo foram coletadas na profundidade de 0 - 15 cm com auxílio de um enxadão, na forma de um bloco, contendo solo e raízes das plantas e

aconditionadas em sacos plásticos, devidamente identificados e transportados ao laboratório. No laboratório, foram separadas as frações rizosférica e não rizosférica. As subamostras foram reunidas e homogeneizadas e material estranho foi eliminado.

3. Meios de cultura

3.1. Meio de Martin (1950)

Tabela 1. Composição do meio de cultura de MARTIN (1950) modificado para o crescimento do *Arthrobotrys oligospora*.

	Quantidade
Glicose	10,0 g
KH ₂ PO ₄	0,5 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
Peptona	5,0 g
Extrato de levedura	0,5 g
Rosa de bengala	0,07 g
Ágar	15,0 g
Água destilada	1000 mL q. s. p.
pH	5,6

3.2. Meio de Sabouraud

Tabela 2. Composição do meio de cultura de Sabouraud para o crescimento do *Arthrobotrys oligospora*.

	Quantidade
Glicose	40,0 g
Peptona	10,0 g
Ágar	15,0 g
Água destilada	1000 mL q.s.p.
pH	7,0

3.3. Meio de Czapek

Tabela 3. Composição do meio de cultura líquido de Czapek modificado para o crescimento do *Arthrobotrys oligospora*.

	Quantidade
NaNO ₃	2,0 g
KCl	0,5 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,5 g
K ₂ HPO ₄	1,0 g
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,01 g
Sacarose	30,0 g
Tiamina	200 µg L ⁻¹
Biotina	200 µg L ⁻¹
Água destilada	1000 mL q.s.p.
pH	6,0.

Preparou-se 100 mL de soluções das vitaminas biotina e tiamina autoclavadas a 127°C por 20 minutos e quando não mencionado, no momento da inoculação foram adicionados 1 mL, contendo 200µg L⁻¹ de tiamina e 200 µg L⁻¹ biotina em 50 mL do meio de cultura de czapek líquido.

3.4. Meio de Aveia

Tabela 4. Meio de cultura de aveia (p/v) para a multiplicação do *Panagrellus redivivus*.

	Quantidade
Aveia flocos finos	10,0 g
Àgua destilada	10,0 mL

3.5. Meio de ágar-água

Tabela 5. Meio de cultura ágar-água para o teste da patogenicidade.

	Quantidade
Ágar	2,0 g
Água de torneira	100,0 mL

4. Frequência de fungos nematófagos em diferentes solos

4.1. Contagem e isolamento dos fungos totais

Foi utilizado o procedimento de diluição em série conforme WOLLUM II (1982), utilizando-se meio de MARTIN (1950), pH 5,6, acrescido de 60 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de penicilina, 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de estreptomicina e 70 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de rosa bengala, para a contagem de fungos totais. As placas foram incubadas à temperatura de 30° C por, no mínimo, 72 horas. Após a contagem dos fungos totais, estes fungos foram isoladas com base nas características fenotípicas e morfológicamente diferentes das colônias, assim obtidos 673 isolados fungicos. Estes isolados foram transferidos para vidros de penicilina contendo meio de cultura Sabouraud com pH 5,5 e devidamente tampados, foram incubadas à temperatura de 30° C por cinco dias. Então foram guardados para o estudo da patogenicidade.

4.2. Avaliação do potencial de atividade nematófaga dos isolados

Os isolados foram inoculados em placas de Petri de 7 cm de diâmetro contendo 10 mL de meio ágar-água 2 % espalhando-se na placa inteira e mantidos à temperatura de 30° C por seis dias. Após esse período de incubação adicionou-se 1 mL da suspensão de *Panagrellus redivivus* contendo aproximadamente 100 nematóides em cada placa para a detecção dos fungos nematófagos ectoparasitos (predadores) que, usualmente, são de crescimento rápido e verificação da habilidade nematicida dos isolados. Para esta avaliação observou-se em microscópio ótico as placas de ágar-água mais o fungo contendo 1 mL de suspensão concentrada do nematóide (*P. redivivus*) e foi avaliada a cada 24 horas a porcentagem de nematóides predados.

4.3. Frequência de nematóides

O método de extração de nematóide na amostra de solo foi o da flotação centrífuga em solução de sacarose JENKINS (1964). Para isso, cada amostra foi pesada 100 g, homogenizadas em 2 L de água corrente ficando em repouso por 20 segundos. A suspensão foi vertida em uma peneira de 20 mesh sobreposta a uma de 500 mesh, em seguida foram centrifugadas por 5 minutos a 1750 rpm.

Para a extração dos nematóides de raiz, foi utilizada a técnica do liquidificador com água aliada à centrifugação em solução de sacarose e caolim (COOLEN & D'HERDE, 1972). As raízes foram cortadas em pedaços de aproximadamente 1 cm, pesou-se 10 g e adicionou-se uma quantidade de água, suficiente para cobrir as raízes e então foram trituradas no liquidificador por 18 segundos, em seguida realizou-se o mesmo procedimento do solo. Centrifugou-se por 5 minutos a 1750 rpm com 1 g de Caolim e 1 minuto com solução de sacarose 2 %.

4.4. Determinação da densidade populacional e identificação dos nematóides

Os nematóides extraídos foram transferidos para tubos de ensaio com 4 mL para a contagem em lâmina de Peters, ao microscópio ótico e a determinação das espécies de nematóides existentes nas diferentes amostras de solo (SANTOS 1991).

A suspensão do nematóide obtido foi deixada em repouso por 30 minutos e removido o sobrenadante com pipeta deixando-se apenas 4 mL para a identificação e contagem em câmara de Peters (TIHOHOD, 2000).

Os gêneros dos nematóides foram identificados no Laboratório de Nematologia do Departamento de Fitossanidade da FCAV/UNESP, em Jaboticabal, SP, por meio de microscopia ótica.

4.5. Atividade enzimática do solo

4.5.1. Atividade da amilase

Amilase foi desenvolvida segundo a metodologia de COLE (1977) utilizando-se 2 g de solo em tampão de acetato 0,1 M, contendo 50 mg de amido solúvel, pH 5,0 e

incubando-se por 24 horas a 37° C. A glicose liberada foi determinada pelo método de Somogyi-Nelson SOMOGYI (1952).

4.5.2. Atividades da celulase e da endoglucanase

Celulase e a endoglucanase foram determinadas segundo a metodologia de (KANAZAWA & MIYASHITA, 1986) utilizando-se 1 g solo e 0,2 mL de tolueno em repouso por 15 minutos, em seguida um volume de 10 mL de substrato (contendo 10 mg de celulose microcristalina mL⁻¹ (celulase) ou 10 mg de carboximetil celulose mL⁻¹ (endoglucanase). A glicose liberada também foi determinada pelo método de Somogyi-Nelson SOMOGYI (1952).

4.5.3. Atividade da desidrogenase

Desidrogenase foi determinada segundo a técnica descrita por CASIDA (1977). Foi pesado 3,0 g de solo seco, 0,03 g de CaCO₃ misturou-se e adicionou-se 0,50 mL de TTC (cloreto de trifenil tetrazólico) 3% (p/v), 1,1 mL de H₂O formando uma película acima do solo, agitados lentamente entre as mãos e incubou-se por 24 horas em banho maria a 37° C. O trifenilformazan formado foi extraído com até 30 mL de metanol, agitado fortemente e filtrado em papel de filtro JPROLAB sendo a leitura realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de Abs 485 nm.

4.5.4. Atividade da lipase

A atividade da lipase foi determinada pelo método de MARGESIN *et al.* (2002), incubando-se uma mistura contendo 0,1 g solo, 5 mL tampão NaH₂PO₄/NaOH 100 mM pH 7,25 e 50 µL de substrato (100 mM *p*-nitrophenyl butyrate, pNPB, diluído em 2-propanol) a 30° C por 10 min. Após o tempo de reação, a quantidade de *p*-nitrofenol liberada foi medida no espectrofotômetro em comprimento de onda de Abs 400 nm.

4.5.5. Atividade da invertase

Invertase, foi utilizada a metodologia de KANDELER *et al.* (1999), utilizando-se 0,3 g de solo em tampão de acetato 2 M, pH 5,5 e incubando-se por 3 horas a 50° C. A

glicose liberada foi determinada pelo método de Somogyi-Nelson SOMOGYI (1952). A leitura realizada foi de 660 nm de absorbância.

4.5.6. Atividade da protease

Protease foi determinada conforme NANNIPIERI et al. (1979), incubando-se por seis horas 1,0 g de solo com 2,5 mL de substrato contendo 1,0 % de caseína (p/v) em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,1. A determinação da tirosina liberada na reação foi feita pela utilização de 7,0 mL de Na₂CO₃ 3,7 % (p/v), 1,0 mL de solução CuSO₄ 0,06% (p/v) e 1,0 mL do reagente de Folin. Os tubos foram incubados por 5 minutos a 37° C.

4.5.7. Atividade da quitinase

Quitinase, foi desenvolvida pela metodologia de RODRÍGUEZ-KÁBANA et al. (1983), utilizando-se 10 g de solo 10 mL de uma solução de quitina coloidal (HSU & LOCKWOOD 1975) a 1,0 % (p/v) e incubou-se por 24 horas a 37° C. Uma unidade de atividade quitinolítica foi definida como a quantidade de enzima que produziu açúcar equivalente a 1 nM de N-acetylglucosamina por minuto sob absorbância de 585 nm contra água destilada.

4.6. Características químicas do solo

A composição mineral e física dos solos foi determinada no Departamento de Solos e Adubos da FCAV/UNESP de Jaboticabal.

4.6.1. Carbono solúvel em água (Hot Water Extractable Carbon)

O carbono solúvel em água foi determinado segundo metodologia de DAVIDSON et al. (1987), incubando-se por 30 minutos em ebulição, 1,0 g de solo seco, após o período de incubação as amostras foram filtradas e determinado com reagente de antrona. A leitura foi realizada no espectrofotômetro em comprimento de onda de 607 nm de absorbância.

4.6.2. Matéria orgânica

A matéria orgânica no solo foi determinada segundo metodologia de (DE BOER et al., 1988 e SIMS & HABY, 1971), incubando-se por 20 minutos em temperatura ambiente, 1,0 g de solo com 10 mL de solução bicromato de potássio 0,5 M; e 20 mL de ácido sulfúrico concentrado. O excesso de bicromato com $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2$ foi titulado, utilizando o indicador ferrion. Uma curva padrão com solução de glicose foi preparada e após a oxidação foi realizada a leitura em Abs 600 nm de absorbância.

4.6.3. Umidade

A umidade nos quatro solos foram estudadas analisando-se as porcentagens de umidade pela secagem das amostras de solo em estufa a temperatura de 105° C até peso constante.

4.6.4. pH

O pH nos quatro solos foi determinado em uma mistura na proporção 1 :1 solo: 0,01 M CaCl_2 .

5. Caracterização fisiológica do fungo *Arthrobotrys oligospora*

5.1. Multiplicação do inóculo do fungo *Arthrobotrys oligospora*

Procedeu-se a remoção dos esporos nas placas de Petri contendo também meio de Martin nas mesmas condições de cultivo. As placas esporuladas foram removidas com auxílio de uma alça de drigalski e 10 mL de água destilada esterilizada filtradas em funil de vidro contendo lã de vidro sob um cadinho de porcelana com furos no fundo e acoplado ao funil e transferidas para tubos. A suspensão foi homogeneizada fortemente em agitador de tubos durante 10 segundos, e em seguida quantificado o número de esporos, sendo determinado em câmara de Neubauer. O inóculo do fungo foi ajustado para $1,0 \times 10^5$ esporos/mL e 0,5 mL desta suspensão foram adicionados a 50 mL de meio de cultura de Czapek.

5.2. Determinação do crescimento do fungo *Arthrobotrys oligospora*

O crescimento micelial foi quantificado em peso seco de 50 mL de meio de cultura líquido de Czapek. O micélio foi separado do meio de cultura (cultura líquida), através da filtração á vácuo empregando-se funil de Büchner, contendo papel de filtro Whatman N° 1, previamente seco à 105° C por 24 horas e pré pesado. Foi medido o volume final do filtrado, após a retirada do micélio e o pH final. O crescimento do fungo foi quantificado em termos de peso seco micelial por mL de meio de cultura. Para isso, o micélio obtido após filtração, foi transferido para estufa à 105° C por 24 horas e, a seguir, pesado novamente para se determinar seu peso seco do micélio.

5.3. Manutenção do *Panagrellus redivivus*

Para sua criação foram inoculados 1,0 mL de uma suspensão aquosa com aproximadamente 1000 *P. redivivus* em cada placa de Petri de polistereno estéril contendo meio de aveia flocos finos e água na proporção de 1:1 devidamente embaladas em sacos plásticos pretos e mantidas à temperatura ambiente, no escuro e repicadas de 15 em 15 dias (HEINTZ, 1978).

5.4. Manutenção de *Arthrobotrys oligospora*

A cultura do *Arthrobotrys oligospora*, foi gentilmente cedida pelo Laboratório de Nematologia do FCAV/UNESP de Jaboticabal - SP, foi mantida em meio de cultura de Martin (Tabela 1) em tubos inclinados crescido por 20 dias a temperatura de 30° C e a seguir conservado em geladeira.

5.5. Efeito das diferentes fontes de carbono adicionadas ao meio de cultura no crescimento de *Arthrobotrys oligospora*

Quando se pretendeu verificar o efeito das fontes de carbono, a sacarose foi substituída pelos carboidratos citados abaixo. A concentração das fontes de carbono foi equivalente à da sacarose, isto é, 12,64 g de C/L. Os polissacarídeos (amido solúvel, pectina, dextrina e celulose) foram adicionados na concentração de 1 g/L. As demais fontes de carbono foram esterilizadas separadamente do meio de cultura por filtração

sob membrana Millipore® em papel de filtro com porosidade de 45 µm, previamente esterilizado, e acrescidas no momento da inoculação de forma asséptica. Foi preparado um controle sem a adição da sacarose.

O crescimento do fungo foi avaliado pela adição de: pentoses (D-arabinose, D-ribose, D-xylose, D-lyxose e L-arabinose), hexoses (D-frutose, D-galactose, D-glicose, D-manose, L-sorbose e L-ramnose), dissacarídeos (D-celobiose, maltose, lactose, sacarose e trealose), oligossacarídeos (rafinose), polissacarídeos (amido solúvel, celulose microcristalina, dextrina e pectina), ácidos carboxílicos (acetato, citrato e propiônico), polióis (D-arabitol, L-arabitol, D-galactitol, dulcitol, glicerol, D-sorbitol, D-manitol, ribitol e D-xilitol) e ácidos urônicos (D-galacturônico e ácido poligalacturônico). Foi avaliado conforme descrito no item 5.2.

5.6. Efeito das diferentes fontes de nitrogênio adicionadas ao meio de cultura no crescimento de *Arthrobotrys oligospora*

Quando se pretendeu avaliar o efeito das fontes de nitrogênio, o NaNO₃ foi substituído pelas fontes nitrogenadas citadas abaixo. A concentração das fontes de nitrogênio foi equivalente a do NaNO₃, isto é, 0,33 N/L. As fontes de nitrogênio peptona, extrato de levedura, caseína e casaminoácidos foram adicionadas na concentração de 10 g/L ambas foram esterilizadas juntamente com o meio de cultura. As demais fontes foram esterilizadas sob membrana filtrante Millipore® e adicionadas no momento da inoculação de forma asséptica. Também preparou-se um controle sem a adição da fonte de nitrogênio no meio de cultura.

