

**Andrei Muratore Gurvitz**

**AVALIAÇÃO DE CRESCIMENTO DE FUNGOS ANTAGONISTAS  
A NEMATÓIDES PELO TEOR DE GLUCOSAMINA.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Fitopatologia, para obtenção do título de "Mestre".

**Orientador**

Prof. Vicente Paulo Campos

**Lavras  
Minas Gerais- Brasil  
1997**

ab sutanizzaA

09832  
MFJ 27176

Andrei Muratore Gurvitz

DESCARTADO

*mibi*  
ASSINATURA

Data 08/05/2019

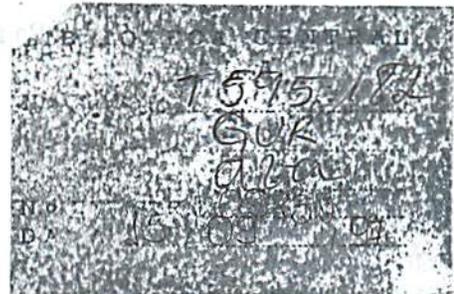
BIBLIOTECA UNIVERSITÁRIA  
UFLA

**AVALIAÇÃO DE CRESCIMENTO DE FUNGOS ANTAGONISTAS  
A NEMATÓIDES PELO TEOR DE GLUCOSAMINA.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Fitopatologia, para obtenção do título de "Mestre".

**Orientador**

Prof. Vicente Paulo Campos



Lavras

Minas Gerais- Brasil

1997

**Ficha Catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e Classificação da  
Biblioteca Central da UFLA**

Gurvitz, Andrei Muratore.

Avaliação do crescimento de fungos antagonistas a nematóides pelo teor de glucosamina / Andrei Muratore Gurvitz. -- Lavras : UFLA, 1997.

56p. : il.

Orientador: Vicente Paulo Campos.

Dissertação: (Mestrado) - UFLA.

Bibliografia.

1. Controle Biológico. 2. Nematóide. 3. Nematóide fitopatogênico. 4. Quitina. 5. Glucosamina. 6. Fungo de Controle Biológico. 7. Fungo antagonista. 8. Parede celular - Constituintes. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-589.22

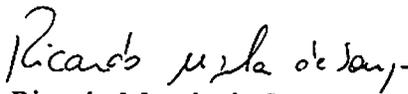
-595.182

**Andrei Muratore Gurvitz**

**AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE FUNGOS ANTAGONISTAS  
A NEMATÓIDES PELO TEOR DE GLUCOSAMINA.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Fitopatologia, para obtenção do título de "Mestre".

**APROVADA em 22 de agosto de 1997**

  
Prof. Ricardo Magela de Souza

  
Prof. Romildo da Silva

  
Prof. Vicente Paulo Campos  
Orientador

## AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal de Lavras pela oportunidade de realizar o curso de Mestrado.

Ao Departamento de Fitopatologia pelo ótimo recebimento, apoio, ensinamentos e oportunidades de trabalho e pesquisa.

A Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela concessão da bolsa durante o curso de Pós-Graduação.

Ao Professor Vicente de Paula Campos pela orientação.

Ao Professor Ricardo Magela de Souza pela sugestões, avaliações além da amizade e companheirismo.

Ao Professor Romildo da Silva pela avaliação e sugestões no trabalho efetuado.

A Professora Antônia dos Reis Figueira pela amizade, companheirismo, solidariedade e apoio nas horas difíceis, além do exemplo de profissionalismo.

Aos demais professores do Departamento de Fitossanidade pelos ensinamentos transmitidos, amizade e convívio.

Ao pessoal do Departamento de Fitossanidade que muito contribuiu para o êxito desta jornada: Di Louris, Psida, Eloisa, Ana, Lisiane, Fábio, Dna. Zélia, Eliana, Patrícia.

Aos meus pais pelo carinho, força, conselhos e apoio durante todos os 25 anos desta eterna etapa, que é viver.

Aos amigos, Flávio, Jorge e Beto, pelo convívio, lágrimas e sorrisos que nos ajudaram a vencer as dificuldades.

A Patrícia, pelo carinho, afeto, compreensão e paciência nos momentos difíceis.

Aos colegas que já concluíram as suas obrigações, Adriana, Edson, Angela, Eduardo, Wilson, Carlos, Murillo.

Aos atuais colegas Sônia, Leimi, Adriana, Bernardo, Alessandra, Joãozinho, Cléber, Luciana, Rose, Otto, Alvanir, Gislaine, Robério, Cléber, Kely, Gladis, Givaldo, Fábio, Paula, Adriana, Eustáquio, Tonho.

A minha grande amiga Inês pelas ótimas conversas.

A todos os meus amigos que diretamente ou indiretamente me ajudaram a chegar na etapa final deste trabalho.

A todos aqueles e outros que por momento não recordo.