O crescimento do fungo foi avaliado pela adição de diferentes fontes de nitrogênio inorgânico (cloreto de amônio, nitrato de amônio, nitrato de potássio, nitrato de sódio e uréia); aminoácidos L-alanina, L-arginina hidrócloride, L-asparagina, L-cisteína hidrócloride, L-fenilalanina, glicina, L-glutamina, L-histidina hidrócloride, L-leucina, L-lisina monohidrócloride, L-metionina, L-serina e L-triptofano); nitrogênio do complexo orgânico (triptona). Foi avaliado conforme descrito no item 5.2.

5.7. Efeito das diferentes vitaminas e fatores de crescimento adicionadas ao meio de cultura no crescimento de *Arthrobotrys oligospora*

Quando se pretendeu avaliar o efeito das vitaminas, tiamina e biotina foram substituídas pelas vitaminas abaixo citadas.

O crescimento do fungo foi avaliado pela adição de: ácido fólico, ácido nicotínico, ácido pantotênico, biotina, inositol, piridoxina, riboflavina e tiamina e vitamina B12. As diferentes fontes de vitaminas foram esterilizadas separadamente do meio de cultura, por filtração sob membrana filtrante Millipore[®] e no momento da inoculação, adicionadas de forma asséptica. Preparou-se dois controles: um com as vitaminas: biotina e tiamina ambas contendo 200 µg por litro e um outro sem a adição de vitamina no meio de cultura. Foi avaliado conforme descrito no item 5.2.

5.8. Efeito da temperatura e do período de incubação no crescimento do *Arthrobotrys oligospora*

Arthrobotrys oligospora foi cultivado em meio líquido de Czapek suplementado com 200 µg das vitaminas (biotina e tiamina) e mantido em BOD com às temperaturas de 20° C, 25° C, 30° C e 35° C por 8 dias. Foi avaliado conforme descrito no item 5.2.

5.9. Efeito do pH no meio de cultura no crescimento do *Arthrobotrys oligospora*

Para a analisar o efeito do pH inicial sobre o crescimento, o fungo *A. oligospora* foi cultivado em meio de cultura de Czapek líquido suplementado com 200 µg de biotina e 200 µg de tiamina com o pH ajustado para os seguintes valores: 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0 e 8,0 empregando-se soluções de HCl 1,0 M ou NaOH 1,0 M. Para todos os tratamentos foi preparada uma repetição a mais e após a esterilização, o pH do meio de cultura foi novamente medido. Como não houve variação por tanto não foi necessário corrigir o pH depois da autoclavagem com estas soluções. O fungo foi inoculado e a seguir incubado por 8 dias à temperatura de 30° C. Foi avaliado conforme descrito no item 5.2.

6. Meios utilizados para se determinar a atividade enzimática extracelular do fungo *Arthrobotrys oligospora*

As atividades celulolítica (ROMERO et al. 1999) e a-amilolítica (DOMINGUES & PERALTA, 1993) foram determinadas no meio de cultura de Czapek líquido suplementado com 200 µg de biotina e 200 µg de tiamina.

6.1. Determinação da atividade enzimática do *Arthrobotrys oligospora*

6.1.1. Determinação da a-amilase

A atividade da a-amilase foi determinada no meio de cultura segundo a metodologia de JONES et al. (1967) utilizando-se como substrato (amido solúvel, 0,15 g; 0,6 g de KH_2PO_4 ; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 200 mM em 100 mL de água destilada e pH 6,0. Para a reação utilizou-se uma mistura de reação (iodeto de potássio, 6 g + iodo, 0,6 g em 100 mL de água destilada. 1,0 mL do substrato, 1,0 mL da enzima incubando-se por 60 minutos a 37° C.

6.1.2. Determinação da β-amilase

A atividade da β-amilase foi determinada no meio de cultura pelo método do DNS (3,5 Di - Nitro - Salicílico) segundo MILLER (1959) utilizando-se como substrato (amido solúvel, 0,15 g; 0,6 g de KH_2PO_4 ; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 200 mM em 100 mL de água destilada e pH 6,0. Para o preparo da reação utilizou-se como substrato reagente de iodo (iodeto de potássio, 2 g; iodo, 0,2 g em 100 mL de água destilada Para a reação foi utilizado 1,0 mL de reagente iodo em solução 99,0 mL de HCl 0,05 N. Na atividade foi usada 1,0 mL do substrato e 5,0 mL de água destilada, agitou-se e em seguida realizou-se a leitura a 660 nm de absorbância.

6.1.3. Atividade celulolítica

A determinação da atividade da celulase no meio de cultura foi realizada seguindo a metodologia de ROMERO et al. (1999), utilizando-se como substrato = (Celulose Microcristalina 2% em tampão Citrato de sódio 0,05 M pH 4,8)

A determinação da endoglucanase no meio de cultura foi realizada pelo método do DNS p/ determinação de açúcares redutores segundo MILLER, (1959), utilizando-se como substrato o CMC (CarboxiMetilCelulose) 2% em tampão Citrato de sódio 0,05 M pH 4,8)

V. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA

1. Frequência de fungos nematófagos em diferentes solos

- O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com 5 repetições cada, e a análise estatística foi realizada utilizando-se o programa SAS (1990). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey.
- As contagens dos fungos foram transformadas em $\log(x+1)$ onde o valor de x é igual ao número de UFC g^{-1} solo seco. Uma análise de correlação geral dos dados também foi realizada.

2. Caracterização fisiológica do *Arthrobotrys oligospora*

- Para a análise estatística dos dados, foi empregado o delineamento experimental inteiramente casualizado, com três repetições. Os resultados foram submetidos à análise de variância e de regressão utilizando-se o programa SAS e as médias comparadas pelo teste de Tukey.

VI. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Frequência de fungos nematófagos em diferentes solos

O conteúdo de nutrientes foi maior no solo sob alface (Tabela 6). O alto teor de partículas finas presente no solo sob alface possibilitou o acúmulo de matéria orgânica, cálcio e fósforo, resultando em alto valor de capacidade de troca catiônica e de valores relativamente reduzidos de acidez potencial (H + Al).

Com relação as características físicas do solo, as amostras foram classificadas como textura média e argilosa, sendo a maioria como argilosa (Tabela 6).

Tabela 6. Composição físico-química dos solos sob alface, banana, grama-batatais e Impatiens.

Características		Alface	Banana	Grama-batatais	Impatiens
Granulométrica					
Argila	g/Kg	160	520	440	410
Limo (silte)	g/Kg	310	290	190	120
Areia fina	g/Kg	240	80	160	200
Areia grossa	g/Kg	290	110	210	270
Química					
pH em CaCl ₂	-	6,4	5,0	5,4	5,6
Matéria orgânica	g/dm ⁻³	86	35	38	26
P resina	mg/dm ⁻³	3360	32	33	52
K	mmol _c /dm ⁻³	34,0	1,9	4,2	1,4
Ca	mmol _c /dm ⁻³	1300	32	39	55
Mg	mmol _c /dm ⁻³	70	19	22	16
H+Al	mmol _c /dm ⁻³	16	52	34	25
SB	mmol _c /dm ⁻³	1404,0	52,9	65,2	72,4
T	mmol _c /dm ⁻³	1420,0	104,9	99,2	97,4
V	%	99	50	66	74
Classe Textural		Média	Argilosa	Argilosa	Argilosa

O solo cultivado sob alface propiciou a maior biodiversidade de fungos totais e fungos nematófagos do que o solo cultivado com as três outras culturas (Tabela 7). Talvez devido ao maior teor de nutrientes do solo (Tabela 6). Não houve grande diferenciação de biodiversidade de fungos entre solos rizosféricos do que solos não rizosféricos quando comparados com todas as culturas estudadas.

Nas contagens dos fungos totais houve uma variação, sendo o número de UFC do solo sob alface 3,3 a 4,5 vezes para o solo não-rizosférico e de 1,9 a 3,7 vezes maior para o solo rizosférico (Tukey, $p < 0,05$), respectivamente, (Tabela 7). Da mesma forma que os fungos totais, o número de populações de fungos com atividade nematófaga também predominaram no solo sob alface e o aumento verificado foi de 2,2 a 6,0 vezes no solo não-rizosférico e de 2,1 a 4,3 vezes no solo rizosférico em relação aos outros solos (Tabela 7).

Tabela 7. Fungos totais e nematófagos das frações não rizosférica e rizosférica dos solos sob alface, banana, grama-batatais e Impatiens.

Culturas	FT_NR ¹ UFC/gss	FT_R ¹ UFC/gss	FN_NR ¹ UFC/gss	FN_R ¹ UFC/gss
Alface	31,2 x 10 ⁵ A	25,6 x 10 ⁵ A	6,82 x 10 ⁵ A	8,78 x 10 ⁵ A
Banana	9,07 x 10 ⁵ B	9,96 x 10 ⁵ B	2,71 x 10 ⁵ B	2,13 x 10 ⁵ B
Grama batatais	9,40 x 10 ⁵ B	6,93 x 10 ⁵ B	3,11 x 10 ⁵ B	2,02 x 10 ⁵ B
Impatiens	6,88 x 10 ⁵ B	13,8 x 10 ⁵ B	1,13 x 10 ⁵ C	4,27 x 10 ⁵ B
Teste F	41,68**	7,42**	22,52**	7,49**
Desvio Padrão	0,02	0,03	0,03	0,05
(CV)	0,94	1,89	1,77	2,94

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade. ¹ fungos totais não rizosféricos, FT_NR; fungos totais rizosféricos, FT_R; fungos nematófagos não rizosférico, FN_NR; fungos nematófagos rizosférico, FN_R.

A literatura consultada mostrou que alguns fatores do solo podem contribuir no aumento das contagens dos fungos nematófagos. De acordo com GRAY (1985), os fungos predadores foram mais influenciados pelo pH e a umidade do que por outros fatores do solo e que a matéria orgânica apenas influenciou nos fungos endoparasitas formadores de conídios. GRAY (1988), também relacionou a presença de fungos nematófagos endoparasitas com solos com alta concentração de N, P e K. Aumento no número de fungos predadores e endoparasíticos, bactérias e nematóides foi atribuído ao

aumento no conteúdo de matéria orgânica pela aplicação de esterco bovino no solo (DACKMAN et al., 1987). Portanto, as características de fertilidade do solo sob alface apontadas anteriormente influíram tanto nas contagens de fungos totais como dos fungos nematófagos (Tabela 7).

Neste trabalho, os fungos de cada solo foram isolados com base na morfologia das colônias e sua atividade predadora contra o nematóide *Panagrellus redivivus* foi posteriormente avaliada. Do total de fungos isolados do solo rizosférico, 23 a 41% apresentaram atividade predadora contra *P. redivivus* após 7 dias da inoculação do nematóide e, no solo rizosférico, de 23 a 34% (Tabela 7). Verificou-se que não houve um padrão nestes resultados quando se comparou o solo rizosférico com o não rizosférico. Enquanto no solo rizosférico, foi constatado decréscimo na seguinte ordem: alface > Impatiens > grama batatais > bananal, no solo não rizosférico observou-se a seguinte seqüência: grama batatais > bananal > alface > Impatiens. As porcentagens obtidas neste trabalho foram bem maiores que as encontradas nas amostras de solo e fezes de carneiros no Irã que foi constatado de 1,5% do total de fungos isolados com atividade nematófaga contra *Haemonchus contortus*, em 150 amostras de solos de pastagens e de 138 amostras de fezes de carneiros (GHAHFAROKHI et al., 2004).

DIAS & FERRAZ (1993) pesquisaram algumas espécies de *Arthrobotrys* (*A. musiformis*, *A. conoides*, *A. robusta*, *A. thaumasia*, *A. irregularis*) para o controle de *Meloidogyne incognita* e também constataram uma redução significativa do número de nematóides.

A distribuição do número e dos gêneros de nematóides nas frações rizosférica e não rizosférica dos solos sob alface, bananal, Impatiens e grama batatais encontra-se na (Tabela 8). Dos diferentes gêneros *Helicotylenchus*, *Meloidogyne*, *Paratylenchus*, *Pratylenchus*, *Rotylenchulus* e *Tylenchus*, com exceção da raiz de alface, o nematóide *Helicotylenchus* foi encontrado em todos os solos e raízes (Tabela 8.). Em seguida, excetuando as raízes de bananal, Impatiens e o solo sob grama batatais, *Rotylenchulus* foi encontrado em todos os demais ambientes. *Meloidogyne*, *Paratylenchus*, *Pratylenchus*, e *Tylenchus* tiveram uma distribuição mais limitada nos solos e raízes das diversas plantas. Dos seis gêneros, cinco foram observados sob solo de Impatiens e de raiz na grama batatais, quatro sob solo no bananal, três no solo sob Impatiens e grama batatais, dois sob raiz Impatiens e um gênero de nematóide nas amostras de raiz de alface e bananal (Tabela 8.). Foi encontrada uma variação de 11,13 a 257,46 nematóides 100 g⁻¹ solo seco e de 18,16 a 4.070,33 nematóides 100 g⁻¹ raízes secas, o que

corresponde a um aumento, em média, de 11,5 vezes no número de nematóides nas raízes em relação ao do solo.

Diferentes gêneros de nematóides foram extraídos das amostras de solos e de raízes cultivados sob alface, banana, grama e Impatiens. Como observado na Tabela 8, também foram encontrados quatro gêneros nas amostras de solo de banana. O nematóide que causa prejuízo econômico em espécies hortícolas é o que causa engrossamento nas raízes denominados de galhas (*Meloidogyne* spp) e reproduz rapidamente no solo (CAMPOS et al, 2001). Esse gênero não foi encontrado na amostra de solo sob alface nem de raiz (Tabela 8).

Tabela 8. Frequência e gêneros dos nematóides encontrados nas amostras de solo e raízes de alface, banana, grama-batatais e Impatiens.

Gêneros Nematóides	Número de Nematóides/100 g solo seco							
	Alface		Impatiens		Banana		Grama-batatais	
	Solo	Raiz	Solo	Raiz	Solo	Raiz	Solo	Raiz
<i>Meloidogyne</i> sp.	-	-	25,39	4035,92	16,58	-	0,81	6,23
<i>Paratylenchus</i> sp.	-	-	-	-	-	-	3,26	176,64
<i>Pratylenchus</i> sp.	-	-	0,95	-	0,97	-	-	23,48
<i>Rotylenchulus</i> sp.	2,83	18,16	55,12	-	132,43	-	-	23,48
<i>Helicotylenchus</i> sp.	6,94	-	1,93	34,41	107,48	154,98	28,58	1,59
<i>Tylenchus</i> sp.	1,36	-	4,74	-	-	-	-	-
Total	11,13	18,16	88,13	4070,33	257,46	154,98	32,65	231,43

Excetuando-se a atividade da invertase, de modo geral, a atividade das demais enzimas foi maior no solo sob alface (Tabela 9). Além do mais, excluindo a protease, a atividade das demais enzimas decresceram na seguinte ordem: alface > grama-batatais > bananal > Impatiens. Contrariando a expectativa, a atividade da invertase foi menor no solo sob alface e diferiu significativamente ($p < 0,05$) da atividade encontrada nos demais solos. Observou-se ampla variação da atividade da amilase de 760,3 a 2705,6 μg glicose g^{-1} solo seco, contudo, não foi observada diferença significativa entre as atividades encontradas nos solos sob bananal e Impatiens (Tabela 9). A atividade da desidrogenase foi semelhante nos solos sob alface, banana e grama-batatais, mas diferiu das atividades encontradas nos demais solos (Tabela 9).

O efeito da vegetação na atividade da lipase foi diferente das enzimas anteriores e diminuiu na seguinte ordem: alface, bananal, grama-batatais e Impatiens, contudo não foi encontrada diferença significativa entre as atividades dos solos sob bananal e grama-batatais (Tabela 9).

Nos solos estudados, a atividade da lipase, que variou de 181,86 a 357,95 μg p-nitrofenol g^{-1} solo seco, pode ser considerada dentro os parâmetros do estudo realizado por MARGESIN *et al.* (2002). A maior atividade foi encontrada no solo sob alface e diminuiu na seguinte ordem alface > bananal > grama-batatais > beijo (Tabela 9).

Contudo, não foi encontrada diferença significativa entre as atividades encontrada nos solos sob bananal e grama-batatais. Esta tendência assemelha-se às contagens dos fungos totais e nematófagos encontradas no solo não-rizosférico, sugerindo uma influência destes fungos na atividade lipolítica.

A variação na atividade da celulase (13,9 a 196,7 μg glicose g^{-1} solo seco) foi semelhante a da endoglucanase (22,9 a 197,6 μg glicose g^{-1} solo seco). Porém, enquanto a atividade da endoglucanase diferiu entre os solos estudados, apenas foi encontrada diferença significativa ($p < 0,05$) entre as atividades da celulase do solo sob alface com a dos demais solos (Tabela 9).

A atividade da protease apresentou uma variação nos diferentes solos de 35,29 a 85,11 μg tirosina g^{-1} solo seco mostrando que houve diferença significativa ($P < 0,05$) por influência da vegetação (Tabela 9). Apenas as atividades encontradas nos solos sob grama-batatais e Impatiens não diferiram significativamente entre si.

Diferentes fatores têm sido mencionados por influenciar a atividade enzimática, incluindo o número de microrganismos, o conteúdo de matéria orgânica, a composição química do solo e a vegetação predominante.

Nas amostras de solos sob alface e grama, a amilase (Tabela 9) e o carbono solúvel (Figura 3) foram as atividades enzimáticas que apresentaram os maiores índices.

Tabela 9. Atividade enzimática da amilase, desidrogenase, lipase, invertase, protease, celulase e da endoglucanase do solo sob alface, banana, grama-batatais e Impatiens.

Culturas	Amil. µg C g ⁻¹ ss 24 h ⁻¹	Desidr. TFF g ⁻¹ ss 24 h ⁻¹	Lipase µg pNF g ⁻¹ ss 10 minutos	Invert. µg C g ⁻¹ ss 3 h ⁻¹	Prot. µg tirosina g ⁻¹ ss h ⁻¹	Celul. µg C g ⁻¹ ss 3 h ⁻¹	Endogl. µg C g ⁻¹ ss h ⁻¹
Alface	2705,56 A	164,91 A	357,95 A	322,72 B	85,11 A	102,87 A	197,58 A
Banana	860,03 C	130,49 A	258,51 B	1248,48A	35,29 C	15,60 BC	76,13 C
Grama	1868,62 B	163,55 A	246,13 B	1119,95A	54,77 B	35,94 B	122,86 B
Impatiens	760,26 C	55,62** B	181,86 C	1108,26A	44,74 BC	8,35 C	22,92 D
Teste F	228,32**	34,19**	51,53**	71,10**	34,68**	55,59**	47,74**
Desvio Padrão	136,07	19,62	22,67	112,14	8,20	12,92	23,97
C.V.	8,79	15,26	8,68	11,81	14,92	31,74	22,86

[†]Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade. amilase, Amil.; desidrogenase, Desidr.; invertase, Invert.; protease, Prot.; celulase, Celul. endoglucanase, Endogl.

A influência dos microrganismos na atividade enzimática tem sido relatada por vários autores. A variação da atividade da desidrogenase foi relacionada ao crescimento da população microbiana e ao aumento no conteúdo de umidade do solo (QUILCHANO & MARANÓN, 2002; RALTE et al., 2005). Da mesma forma que a desidrogenase, o aumento da atividade da amilase pode ser uma resposta ao incremento das contagens dos fungos totais e nematófagos da fração de solo não rizosférica. FAUCI & DICK (1994) encontraram uma correlação entre a atividade da protease com o conteúdo do carbono da biomassa indicando uma relação íntima com a atividade da comunidade microbiana. REZENDE et al. (2004) relataram que a atividade da protease correlacionou significativamente e positivamente com a atividade respiratória e biomassa microbiana o que mostra uma dependência direta no crescimento de populações microbianas.

O efeito da vegetação na atividade da amilase foi relatado por DENG & TABATABAI (1996). Comparando-se solo plantado com braquiária, guandu ou na ausência de planta, verificou-se que as atividades da celulase e da urease não foram influenciadas pela vegetação, porém a atividade da amilase foi maior no solo não cultivado e a da protease em solo sob braquiária do que nos outros tratamentos (SANOMIYA & NAHAS, 2004).

No solo sob alface, o teor de umidade foi de 2,4 a 20,8 vezes (Figura 1) e o de matéria orgânica 1,3 a 2,1 (Figura 2) vezes maior que o encontrado nos demais solos. O

solo sob alface foi obtido de um cultivo comercial, por isso foram observados estes resultados e, além disso, considerável aumento nos componentes químicos.

A matéria orgânica tem sido apontada como um dos principais fatores influenciando o número de microrganismos em diferentes solos (PANSOMBAT ET AL., 1997). A matéria orgânica estimula a atividade biológica devido ao favorecimento do crescimento dos microrganismos. O conteúdo de matéria orgânica no solo sob alface foi maior que o encontrado nos demais solos (Figura 2).

O teor de carbono solúvel dos solos sob alface, banana, Impatiens e grama-batatais são mostradas na Figura 3. O teor de carbono orgânico é um fator importante para a atividade microbiana. Como observado por BONMATI et al. (1991), a atividade da protease correlacionou com o C orgânico e N total. GIANFREDA et al. (2005) obtiveram uma correlação entre a atividade da invertase e o C orgânico.

É inegável que a atividade das enzimas foi bastante influenciada pelo crescimento dos fungos totais e nematófagos como se pode depreender pela correlação altamente significativa e positiva obtida entre estas variáveis (Tabela 10).

Relatos mostraram que a atividade da protease aumentou com a adição de matéria orgânica no solo e pode ser considerada como o resultado do processo de mineralização pelos microrganismos do solo (FALIH & WAINWRIGHT, 1996; KANDELER et al., 1999). Segundo ARUNACHALAM et al. (1999), a atividade enzimática, a respiração, o número de populações de fungos e bactérias e a biomassa microbiana do solo foram influenciados por várias propriedades do solo, particularmente a concentração de nutrientes. O aumento da atividade da amilase e das celulases no solo sob alface pode ser devido ao aumento das contagens de fungos totais e nematófagos do solo não-rizosférico que foi estimulado pela maior quantidade de nutrientes deste solo e, entre eles, o fósforo. Em acordo com esta afirmação, foi relatado que a adição de adubo fosfatado influenciou aumentando as atividades da amilase e da celulase (SANOMIYA & NAHAS, 2004).

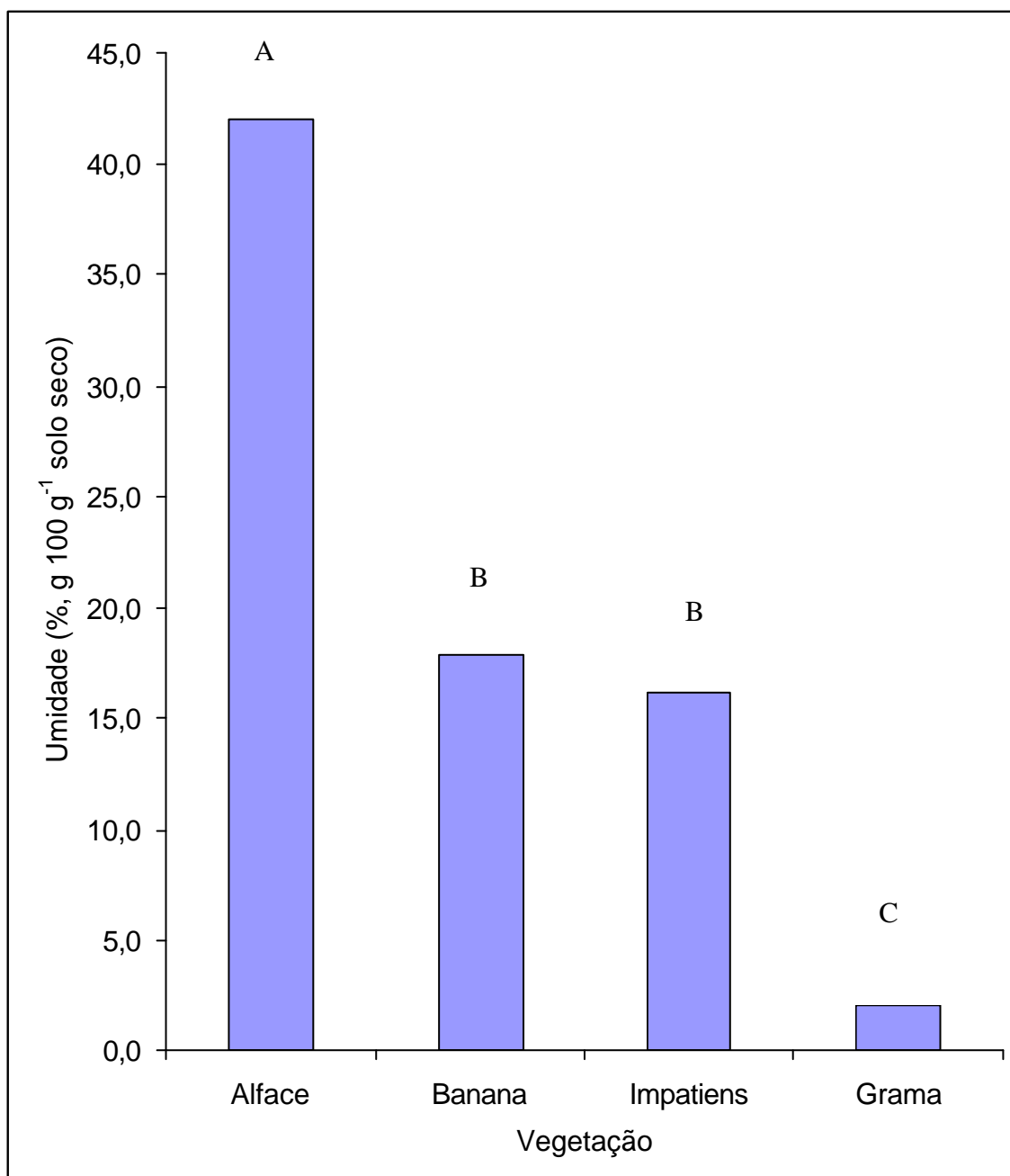


Figura 1. Teor de umidade das frações não rizosférica e rizosférica dos solos sob alface, banana, grama batatais e Impatiens.

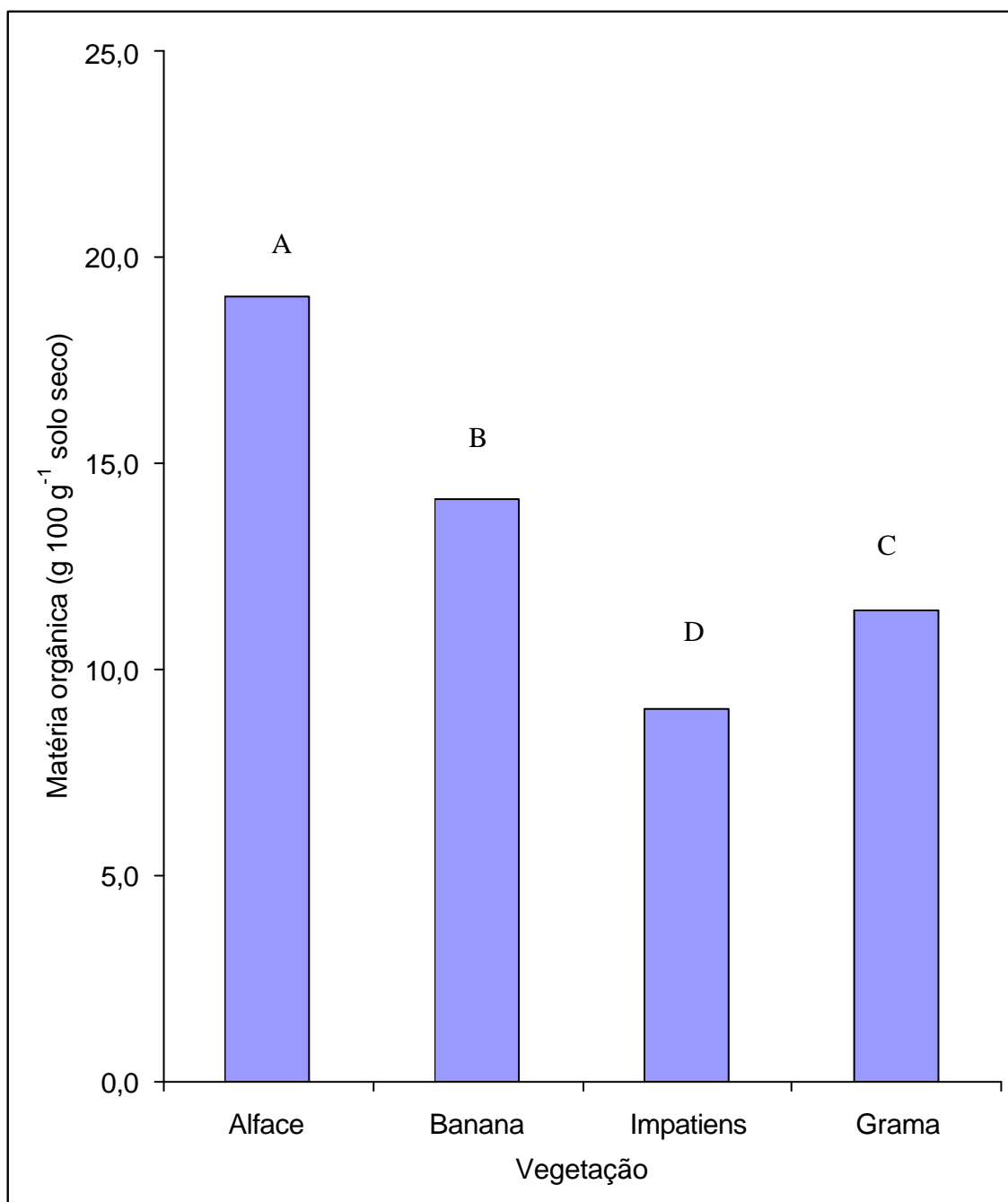


Figura 2. Teor de matéria orgânica das frações não rizosférica e rizosférica dos solos sob alface, banana, grama batatais e Impatiens.

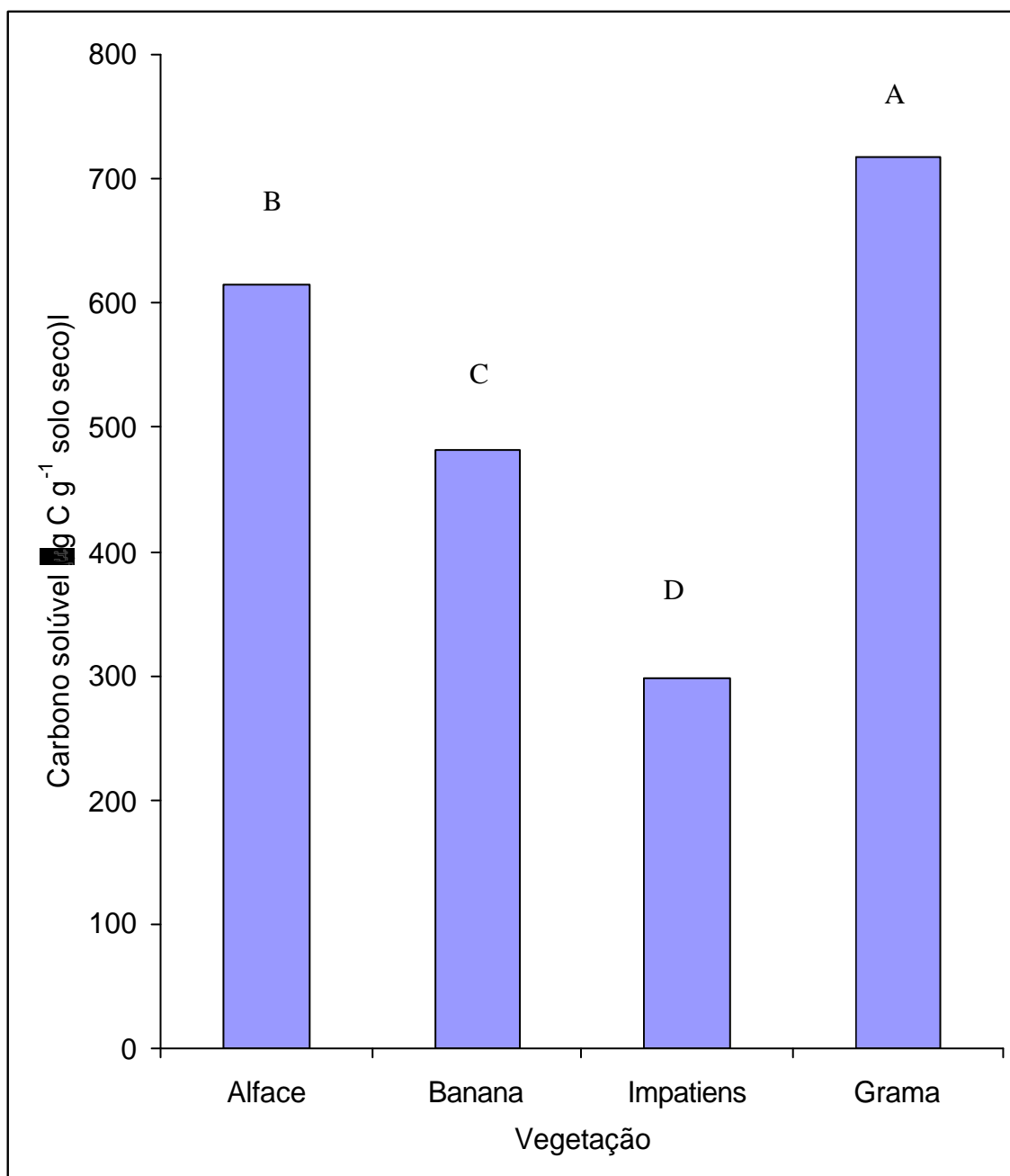


Figura 3. Carbono solúvel das frações não rizosférica e rizosférica dos solos sob alfaca, banana, grama batatais e Impatiens.

Analisando-se os dados gerais de correlação simples (Tabela 10) houve correlação positiva entre quase todas as variáveis estudadas, apresentando um grau de significância ($P < 0.001$; $P < 0.01$ e $P < 0.05$). Não houve correlação apenas dos FT_R com a desidrogenase nem com a endoglucanase; também não se correlacionou a desidrogenase com a invertase e nem com a umidade.

Tabela 10. Coeficiente de correlação simples entre as variáveis dos solos sob. alface, banana, grama-bataiais e Impatiens.

	FT_R	FN_NR	FN_R	M.O.	C. sol.	Desidr.	Amil.	Invert.	Celul.	Endogl.	Lipase	Quit.	Prot.	Umid.
FT_NR	0,74***	0,90***	0,80***	0,88***	0,38ns	0,52*	0,85***	-0,94***	0,93***	0,80***	0,85***	0,11ns	0,86***	0,86***
FT_R	-	0,48*	0,82***	0,56*	-0,08ns	0,13ns	0,51*	-0,74***	0,61**	0,41ns	0,46*	-0,01ns	0,64**	0,77***
FN_NR	-	-	0,62**	0,90***	0,57**	0,68***	0,87***	-0,84***	0,92***	0,89***	0,94***	0,25ns	0,83***	0,72***
FN_R	-	-	-	0,63**	-0,01ns	0,14ns	0,61**	-0,82***	0,76***	0,52*	0,58**	-0,18ns	0,73***	0,80***
M.O.	-	-	-	-	0,44ns	0,63**	0,72***	-0,76***	0,86***	0,81***	0,93***	0,19ns	0,66***	0,80***
C. sol.	-	-	-	-	-	0,91***	0,70***	-0,28ns	0,46*	0,76***	0,54*	0,70***	0,45*	-0,05ns
Desidr.	-	-	-	-	-	-	0,70***	-0,42ns	0,58**	0,83***	0,67**	0,62**	0,52*	0,16ns
Amil.	-	-	-	-	-	-	-	-0,82***	0,84***	0,89***	0,80***	0,42ns	0,88***	0,53*
Invert.	-	-	-	-	-	-	-	-	-0,90***	0,72***	-0,76***	0,01ns	0,87***	0,83***
Celul.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,88***	0,87***	0,20ns	0,86***	0,77***
Endogl.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,84***	0,48*	0,78***	0,54*
Lipase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,23ns	0,71***	0,71***
Quit.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,17ns	-0,20ns
Prot.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,65**

*, significativo ($P<0,05$); **, significativo ($P<0,01$); ***, significativo ($P<0,001$); ns, não significativo; fungos totais não rizosféricos, FT_NR;

fungos totais rizosféricos, FT_R; fungos nematófagos não rizosférico, FN_NR; fungos nematófagos rizosférico, FN_R; matéria orgânica, M.O.; carbono solúvel, C. sol.; desidrogenase, Desidr.; amilase, Amil.; invertase, Invert.; celulase, Celul.; endoglucanase, Endogl.; quitinase, Quit.; protease, Prot. e umidade, Umid.

2. Caracterização fisiológica de *Arthrobotrys oligospora*

A. oligospora foi crescido pelo período de 1 a 15 dias e os resultados obtidos de massa micelial e pH final estão demonstrados na (Figura 4). Estes resultados foram submetidos á análise de regressão, verificando-se que, com base nos valores de R^2 (Figura 4), a produção micelial ajustou-se a uma curva de 3º grau. Esta curva mostra uma fase de crescimento ascendente até o 14º dia, uma fase estacionária, do 14º ao 17º dia, e uma fase de declínio, após o 17º dia (dados não mostrados). Nas condições deste estudo, pode-se deduzir que até o 14º dia o fungo estaria apto a produzir as enzimas e outros produtos característicos do metabolismo primário (CARLILE & WATKINSON, 1996) e necessários à predação dos nematóides O crescimento de *A. conoides* foi semelhante ao do *A. oligospora* deste estudo, obtendo-se aumento linear de biomassa até o 13º dia, seguida de uma fase estacionária (COSCARELLI & PRAMER, 1962).

Os valores de pH medidos diariamente, após a separação do micélio, mostraram uma alcalinização progressiva do meio de cultivo que culminou no 6º dia de incubação (pH 8,5), diminuindo, posteriormente, até 8,0 no 15º dia (Figura 4).

Dentre diferentes meios de cultura (BDA, BDA-peptona, CMA, fubá-ágar e YPSSA) utilizados, os dois últimos foram os que propiciaram maior crescimento e esporulação (DIAS & FERRAZ, 1993). Estes autores concluíram que a temperatura de 25º C foi a melhor para o crescimento destes fungos e que o pH do meio de cultura não influenciou a produção micelial. Resultado semelhante foi obtido no presente estudo (Figura 5).

RIBEIRO & CAMPOS (1993) estudaram o efeito da temperatura em fungos nematófagos endoparasitas e verificaram o intervalo da temperatura ótima foi entre 25 a 28º C. Também observaram que as temperaturas de 15 a 35º C propiciaram o menor crescimento para os fungos estudados. CASTRO et al 2000 também verificaram que a temperatura de 25º C foi a que favoreceu melhor o crescimento de *Arthrobotrys musiformis*. Resultados semelhantes também foram observados para as diferentes temperaturas estudadas em meio líquido, sendo a 25º C a que proporcionou o maior crescimento do *A. oligospora* em relação as demais temperaturas estudadas (Figura 5).

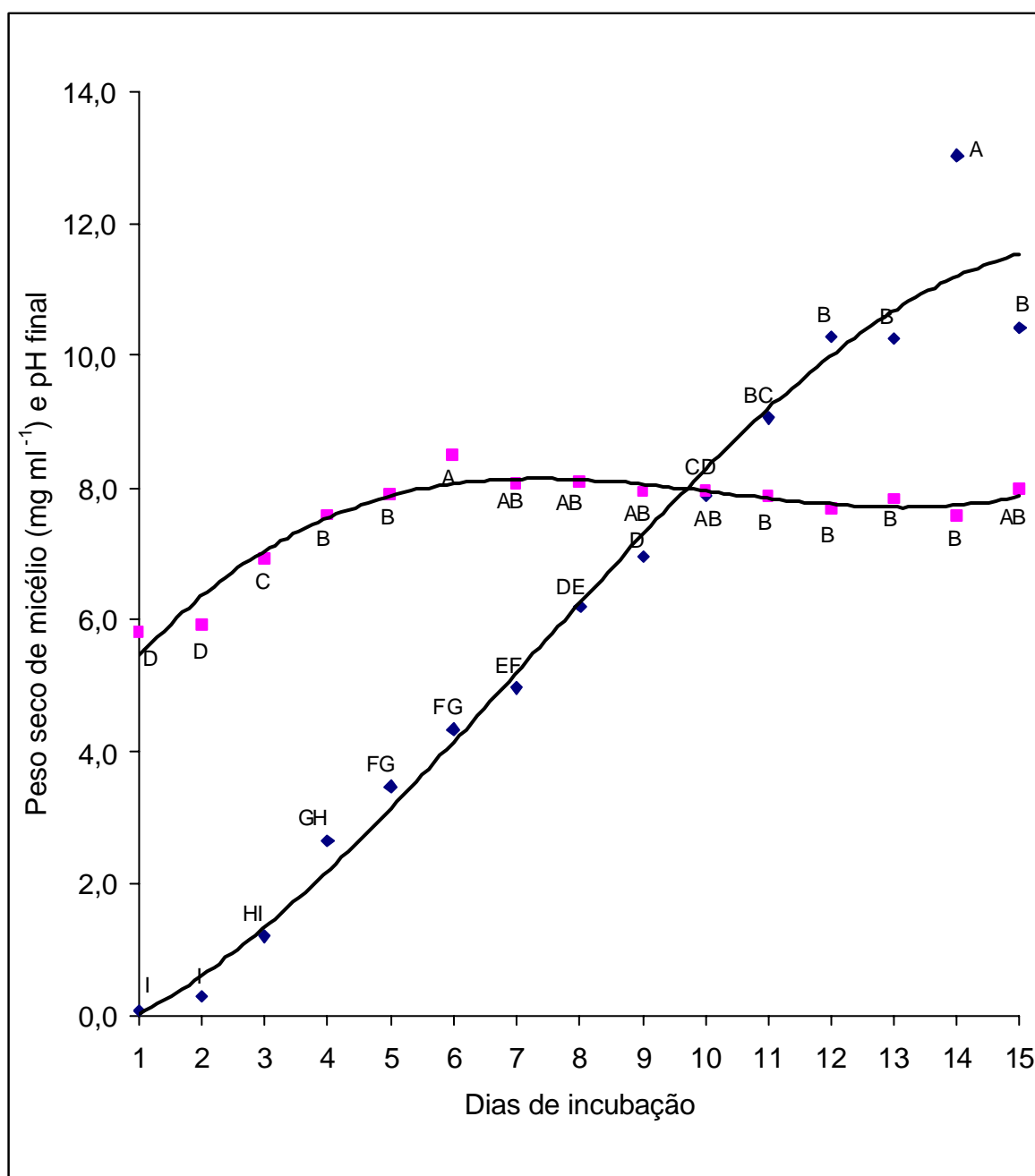


Figura 4. Crescimento do *Arthrobotrys oligospora* em meio de cultura suplementado com sacarose como fonte de carbono □ pH final e ◇ micélio. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Observou-se ainda que, com o aumento da temperatura a partir de 30° C, houve um decréscimo no crescimento do *A. oligospora* como demonstra-se na (Figura 5).

A temperatura ótima de crescimento do fungo *A. oligospora* foi de 25° C (6,4 mg mL⁻¹ peso seco) e decresceu de 10 %, 26 % e 71 % quando o fungo foi incubado nas temperaturas de 30° C, 20° C e 35° C, respectivamente (Figura 5). Contudo, não foi encontrada diferença significativa entre a produção micelial encontradas nas temperaturas de 25 e 30° C. A tendência da curva obtida com os resultados do pH final foi semelhante à do crescimento do fungo, embora o decréscimo do pH tenha sido menor para as mesmas temperaturas: 4%, 7% e 26%. Também, não foi encontrada diferença significativa entre os valores de pH final nas temperaturas de 25 e 30° C. Contrastando-se com os resultados obtidos neste estudo, a temperatura ótima de crescimento radial de um isolado de *A. oligospora* crescido em corn-meal agar (CMA) e faecal agar, após 14 dias de incubação, foi de 20 °C quando comparada com 10° C e 15° C (FERNÁNDEZ et al., 1999). O crescimento radial de *A. oligospora* em meio CMA ocorreu na temperatura entre 20° C e 25° C e a captura de *Heligmosomoides polygyrus* entre 25° C e 28° C (MORGAN et al., 1997). A temperatura ótima de crescimento de *Arthrobotrys conoides* em meio de cultura líquido foi de 28° C (COSCARELLI & PRAMER, 1962), portanto uma temperatura mais próxima à encontrada neste trabalho. O maior crescimento e esporulação foi também obtido na temperatura de 25° C por diferentes espécies de *Arthrobotrys* cultivadas em meio sólido (DIAS & FERRAZ, 1993).

Os valores de pH medidos diariamente, após a separação do micélio, mostraram uma alcalinização progressiva do meio de cultivo que culminou no 6° dia de incubação (pH 8,5), diminuindo, posteriormente, até 8,0 no 15° dia (Figura 6). Os resultados obtidos com os valores do pH final também se ajustaram a uma curva de 3° grau (Figura 6). Possivelmente, o aumento do pH pode ser resultante da absorção seletiva de íons do meio de cultura (AOUADJ et al., 2001).

Constatou-se um aumento do crescimento de 49 vezes no 6° dia de incubação, quando foi observado o valor máximo de pH (pH = 8,5) e de 117 vezes no 15° dia em relação ao peso de micélio observado no 1° dia de incubação. Portanto, nestas condições, o aumento do pH final observado no meio de cultura não deve ter influído no crescimento do fungo. A partir do 6° dia de incubação, não houve variação no pH final (Tukey, $p < 0,05$).

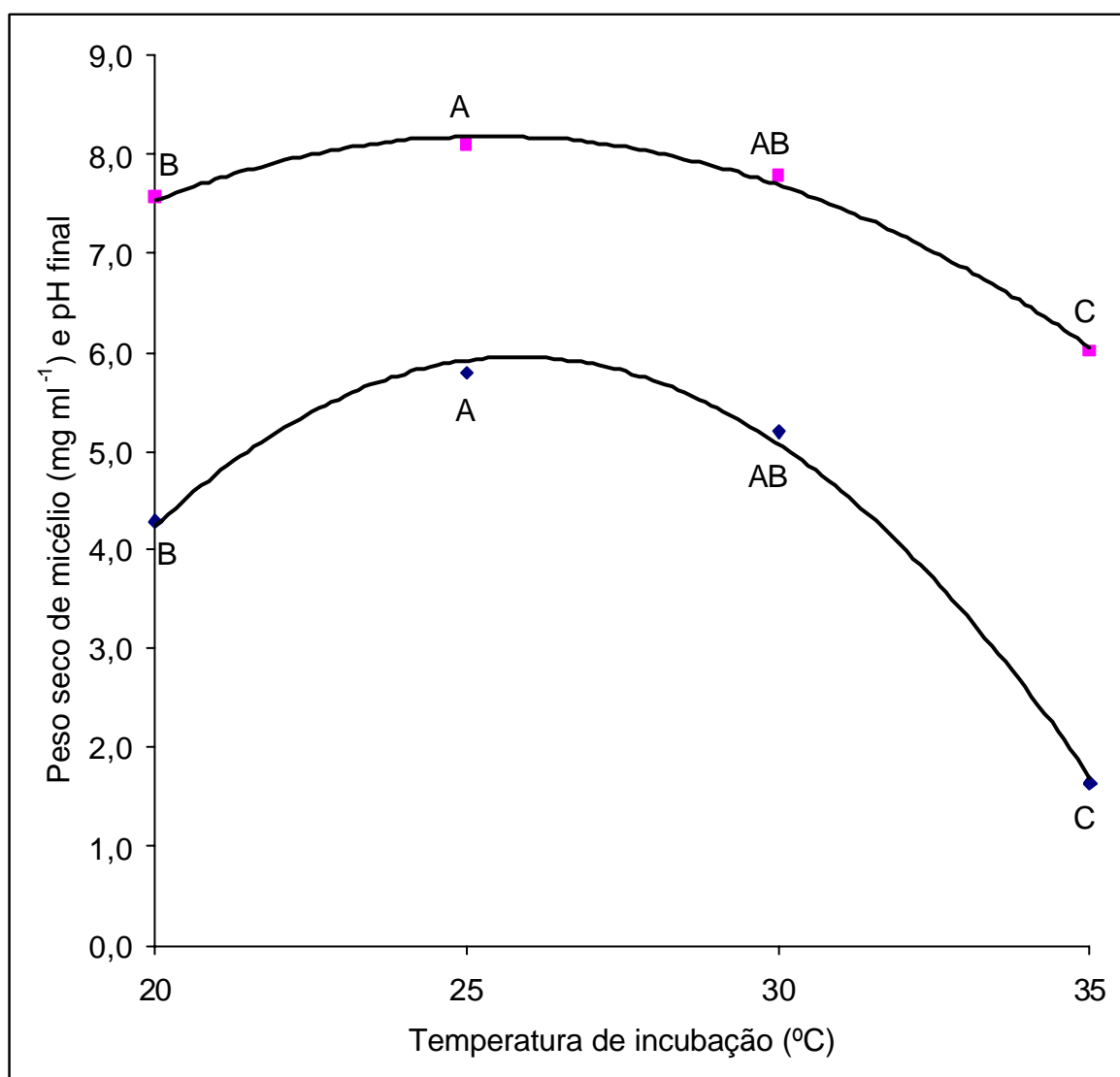


Figura 5. Efeito da temperatura no crescimento do *Arthrobotrys oligospora* : pH final e ? micélio. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Os resultados do efeito do pH inicial do meio de cultivo sobre o crescimento do fungo e o pH final do meio de cultura estão resumidos na (Figura 6). O maior crescimento de *A. oligospora* ocorreu em pH inicial 5,0, obtendo-se 6,4 mg mL⁻¹ peso seco. Este resultado assemelha-se ao obtido por COSCARELLI & PRAMER, 1962 onde verificaram que embora não tenha sido encontrada diferença com *Arthrobotrys conoides* o crescimento máximo deste fungo nos valores de pH inicial foi entre 4,0 e 6,0.

O crescimento do fungo foi reduzido de até 69 % e de até 21 % em relação ao ótimo, respectivamente, para os valores de pH inicial inferiores ou superiores ao ótimo, mostrando que o crescimento desse fungo é bastante sensível à variação dos valores de pH inicial.

Apesar do decréscimo de 21 % em relação ao ótimo, não houve diferença significativa no peso seco micelial. Diferentemente dos resultados obtidos neste estudo, nenhuma influência do pH no crescimento de diversas espécies de *Arthrobotrys* em meio sólido foi constatada, porém maior esporulação foi obtida nos valores de pH inicial 4 e 6 (DIAS & FERRAZ, 1993).

Acompanhando o crescimento do fungo, observou-se aumento do pH final, que variou de 6,6 a 8,6 (Figura 6). Contudo, nenhuma diferença significativa no pH final foi observada a partir do pH inicial 4,0. Aparentemente, estes resultados contrapõem aos obtidos na (Figura 6). Porém, foi relatado que diferentes enzimas contidas nos esporos são ativadas ou desativadas durante as fases de germinação, crescimento e estacionária dos fungos (SCHMIT & BRODY, 1976).

Portanto, é possível admitir que as condições fisiológicas do fungo ora em crescimento podem ser diferentes das dos esporos inoculados no meio de cultura que devem responder de forma diferente à variação do pH inicial.

O melhor substrato tanto para a atividade da celulase quanto para endoglucanase foi a fonte de carbono carboximetil-celulose (Figura 7). A celulose microcristalina foi o substrato que apresentou maior peso seco do micélio do *A. oligospora* (Figura 7).

A amilase é uma enzima extracelular que catalisa a hidrólise do amido resultando na conversão do amido em diferentes fontes de carbono. Observou-se para a atividade da β -amilase e da α -amilase que o melhor substrato foi a maltose (Figura 8). Na inserção do peso seco do micélio e pH final tanto a sacarose quanto a maltose apresentaram as melhores fontes de carbono no crescimento do *A. oligospora* (Figura 8).

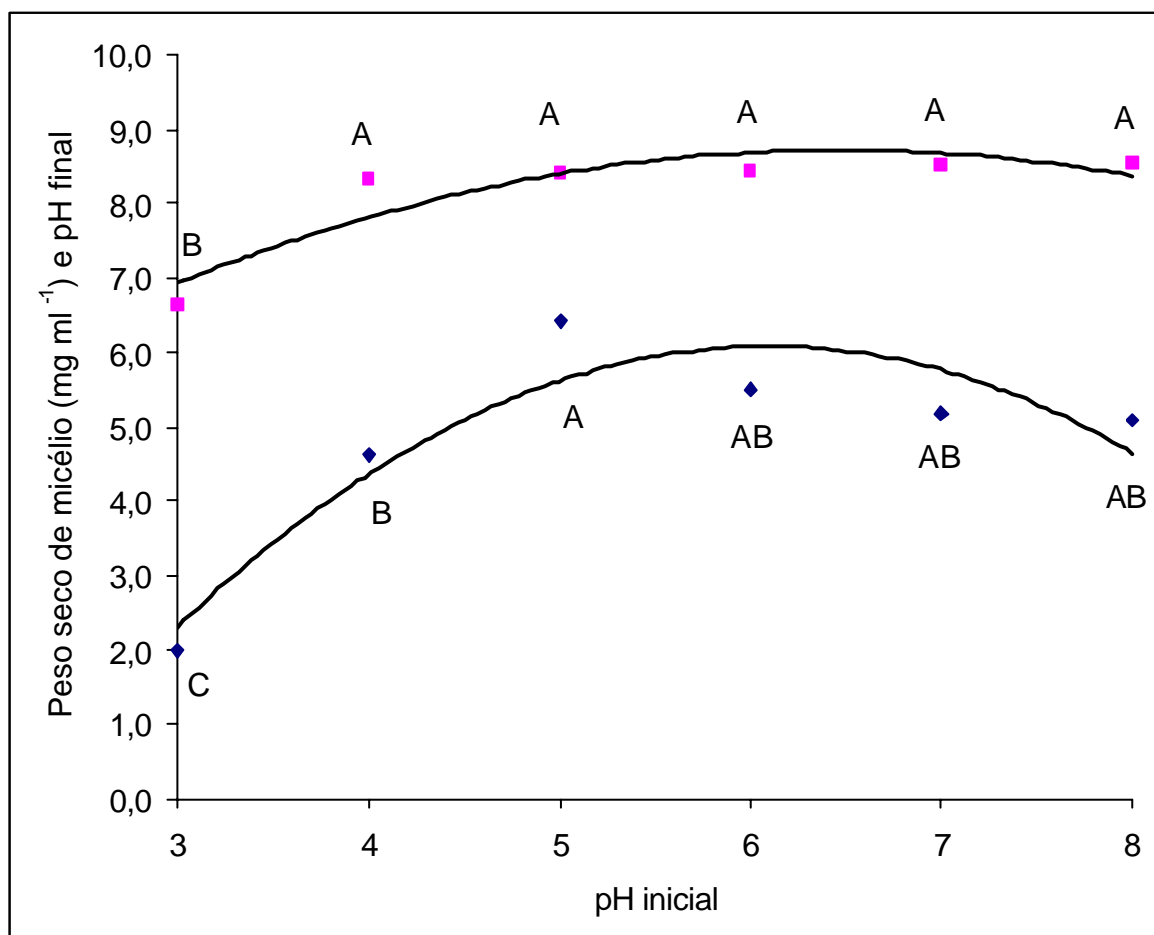


Figura 6. Efeito do pH inicial no crescimento do *Arthrobotrys oligospora* : pH final e ? micélio. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

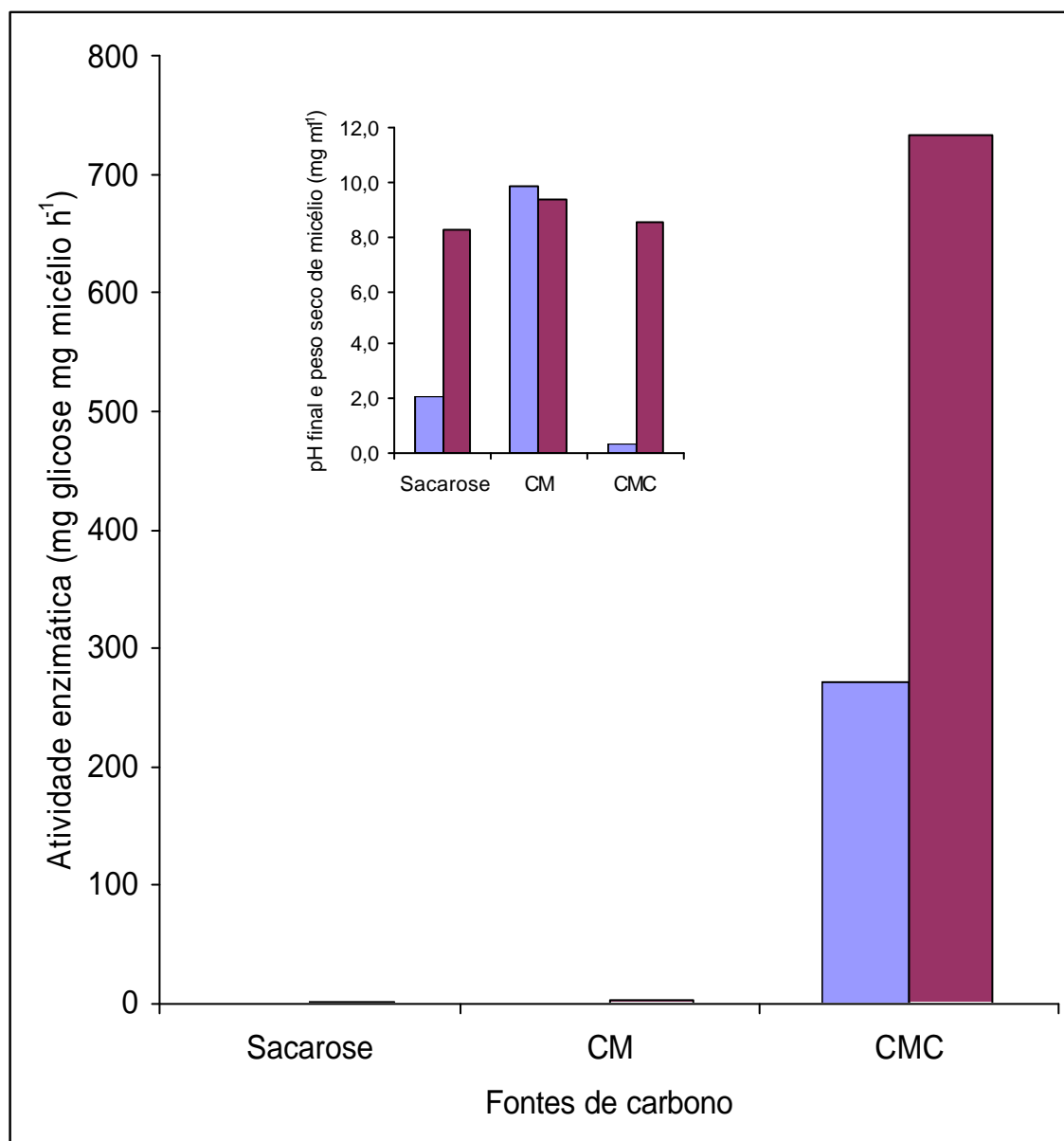


Figura 7. Atividade da celulase ■ da endoglucanase ■ do *Arthrobotrys oligospora* crescido em meios de cultura com sacarose, celulose microcristalina e carboximetil-celulose. Inserção, peso seco ■ e pH final ■.

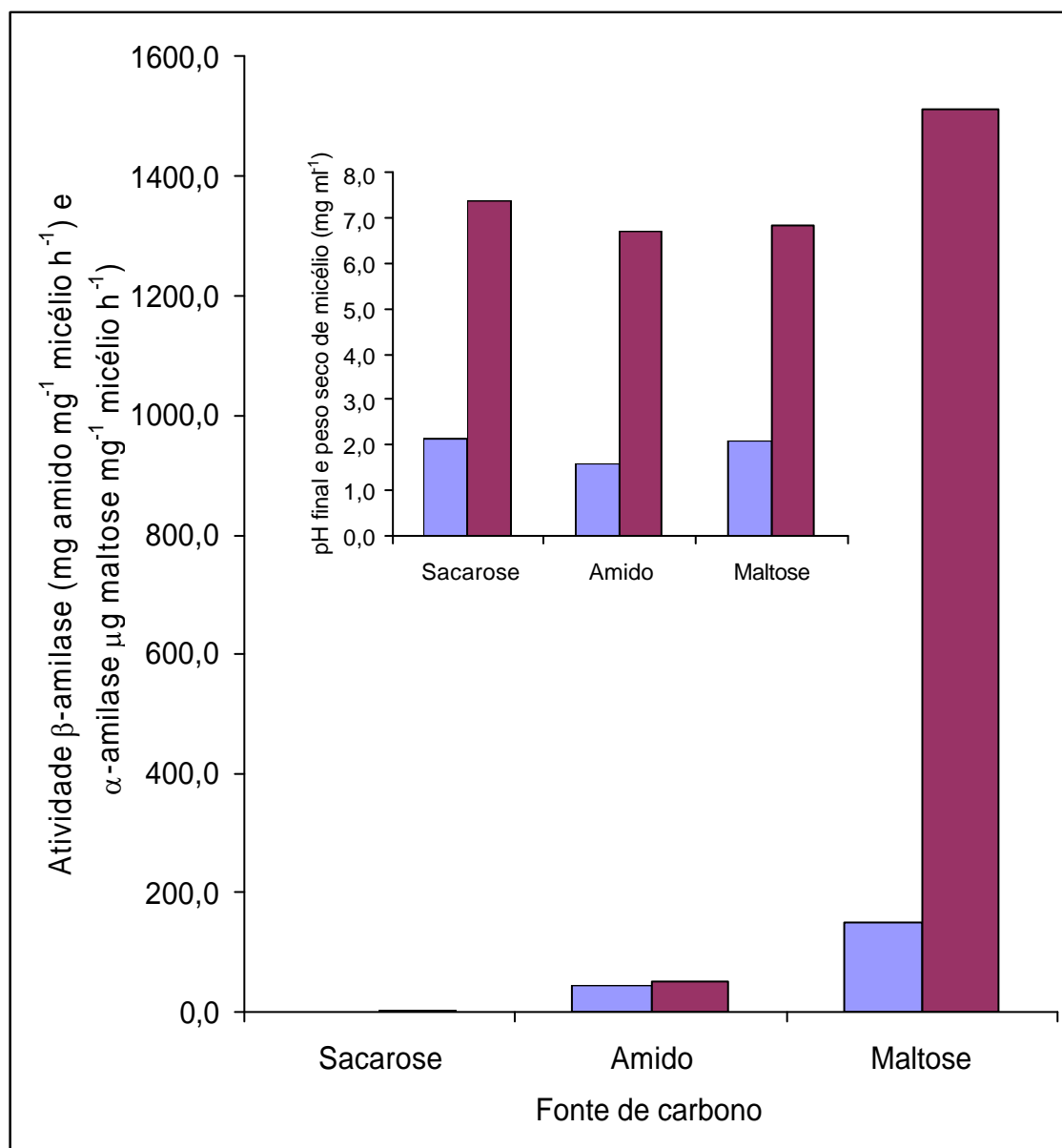


Figura 8. Atividade β -amilase ■ e α -amilase ■ do *Arthrobotrys oligospora* crescido em meios de cultura com sacarose, amido e maltose. Inserção, peso seco ■ e pH final ■.

Dentre as diferentes fontes de carbono testadas, a que apresentou o melhor crescimento para o fungo nematófago *A. oligospora* foi a maltose, seguida da sacarose que é o carboidrato presente na constituição do meio de cultura de Czapek (Tabela 11).

O maior crescimento do fungo foi observado com os dissacarídeos maltose (4,93 mg micélio mL⁻¹, peso seco) e sacarose (3,86 mg mL⁻¹), que não diferiram significativamente entre si ($p < 0,05$), seguidos da hexose frutose (3,11 mg mL⁻¹) (Tabela 11) e representam um aumento da massa micelial de 27,4, 21,4 e 17,3 vezes, respectivamente, em relação ao menor peso seco obtido com L-arabitol (0,18 mg mL⁻¹). A incorporação destes carboidratos em *A. oligospora* não tem sido muito bem elucidada. Em outros fungos ocorre através de sistemas induzidos de transporte ativo ou hidrolisados inicialmente por sacarases em monossacarídeos assimiláveis (PALANIVELU et al., 1984; RUBIO & NAVARRO, 2006).

Diferentes respostas foram obtidas do valor de pH final do meio de cultura, algumas delas aumentando e outras diminuindo o valor do pH inicial (pH 6,0). O maior valor foi obtido quando a fonte de carbono utilizada foi o galactitol (pH 9,9), seguido do ácido poligalacturônico (pH 9,5), pectina (pH 8,4), acetato, sacarose e frutose (pH 8,3) e o menor com o ácido galacturônico (pH 2,8) seguido do ramnose (pH 5,9) e do L-arabitol (pH 6,1).

Para as fontes de nitrogênio estudadas os maiores crescimento do *A. oligospora* foram para o nitrato de sódio e a arginina, seguidas o nitrato de potássio, sendo o nitrato de sódio a fonte de nitrogênio também a existente no meio de cultura de Czapek (Tabela 12).

Dependendo da fonte de nitrogênio, o crescimento micelial variou de 1,36 a 11,67 mg mL⁻¹ ou, excluindo-se as proteínas que foram adicionadas na quantidade de 1% e as quantidades de N não foram precisas, de 1,36 a 4,50 mg mL⁻¹ (Tabela 12). Considerando estes extremos, as fontes de nitrogênio foram divididas em três classes arbitrárias, isto é, as que proporcionaram baixo crescimento do fungo, até 2,3 mg mL⁻¹ (metionina, serina, leucina e triptofano, nitrato de amônio, glutamina e glicina), médio, de 2,4 a 3,4 mg mL⁻¹ (asparagina, histidina, fenilalanina, alanina, lisina, nitrato de potássio, arginina e cisteína) e alto crescimento, maior que 3,5 mg mL⁻¹ (cloreto de amônio, nitrato de sódio, uréia, casaminoácidos, peptona, caseína, extrato de levedura e triptona).

LIU & CHEN 2003 estudaram os requerimentos nutricionais do fungo nematófago *Pochonia chlamydospora* e verificaram que das 20 fontes de carbono, o glicogênio, inulin, amido solúvel e a D-galactose foram as fontes que apresentaram o melhor

crescimento em meio de cultura líquido. Das 18 fontes de nitrogênio estudadas a caseína, o ácido glutâmico, o ácido aspártico, a histidina e a peptona favoreceram os maiores crescimento em meio líquido. E das 9 vitaminas testadas apresentaram os melhores crescimento o ácido aminobenzóico, ácido pantotênico, piridoxina, ácido fólico, inositol e o ácido nicotínico. MO et al, 2005 estudaram 7 isolados *Pochonia chlamydosporia* em meio líquido e testaram 21 fontes de carbono e 15 de nitrogênio para o crescimento ótimo na produção de biomassa em relação C/N as melhores fontes de carbono foram batata-doce > frutose > rafinose > glicose e para nitrogênio L-tirosina > valina > peptona > L-fenilalanina e a máxima produção pH foi 4,0 no pH inicial e de 6,0 no pH final.

Comparando-se o efeito de diferentes fontes de C e N, constatou-se ótimo crescimento quando no meio de cultura foi utilizada manose e uréia, respectivamente (GREUNING et al., 1992).

Inúmeras fontes de carbono foram examinadas para avaliar sua habilidade para promover o crescimento de *A. oligospora* (Tabela 11). Considerando os extremos de crescimento micelial de 0,18 a 4,93 mg micélio mL⁻¹, as fontes de carbono foram divididas em três classes arbitrárias, isto é, as que proporcionaram alto crescimento do fungo, maior que 3,4 mg mL⁻¹ (sacarose e maltose), médio, de 1,9 a 3,3 mg mL⁻¹ (amido, rafinose, D-manitol, dextrina, D-ribose, ácido poligacturônico, D-manose e D-frutose) e baixo crescimento, até 1,8 mg mL⁻¹ (demais fontes de C). Portanto, *A. oligospora* tem crescimento limitado na maioria das fontes de carbono, possivelmente devido a sua inabilidade de absorver estes componentes (ausência de um sistema de transporte para o interior da célula). Muitas destas fontes de carbono tem sido encontradas no solo e na rizosfera (KLEIN, 2000), porém, observa-se que um número limitado de componentes pode suportar o crescimento rápido de *A. oligospora*. Estes resultados foram comparáveis com os fungos *Arthrobotrys conoides* que foi crescido em meio salino contendo glicose, obtendo-se uma massa micelial de 9,4 mg mL⁻¹ após 13 dias de cultivo (COSCARELLI & PRAMER, 1962), *Acremonium coenophialum* com 0 - 111 mg 20 mL⁻¹ (KULKARNI & NIELSEN, 1986) e *Cordyceps sinensis* com 0,96 - 4,45 g L⁻¹ (DONG & YAO, 2005). Porém, foram bastante inferiores aos obtidos com o fungo *Neurospora crassa*, de 17,90 a 270,30 mg micélio 50 mL⁻¹ (NAHAS et al., 1982), crescido em diversas fontes de carbono.

Tabela 11. Efeito de diversas fontes de carbono no crescimento de *Arthrobotrys oligospora* e no pH final do meio de cultura.

Fonte C	Peso seco (mg/mL)		pH final	
Pentoses				
D-arabinose	0,40	LMNO	6,71	JKLMN
L-arabinose	0,59	JKLMNO	6,91	HIJK
D-ribose	2,17	CDEF	7,09	GHIJK
D-xilose	1,49	EFGHIJK	7,74	BCDEFG
D-lyxose	0,37	LMNO	6,91	IJK
Hexoses				
D-frutose	3,12	BC	8,25	BC
D-galactose	0,37	MNO	7,55	DEFGHI
D-glicose	1,41	EFGHIJKL	6,50	KLMN
D-manose	2,69	CD	7,85	BCDEF
L-sorbose	0,58	JKLMNO	7,27	FGHIJ
L-ramnose	1,17	FGHIJKLMN	5,94	O
Dissacarídeos				
D- Celobiose	1,58	EFGHIJ	6,18	LMN
Maltose	4,93	A	7,75	BCDEFG
Lactose	0,39	LMNO	6,80	JKL
Sacarose	3,86	B	8,26	BC
Trealose	1,78	DEFGHI	8,18	BCD
Oligossacarídeos				
Rafinose	1,92	DEFGH	7,99	BCDE
Polissacarídeos				
Amido	1,82	DEFGHI	7,38	EFGHIJ
Celulose(*)	1,28	FGHIJKLM	8,05	BCDE
Dextrina	2,07	DEF	7,60	CDEFGH
Pectina(*)	0,84	HIJKLM	8,38	B
Ácidos carboxílicos				
Acetato	0,90	HIJKLMNO	8,28	B
Citrato	0,36	MNO	6,78	JKLM
Propiônico	0,10	O	2,93	Q
Polióis				
Glicerol	0,91	HIJKLMNO	7,83	BCDEF
D-arabitol	0,23	NO	6,48	KLMN
D-Galactitol	0,28	MNO	9,90	A
D-manitol	1,97	DEFG	6,49	KLMN
Dulcitol	0,32	MNO	6,62	JKLMN
Ribitol	0,92	HIJKLMNO	6,96	HIJK
L-Arabitol	0,18	NO	6,06	MN
D-sorbitol	1,65	DEFGHI	6,82	JKL
D-xilitol	0,94	GHIJKLMNO	6,94	HIJK
Ácidos urônicos				
Galacturônico	0,45	KLMNO	2,82	Q
Poligacturônico	2,38	CDE	9,53	A
Sem sacarose	0,39	LMNO	6,10	MNO
Teste F		35,54**		155,35**
Desvio Padrão		0,3201		0,21
(CV) %		24,61		2,96

(*) peso aproximado; Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

As fontes de nitrogênio orgânico que propiciaram maior crescimento fúngico que o obtido com o nitrato de sódio de $3,86 \text{ mg mL}^{-1}$, com exceção da uréia, foram as proteínas (Tabela 12). As proteínas devem ser degradadas por enzimas extracelulares para que ocorra sua assimilação (CARLILE & WATKINSON, 1996). Esta propriedade confere aos fungos predadores de nematóides a habilidade de penetrar no hospedeiro. A identificação e o papel destas enzimas tem sido estudado em *A. oligospora* por vários autores (TUNLID & JANSSON, 1991, AHMAN et al. 2002) e estão envolvidas na infecção do nematóide pelo fungo.

As fontes de nitrogênio que propiciaram baixo e médio crescimento incluíram fontes inorgânicas e aminoácidos. Entre as fontes de nitrogênio inorgânico, a maior produção micelial de *A. oligospora* foi com nitrato de sódio que não diferiu significativamente do crescimento observado com cloreto de amônio ou nitrato de potássio. Há evidência de que nos fungos a assimilação de nitrato é induzida por meio de um sistema de transporte ativo. Relatos mostraram que no fungo *Pisolithus tinctorius* a enzima nitrato redutase foi induzida na presença de nitrato (AOUADJ et al., 2001).

O valor do pH final do meio de cultura variou de 3,2 a 8,3 significando que diminuiu para algumas fontes de nitrogênio e aumentou para outras em relação ao pH inicial (Tabela 13). Fontes inorgânicas de nitrogênio e orgânicas, incluindo aminoácidos e proteínas propiciaram tanto a diminuição como o aumento do pH final (Tabela 12).

Pelos resultados, constatou-se que, no caso das diferentes fontes de vitaminas e fatores de crescimento estudadas, o extrato de levedura foi o que proporcionou o melhor crescimento micelial de *A. oligospora*, seguidas das vitaminas biotina e tiamina que apresentaram significativamente iguais para a riboflavina e por último o inositol comparados com as outras fontes de vitaminas (Tabela 13).

Entre as diversas vitaminas utilizadas no meio de cultura, biotina + tiamina foram as mais efetivas para o crescimento de *A. oligospora*, obtendo-se um peso seco de $6,98 \text{ mg micélio peso seco mL}^{-1}$ e em seguida riboflavina ($6,83 \text{ mg mL}^{-1}$) e inositol ($6,68 \text{ mg mL}^{-1}$) (Tabela 13). O aumento do peso seco proporcionado pela mistura biotina + tiamina foi de 2,3 vezes em relação ao controle e de 2,2 vezes pela riboflavina ou inositol. Portanto, o crescimento deste fungo depende da produção destas vitaminas por outros organismos do solo, onde é encontrado, para seu ótimo crescimento. Foi obtido maior crescimento do fungo quando foi utilizado extrato de levedura ($9,29 \text{ mg mL}^{-1}$) em relação à mistura biotina + tiamina. Contudo, o extrato de levedura pode ter influenciado como fonte de nitrogênio (Tabela 12).

Tabela 12. Efeito de diversas fontes de nitrogênio no crescimento de *Arthrobotrys oligospora* e no pH final do meio de cultura.

Fonte N	Peso seco (mg/mL)		pH final	
N inorgânico				
Cloreto de amônio	3,50	CDEF	3,23	J
Nitrato de amônio	1,95	DEF	3,47	J
Nitrato de potássio	2,96	CDEF	7,50	AB
Nitrato de sódio	3,86	CDE	8,26	A
Uréia	4,50	CDE	7,27	ABC
Aminoácidos				
Alanina	2,72	DEF	6,13	CDEFG
Arginina	3,04	CDEF	8,32	A
Asparagina	2,36	DE	4,97	HI
Caseína	8,65	AB	6,00	DEFGH
Casaminoácidos	4,74	CD	6,71	BCDEF
Cisteína	3,42	CDEF	3,79	J
Fenilalanina	2,60	DEF	5,38	GH
Glicina	2,60	DEF	6,38	BCDEFG
Glutamina	2,24	DEF	3,65	J
Histidina	2,59	DEF	6,12	DEFGH
Leucina	1,59	DEF	5,72	FGH
Lisina	2,74	DEF	5,83	EFGH
Metionina	1,36	EF	4,09	IJ
Serina	1,49	EF	7,06	BCD
Triptofano	1,74	DEF	6,01	DEFGH
N complexo orgânico				
Extrato de levedura	10,81	A	5,89	EFGH
Peptona	5,92	BC	6,89	BCDE
Triptona	11,67	A	6,60	BCDEF
Sem nitrogênio	0,43	F	6,16	CDEFG
Teste F	24,49**		45,58**	
Desvio Padrão	1,00		0,36	
(CV) %	26,97		6,21	

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

O efeito da mistura biotina + tiamina está de acordo com resultados obtidos por outros autores (FRIMAN et al., 1985; ROSÉN et al. 1997).

Muitas das vitaminas hidrossolúveis utilizadas neste estudo são precursoras de coenzimas que tem função catalítica na célula (VOET & VOET, 2004). Foi relatado que *A. conoides*, outro fungo predador de nematóide, também necessita destas vitaminas quando crescido em meio salino tendo a glicose como fonte de carbono (COSCARELLI & PRAMER, 1962). Tiamina e biotina são provavelmente as vitaminas mais requeridas pelos fungos. A biotina em *Neurospora crassa* (NAHAS et al., 1982) e a tiamina em

Acremonium coenophialum (KULKARNI & NIELSEN, 1986) foram essenciais para o máximo crescimento destes fungos em meio salino.

Tabela 13. Efeito de diversas vitaminas no crescimento de *Arthrobotrys oligospora* e no pH final do meio de cultura.

Vitaminas	Concentração (por litro)	Peso seco (mg/mL)		pH final	
Controle (sem vitamina)	-	3,04	D	7,46	AB
Riboflavina (Vitamina B ₂)	200 µg	6,83	AB	7,59	AB
Cianocobalamina (Vitamina B ₁₂)	200 µg	5,02	BCD	8,03	A
Inositol	5 mg	6,68	ABC	6,20	C
Tiamina (Vitamina B ₁)	200 µg	5,63	DCD	5,79	CD
Ácido pantotênico	200 µg	4,16	CD	5,25	D
Ácido nicotínico	200 µg	5,31	BCD	7,40	AB
Ácido fólico	100 µg	5,46	BCD	7,58	AB
Piridoxina (Vitamina B ₆)	200 µg	4,51	BCD	7,35	AB
Biotina (Vitamina H)	200 µg	4,56	BCD	7,50	AB
Biotina + tiamina	200 µg	6,98	AB	7,86	AB
Extrato de levedura	0,05 g	9,29	A	7,25	B
Teste F		9,46**			
Desvio Padrão		1,07			
(CV) %		18,96			

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

VIII. CONCLUSÕES

1. Frequência de fungos nematófagos em diferentes solos

a) Diferentes gêneros de nematóides encontram-se associados às diferentes espécies de plantas pesquisadas;

b) As amostras de solo estudadas apresentaram fungos com atividade nematófaga, pois estes fungos são comuns e existem em abundância em solos agricultáveis e em material orgânico em decomposição.

c) No teste de patogenicidade o solo rizosférico sob alface foi o que apresentou maior número de fungos com atividade nematófaga.

d) As atividades da desidrogenase, amilase, celulase e endoglucanase ocorreram no solo não rizosférico de acordo com a frequência de fungos totais e nematófagos.

2. Caracterização fisiológica do fungo *Arthrobotrys oligospora*

a) As melhores fontes de carbono utilizadas pelo fungo para a produção de micélio foram a maltose e sacarose.

b) As melhores fontes de nitrogênio utilizadas pelo fungo foram as proteínas (triptona, extrato de levedura, caseína, peptona e casaminoácidos), seguidas da uréia, nitrato de sódio e cloreto de amônio

c) O pH final ótimo foi o de 5,0

d) As melhores vitaminas testadas a riboflavina propiciou um aumento do crescimento do fungo e a mistura biotina e tiamina em relação ao controle, sem vitamina.

e) Constatou-se, após o período de incubação, uma tendência de alcalinização do meio de cultura para até 8,4.

f) As atividades celulolítica e a-amilolítica do fungo *A. oligospora* pode estabelecer as condições ecológicas para seu crescimento no solo.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a FAPESP pelo financiamento desta pesquisa.

IX. REFERÊNCIAS

AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. Boston: Elsevier, 2005. 921 p.

AHMAN, J.; JOHANSSON, T.; OLSSON, M.; PUNT, P. J.; HONDEL, CEES, A. M. J. J. VAN DEN; TUNLID, A. Improving the pathogenicity of a nematode-trapping fungus by genetic engineering of a subtilisin with nematotoxic activity. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 7, p. 3408-3415, 2002.

AOUADJ, R.; ES-SGAOURI, A; BUTTON, B. Étude de la stabilité et de quelques propriétés de la nitrate réductase du champignon ectomycorhizien *Pisolithus tinctorius*. **Cryptogamie Mycologie**, Paris, v. 21, n. 3, p. 187-202, 2000.

ARAÚJO, J. V. Inibição de captura de larvas infectantes de *Cooperia punctata* por fungos do gênero *Arthrobotrys*, utilizando carboidratos e lectinas. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 10, n. 1, p. 7-11, 2001.

ARUNACHALAM, K.; ARUNACHALAM, A.; MELKANIA, N. P. Influence of soil properties on microbial populations, activity and biomass in humid subtropical mountainous ecosystems of India. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 30, n. 3, p. 217-223, 1999.

BALAN, J.; GERBER, N. Attraction and killing of the nematode *Panagrellus redivivus* by the predacious fungus *Arthrobotrys dactiloides*. **Nematology**, Leiden, v. 18, p. 163-173, 1972.

BALOGH, J.; TUNLID, A.; ROSÉN, S. Deletion of a lectin gene does not affect the phenotype of the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 39, n. 2, p. 128-135, 2003.

BARRON, G. L. Predatory fungi, wood decay, and the carbon cycle. **Biodiversity**, Ottawa, v. 4, n. 1, p. 3-9, 2003.

BARRON, G. L. **The nematode-destroying fungi**. Guelph: Canadian Biological Publications Ltda, Guelph, Ontario, 1977, 140 p.

BARROSO, C. B.; PEREIRA, G. T.; NAHAS, E. Solubilization of CaHPO_4 and AlPO_4 by *Aspergillus niger* in culture media with different carbon and nitrogen sources. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 37, n. 4, p. 434-438, 2006.

BELDER, E. DEN; JANSEN. E. The influence of temperature, nutrition, light and the growth time of the mycelium on capture and infection of *Meloidogyne hapla* and *Arthrobotrys oligospora*. **Fundamental and Applied Nematology**, Montrouge, v. 17, n. 1, p. 57-66, 1994.

BONMATI, M.; CECCANTI, B.; NANNIPERI, P. Spatial variability of phosphatase, urease, protease, organic carbon and total nitrogen in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.23, n. 4, p. 391-396, 1991.

CAMPOS, V. P.; CAMPOS, J. R.; SILVA, L. H. C. P.; DUTRA, M. R. Manejo de nematóides em hortaliças. In: SILVA, L. H. C. P.; CAMPOS, J. R.; NOJOSA, G. B. A. (Ed.) **Manejo integrado de doenças e pragas em hortaliças**. Lavras. Editora UFLA, 2001. p. 125-158.

CARDOSO, E. R.; NAHAS, E. **Crescimento do fungo nematófago *Arthrobotrys oligospora* em vários meios de cultura**. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 9., 2005, Recife. **Anais...** p. 101.

CARLILE, M. J.; WATKINSON, S. C. **The fungi**. London: Accademic, 1996. 486 p.

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

CASIDA, L.E. Microbial metabolic activity in soil as measured by dehydrogenase determinations. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 34, p. 630-636, 1977.

CASTRO, J. M. C.; LIMA, R. D. de; FERRAZ, S.; NEVES, J. C. L. Capacidade de predação de *Arthrobotrys musiformis* a fitonematóides. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 26, n. 1, p. 58-62, 2000.

CHASE, A. R., KAPLAN, O.; OSBORNE, L. S. Nematode pests of tropical foliage plants and leatherleaf. **Agricultural Research Educational Centre**, Apopka, v. 32, n. 1, p. 83-85, 1983.

COLE, M. A. Lead inhibition of enzyme synthesis in soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 33, p. 262-268, 1977.

COOLEN, W. A.; D'HERDE, C. J. **A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue**. Ghent : Agricultural Research Educational Centre, 1972. 77 p.

COSCARELLI, W.; PRAMER, D. Nutrition and growth of *Arthrobotrys conoides*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 84, n. 1, p. 60-64, 1962.

COSTA, D. C. Nematoses em banana e abacaxi no Brasil: danos e manejo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, 22., 2000, Uberlândia. **Anais...** p. 50-58.

COSTA, D. C.; SILVA S. O.; ALVES, F. R. Reação de genótipos de bananeiras (*Musa* spp.) a *Radopholus similis* e *Meloidogyne incognita*. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 22, n. 1, p. 49-57, 1998.

DACKMAN, C.; JANSSON, H. B.; NORDBRING-HERTZ, B. Nematophagous fungi and their activities in soil. **Soil Biochemistry**, New York, v.7, p. 95-130. New York, 1992.

DACKMAN, C.; NORDBRING-HERTZ, B. Conidial traps - a new survival structure of nematode trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. **Mycological Research**, Madri, v. 96, p. 194-198, 1992.

DACKMAN, C.; OLSSON, S., JANSSON; H. B., LUNDGREN B.; NORDBRING-HERTZ, B. Quantification of predatory and endoparasitic nematophagous fungi and their activities in soil. **Microbial Ecology**, New York, v. 13, p. 89-93, 1987.

DAVIDSON, E. A., GALLOWAY, L.F.; STRAND, M. K. Assessing available carbon: Comparison of techniques across selected forest soils. Commun. In Soil Science. Plant Anal., v. 18, n. 1, p. 45-64, 1987.

DE BOER, W.; DUYTS, H.; LAANBROEK, H. J. Autotrophic nitrification in a fertilized acid heath soil. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 20, p. 845-850, 1988.

DENG, S. P.; TABATABAI, M. A. Effect of tillage and residue management on enzyme activities in soils: II. Glycosidases. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 22, n. 3, p. 208-213, 1996.

DIAS, W. P.; FERRAZ, S. Crescimento e esporulação de *Arthrobotrys* spp. em diferentes substratos, meios de cultura, pH e níveis de temperatura. **Nematologia Brasileira**, Campinas, v. 17, n. 2, p. 168-181, 1993.

DIJKSTERHUIS, J.; HARDER, W.; VEENHUIS, M. Proliferation and function of the microbodies in the nematophagous fungus *Arthrobotrys oligospora* during growth on oleic acid or D-alanine as the sole carbon source. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 94, p. 1-9, 1993.

DIJKSTERHUIS, J.; VEENHUIS, M.; HARDER, W.; NORDBRING-HERTZ, B. Nematophagous fungi: physiological aspects and structure-function relationships. **Advances in Microbial Physiology**, London, v. 36, p. 111-143, 1994.

DOMINGUES, C. M.; PERALTA, R. M. Production of amylase by soil fungi and partial biochemical characterization of amylase of a selected strain (*Aspergillus fumigatus* fresenius). **Canadian Journal Microbiology**, Ottawa, v. 39, p. 681-685, 1993.

DONG, C. H.; YAO, Y. J. Nutritional requirements of mycelial growth of *Cordyceps sinensis* in submerged culture. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 99, p. 483-492, 2005.

DUPONNOIS, R.; CHOTTE, J. L.; SALL, S.; CADET, P. The effects of organic amendments on the interactions between a nematophagous fungus *Arthrobotrys oligospora* and the root-knot nematode *Meloidogyne mayaguensis* parasitizing tomato plants. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 34, p. 1-6, 2001.

FALIH ABDULLAH, M. K.; WAINWRIGHT, M. Microbial and enzyme activity in soils amended with a natural source of easily available carbon. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 21, p. 177-183, 1996.

FAUCI, M. F.; DICK, R. P. Soil microbial dynamics: short-and long-term effects of inorganic and organic nitrogen. **Soil Science Society of America**, Madison, v. 58, p. 801-806, 1994.

FERNÁNDEZ, A. S.; LARSEN, M.; WOLSTRUP, J.; GRØNVOLD, J.; NANSEN, P.; BJØRN, H. Growth rate and trapping efficacy of nematode-trapping fungi under constant and fluctuating temperatures. **Parasitology Research**, Berlin, v. 85, n. 8/9, p. 661-668, 1999.

FERRAZ, L. C. C. B. Métodos alternativos de controle de nematóides. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v. 16, 1992, 24p.

FONDAZIONE LANZA, 2003. Published Online.

<http://www.fondazionelanza.it/epa/abstract/volosciuc-full.pdf>.

FRIMAN, E.; OLSSON, S.; NORDBRING-HERTZ, B. Heavy trap formation by *Arthrobotrys oligospora*. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 31, p. 17-21, 1985.

GHAHFAROKHI, M. S.; ABYANEH, M. R.; BAHADORI, S. R.; ESLAMI, A.; ZARE, R. EBRAHIMI, M. Screening of soil and sheep faecal samples for predacious fungi: isolation and characterization of the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. **Iranian Biomedical Journal**, Tehran, v. 8, n. 3, p. 135-142, 2004.

GIANFREDA, L.; RAO, M. A.; PIOTROWSKA, A.; PALUMBO, G.; COLOMBO, C. Soil enzyme activities as affected by anthropogenic alterations: intensive agricultural practices and organic pollution. **Science of the total environment**, v. 341, p. 265-279, 2005.

GRAY, N. F. Ecology of nematophagous fungi: effect of soil moisture, organic matter, pH and nematode density on distribution. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 17, n. 4, p. 499-507, 1985.

GRAY, N. F. Nematophagous fungi with particular reference to their ecology. **Biological Reviews**, v. 62, p. 245-304, 1987.

GRAY, N. F.; Bailey, F. Ecology of Nematophagous fungi: vertical distribution in a deciduous woodlad. **Plant and Soil**, *In Press*. 1985.

GREUNING, M-VAN; EICKER, A.; VAN-GREUNING, M. The morphology and physiology of *Arthrobotrys oligospora*, a weed mould on mushroom beds of *Agaricus bisporus*. **Mushroom Research**, v. 1, p. 33-38, 1992.

HAY, F. S.; NIEZEN, J. H.; LEATHWICK, D.; SKIPP, R. A. Nematophagous fungi in pasture: colonization of sheep faeces and their potential for control of free-living stages of gastro-intestinal nematode parasites of sheep. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 42, p. 7-13, 2002.

HEINTZ, C. E. Assessing the predacity of nematode-trapping fungi *in vitro*. **Mycologia**, v. 70, n. 5, p. 1086-1100, 1978.

HSU, S. C.; LOCKWOOD, J. L. Powdered chitin agar as a seletive medium for enumeration of actinomycetes in water and soil. **American Society for Microbiology**, v. 29, p. 422-426, 1975.

JAFFEE, B. A. Wood, nematodes, and the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 36, n. 7, p. 1171-1178, 2004.

JAFFEE, B. A. Soil cages for studying how organic amendments affect nematode-trapping fungi. **Applied Soil Ecology**. v. 21, p. 1-9, 2002.

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

JENKINS, W.R. A rapid centrifugal flotation technique for separating nematodes from soil. **Plant Disease Reporter**, Washington, v. 48, n. 9, p. 692, 1964.

JONES, R. L.; VARNER, J. E. The bioassay of gibberellins. **Planta**, v. 72, p. 155-161, 1967.

KADO, C. I.; HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* e *Xanthomonas*. **Phytopathology**, Lancaster, v. 60, p. 969-976, 1970.

KANAZAWA, S.; MIYASHITA, K. A modified method for determination of cellulase activity in forest soil. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 32, n. 1, p. 71-79, 1986.

KANDELER, E., LUXHOI, J. TSCHERKO, D.; MAGID, J. Xylanase, invertase and protease at the soil-litter interface of a loamy sand. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 31, p. 1171-1179, 1999.

KANITKAR, S. I.; KANITKAR, R. U. Nematodes capture by *Arthrobotrys oligospora* KTS 1001 – a nematode hungry fungus. 2003. Published Online. <http://www.biologicalresearch.com/india>

KHAN, F. A.; SWARNKAR, C. P.; SINGH, D.; BHAGWAN, P. S. K.; DUBEY, S. C. Nematophagous fungi isolated from sheep faeces: A promising biological control of *Haemonchus contortus*. **Indian Journal of Animal Sciences**, v. 71, p. 834-836, 2001.

KERRY, B. R. Rhizosphere interactions and the exploitation of microbial agents for the biological control of plant-parasitic nematodes. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 38, p. 423-441, 2000.

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

KERRY, B. R. Fungi as biological control agents for plant parasitic nematodes. In: WHIPPS, J. M.; LUMDSEN, R. D. (Ed). *Biotechnology of fungi for improving plant growth*, Cambridge: in. p. 153-170. 1989.

KERRY, B. R. Fungal parasites of cyst nematodes. **Agricultural Ecosys. Environmental**. v. 24, p. 293-305, 1988.

KIM, D. J.; RIGGS, R. D. Biological control. **American Phytopathological Society**, Washington, p. 133-142, 1992.

KLEIN, D. A. The rhizosphere. In LEDERBERG, J. (ed.) **Encyclopedia of microbiology**. 2nd ed. San Diego: Academic, v. 4, p. 117-126, 2000.

KULKARNI, R. K.; NIELSEN, B. D. Nutritional requirements for growth of a fungus endophyte of tall fescue grass. **Mycologia**, New York, v. 78, n. 5, p. 781-786, 1986.

LARSEN, M. Biological control of helminths. **Int. Journal Parasitology**, v. 29, p. 139-146, 1999.

LIU, X. Z., CHEN, S. Y. Nutritional requirements of *Pochonia chlamydospora* and ARF18, fungal parasites of nematode eggs. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 83, p. 10-15, 2003.

LIU, X. Z.; ZHANG, K. Q. Nematode-trapping species of *Monacrosporium* with special reference to two new species. **Mycological Research**, Madrid, v. 98, p. 862-868, 1994.

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

MANKAU, R. Biological control of nematodes pest by natural enemies. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 18, p. 415-440, 1980.

MARGESIN, R.; FELLER, G.; HAMMERLE, M.; STEGER, U.; SCHINNER, F. A colorimetric method for the determination of lipase activity in soil. **Biotechnology Letters**, v. 24, p. 27-33, 2002.

MARTIN, J. P. Use of acid, rose bengal, and streptomycin in the plate method for estimating soil fungi. **Soil Science**, v. 69, p. 215-232. 1950.

MELO, I. S. de. Controle biológico de doenças de raiz. In: REUNIÃO SOBRE CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS DE PLANTAS. Campinas. **Anais...** Piracicaba: Fundação Cargil, 1986, p. 7-12.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. **Anal. Chem.** v. 31, p. 426-428, 1959.

MO, M.; XU, C.; ZHANG, K. Effects to carbon and nitrogen sources, carbon-to-nitrogen ratio, and initial pH on the growth of nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* in liquid culture. **Mycopathologia**, Yunnan, v. 159, p. 381-387, 2005.

MORGAN, M.; BEHNKE, J. M.; LUCAS, J. A.; PEBERDY, J. F.. *In vitro* assessment of the influence of nutrition, temperature and larval density on trapping of the infective larvae of *Heligmosomoides polygyrus* by *Arthrobotrys oligospora*, *Duddingtonia flagrans* and *Monacrosporium megalosporum*. **Parasitology**, v. 115, (Pt 3), p. 303-310, 1997.

NAHAS, E.; TERENCE, H. F.; ROSSI, A. Effect of carbon source and pH on the production and secretion of acid phosphatase (EC 3.1.3.2.) and alkaline phosphatase (EC 3.1.3.1.) in *Neurospora crassa*. **Journal of General Microbiology**, v. 128, p. 2017-2021, 1982.

NANNIPIERI, P.; PEDRAZZINI, F.; ARCARA, P.G.; PIOVANELLI, C. Changes in amino acids, enzyme activities, and biomasses during soil microbial growth. **Soil Science**, Italy, v. 127, n. 1, p. 26-34, 1979.

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

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

NORDBRING-HERTZ, B., JANSSON, H. B.; TULID, A. Nematophagous fungi. In: **ENCYCLOPEDIA of life sciences**. Basingstoke: Macmillan Publishers, 2000p.

NORDBRING-HERTZ, B.; STÄLHAMMAR-CARLEMALM, M. Capture of nematode by *Arthrobotrys oligospora* an electron microscope study. **Canadian Journal Botany**, v. 56, p. 1297-1307, 1978.

NGUYEN, VI L.; JUSTIN L.; BASTOW BRUCE, A. Jaffee and Don R. Strong. Response of nematode-trapping fungi to organic substrates in a coastal grassland soil **Mycological Research**, v. 111, n. 7, p. 856-862, 2007.

OLIVEIRA, R. D. L.; FERRAZ, S.; ALFENAS, A. C.; DIAS-ARIEIRA, C. R. Caracterização morfológica e isoenzimática de espécies de *Arthrobotrys oligospora* no Brasil. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v. 26, p. 181-197. 2002.

PALANIVELU, P; P. V. BALASUBRAMANYAM; RAMESH MAHESHWARI. Co-induction of sucrose transport and invertase activities in a thermophilic fungus, *Thermomyces lanuginosus*. **Archives of Microbiology**, v. 139, n. 1, p. 44-47, 1984.

PANSOMBAT, K.; KANAZAWA, S.; HORIGUCHI, T. Microbial ecology in tea soils. **Soil Science Plant Nutrition**, Kagoshima, v. 43, n. 2, p. 431-438, 1997.

PERSMARK, L.; BANCK, A.; JANSSON, HB. Population dynamics of nematophagous fungi and nematodes in an arable soil: vertical and seasonal fluctuations. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 28, n. 8, p. 1005-1014, 1996.

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

PERSSON, C.; JANSSON, H. B. Colonization of soil by nematophagous fungi. In: SEMINÁRIO CIENTÍFICO INTERNACIONAL SOBRE SANIDAD VEGETAL, 1997, Ciudad Habana. **Resúmenes**. 127p.

POINAR JUNIOR, G. O.; JANSSON, H. (Ed.). *Diseases of nematodes*. Boca Raton: CRC Press, 1988, v. 2, p. 139.

PRAMER, D. Nematode trapping fungi. **Science**, v. 144, p. 382-388, 1964.

QUILCHANO, C.; MARAÑÓN, T. Dehydrogenase activity in Mediterranean forest soils. **Biol Fertil Soils**, v. 35, p. 102-107, 2002.

RALTE, V.; PANDEY, H. N.; BARIK, S. K., TRIPATHI, R. S.; PRABHU, SWAPNA, D. Changes in microbial biomass and activity in relation to shifting cultivation and horticultural practices in subtropical evergreen forest ecosystem of north-east India. **Acta Oecologica**, Meghalaya, v. 28, p. 163-172, 2005.

REZENDE, L. A.; ASSIS, L. C.; NAHAS, E. Carbon, nitrogen and phosphorus mineralization in two soils amended with distillery yeast. **Bioresource Technoogy**, v. 94, n. 2, p. 159-167, 2004.

RIBEIRO, R. C. F.; CAMPOS, V. P. Isolamento, identificação e efeito da temperatura no crescimento "in vitro" de fungos parasitas de ovos de *Meloidogyne* spp. do sul de Minas Gerais. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v. 17, n. 2, 1993.

RODRÍGUEZ-KÁBANA, R.; GODOY, G.; MORGAN-JONES, G.; SHELBY, R. A. The determination of soil chitinase activity: Conditions for assay and ecological studies. **Plant soil**, v. 75, n. 1, p. 95-106, 1983.

ROMERO, M. D.; AGUADO, J.; GONZÁLEZ, L.; LADERO, M. Cellulase production by *Neurospora crassa* on wheat straw. **Enzyme and Microbiol Technology**, v. 25, p. 244-250, 1999.

ROSÉN, S.; SJOLLEMA, K.; VEENHUIS, M.; TUNLID, A. A cytoplasmic lectin produced by the fungus *Arthrobotrys oligospora* functions as a storage protein during saprophytic and parasitic growth. **Microbiology**, v. 127, p. 2593-2604, 1997.

ROSENZWEIG, W. D. Role of aminoacids, peptides and medium composition in trap formation by nematode-trapping fungi. **Canadian Journal Microbiology**, Ottawa, v. 30, p. 265-267, 1983.

RUBIO, M. C.; NAVARRO, A. R., Regulation of invertase synthesis in *Aspergillus niger*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 4, p. 601-606, 2006.

SANTOS, C. P.; PADILHA, T.; RODRIGUES, M. L. A. Atividade predatória de *Arthrobotrys oligospora* e *Duddingtonia flagrans* nos estádios larvares pré-parasíticos de *Cyathostominae* sob diferentes temperaturas constantes. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 5, p. 839-842, 2001.

SANTOS, J. M. dos; FERRAZ, S. Microscopia eletrônica de varredura de esporângios de *Pasteuria penetrans* aderidos à cutícula de larvas de *Meloidogyne javanica*. In Colóquio da sociedade brasileira de microscopia eletrônica, 12; Caxambu. **Resumo...** Rio de Janeiro: SBME, 1991. p. 301-302.

SANTOS, M. A. Detecção, identificação e avaliação do potencial antagonista de fungos nematófagos em solos do Brasil. 1991. 97 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1991.

SAMUEL, C. A.; PADILHA, T.; SANTOS, C.; ROQUE, M. V. C., P. de. Nematophagous fungi in fresh feces of catthe in the Mata region of Minas Gerais state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.82, p. 217- 220, 1999.

SANOMIYA, L. T.; NAHAS, E. Atividade enzimática do solo influenciada pela espécie de planta, adubação fosfatada e calagem. **Científica**, Jaboticabal, v. 32, n. 1, p. 75-81, 2004.

SAS INSTITUTE. *Statistical analysis system SAS/STAT*. user's guide. Version 6, 4th ed. Cary, 1990. v. 2, 846 p.

SAXENA, G.; DAYAL, R.; MUKERJI, K. G. Nutritional studies on nematode- trapping fungi. *Folia-Microbiologica*, v. 34, p. 42-48, 1989.

SCHMIT, J. C.; BRODY, S. Biochemical genetics of *Neurospora crassa* conidial germination. **Bacteriological Reviews**. v. 40, n. 1, p. 1-41, 1976.

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

SIMS, J. R.; HABY, V. A. Simplified colorimetric determination of soil organic matter. **Soil Science**. v. 112, p. 137-141, 1971.

SOMOGGY, M. Notes on sugar determination. **Journal of Biological Chemistry**. v. 195, p. 19-23, 1952.

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

STIRLING, G. R. Biological control of plant-parasitic nematodes. In: **Diseases of Nematodes**, Boca Raton, v. 2, p. 93-139, 1988.

TIHOHOD, D. **Nematologia agrícola aplicada**. 2.ed. Jaboticabal: FUNEP, 2000, 473p.

TIHOHOD, D. **Nematologia agrícola aplicada**. Jaboticabal: FUNEP, 1993. 372p.

TUNLID, A.; AHMAN, J.; OLIVER, R. P. Transformation of the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. **FEMS Microbiology Letters**. v. 173, p. 111-116, 1999.

TUNLID, A.; JANSSON, S. Proteases and their involvement in the infection and immobilization of nematodes by the nematophagous fungus. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, n. 10, p. 2868-2872, 1991.

VAN GUNDY, S. D. Biological control of nematodes. Status and prospects in agricultural IPM Systems. In: Hoy, M. A.; HERZOG, D. C. (ed), **Biological Control in Agricultural IPM Systems**, New York, v. 1., p. 476-478, 1985.

VOET, D.; VOET, J. G. **Biochemistry**. IE-WILEY, 3^a Ed., 1591 p., 2004.

WOLLUN, II, A. G. Cultural methods for soil microorganisms. In: **Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties** (PAGE, A. L., MILLER, R. W.; KEENEY, D. R. (Ed.). Madison: SSSA, 1982, n. 5, p. 781-802. (Book Series, 5)

ZEM, A. C.; ALVES E. J. **Observações sobre perdas provocadas por nematóides em bananeira (*Musa acuminata* Simm. & Sherp.) cv. Nanicão**. Cruz das Almas: EMBRAPA/CNPMP, 1981, 10 p. (Boletim de Pesquisa, n° 6).

ZHANG, K. Q.; MO, M. H. **Flora fungorum sinicorum. *Arthrobotrys* et genera cetera cognate (Chinese)**. Beijing: Science Press, 2006.

ZOPF, W. Zur Kenntnis der infektiions-krankheiten niederer thiere und pflanzen. **Nova Acta der Kaiserlichen Leopoldinischen-Carolinischen Akademie der Naturforscher**. v. 52, p. 314-376, 1988.

ZUCCONI, L.; RIPA, C.; SELBMANN, L.; ONOFRI, S. Effects of UV on the spores of the fungal species *Arthrobotrys oligospora* and *A. ferox*. **Polar Biology**, Berlin, v. 25, n. 7, p. 500–505, 2002.