O meu mais sincero **MUITO OBRIGADO!**

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	4
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1 Isolamento e manutenção dos fungos nematófagos.....	21
3.2 Avaliação do crescimento micelial e esporulação de <i>Arthrobotrys conoides</i> , <i>Arthrobotrys musiformis</i> e <i>Arthrobotrys</i> sp. em meios de cultura.....	22
3.3 Avaliação do crescimento micelial e esporulação de <i>Arthrobotrys conoides</i> , <i>Arthrobotrys musiformis</i> e <i>Arthrobotrys</i> sp. em substratos de baixo custo .....	23
3.3.1 Obtenção e preparo dos substratos de baixo custo.....	23
3.3.2 Avaliação da esporulação através de hemacitômetro.....	24
3.3.3 Avaliação do crescimento micelial através da quantidade de quitina produzida.....	25
3.3.3.1 Construção da curva padrão de glucosamina.....	25

3.3.3.2 Extração da quitina fúngica.....	27
3.3.3.2 Análise colorimétrica da quitina.....	28
3.4 Delineamento experimental.....	28
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
4.1. Avaliação do crescimento micelial e esporulação de <i>Arthrobotrys conoides</i> , <i>Arthrobotrys musiformis</i> e <i>Arthrobotrys</i> sp. em meios de cultura e da esporulação nos substratos casca, quirera e farelo de arroz, palha de feijão e esterco bovino.....	30
4.2. Avaliação do crescimento de <i>Arthrobotrys conoides</i> , <i>Arthrobotrys musiformis</i> e <i>Arthrobotrys</i> sp. em substratos casca, farelo e quirera de arroz; palha de feijão e esterco bovino pela análise do teor de glucosamina.....	32
5 CONCLUSÕES.....	46
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
ANEXOS.....	54

## LISTA DE TABELAS

TABELA		PÁGINAS
1	<p>Diametro médio (mm) das colônias dos fungos <i>Arthrobotrys conoides</i>, <i>Arthrobotrys musiformis</i> e <i>Arthrobotrys</i> sp. ao quarto dia em dois meios de cultura. UFLA, Lavras - MG, 1997.....</p>	29
2	<p>Conídios (<math>\times 10^3</math>) produzidos pelos fungos <i>Arthrobotrys conoides</i>, <i>Arthrobotrys musiformis</i> e <i>Arthrobotrys</i> sp., por placa ao sétimo dia após a repicagem dos fungos em meio de cultura BDA e YPSS. UFLA, Lavras - MG, 1997.....</p>	30
3	<p>Conídios (<math>\times 10^5</math>) produzidos pelos fungos <i>Arthrobotrys conoides</i>, <i>Arthrobotrys musiformis</i> e <i>Arthrobotrys</i> sp. por grama dos substratos casca, farelo e quirera de arroz, palha de feijão e esterco bovino aos 10 e 20 dias após a repicagem. UFLA, Lavras - MG, 1997.....</p>	32

## LISTA DE FIGURAS

FIGURAS		PÁGINAS
1	Reações enzimáticas responsáveis pela síntese de quitina na parede celular fúngica.....	11
2	Reação de ativação da enzima quitina sintetase .....	12
3	Curva padrão de Glucosamina-HCl expressa em $\mu\text{g/ml}$ HCl. UFLA, Lavras - MG, 1997.....	26
4	Teor de glucosamina expresso em $\mu\text{g}/0,5\text{g}$ de substrato das testemunhas: casca de arroz (CA), farelo de arroz (FA), quirera de arroz (QA), palha de feijão (PF) e esterco bovino (EB), aos 0, 2, 4, 6, 8, e 10 dias após a implantação do experimento. UFLA, Lavras - MG, 1997.....	33
5	Teor de glucosamina expresso em $\mu\text{g}/0,5\text{g}$ de substrato produzida pelo fungo <i>Arthrobotrys conoides</i> ao décimo dia após a repicagem nos substratos casca de arroz, esterco bovino, farelo de arroz, palha de feijão e quirera de arroz. UFLA, Lavras - MG, 1997.....	35

6	Teor de glucosamina expresso em $\mu\text{g}/0,5\text{g}$ de substrato produzida pelo fungo <i>Arthrobotrys musiformis</i> ao décimo dia após a repicagem nos substratos casca de arroz, esterco bovino, farelo de arroz, palha de feijão e quirera de arroz. UFLA, Lavras - MG, 1997.....	36
7	Teor de glucosamina expresso em $\mu\text{g}/0,5\text{g}$ de substrato produzida pelo fungo <i>Arthrobotrys</i> sp. ao décimo dia após a repicagem nos substratos casca de arroz, esterco bovino, farelo de arroz, palha de feijão e quirera de arroz. UFLA, Lavras - MG, 1997.....	37
8	Quantidade de glucosamina expressa em $\mu\text{g}/0,5\text{g}$ de farelo de arroz após repicagem com os fungos <i>Arthrobotrys conoides</i> , <i>Arthrobotrys musiformis</i> e <i>Arthrobotrys</i> sp. e incubação por até 10 dias. UFLA, Lavras - MG, 1997.....	39
9	Quantidade de glucosamina expressa em $\mu\text{g}/0,5\text{g}$ de palha de feijão após repicagem com os fungos <i>Arthrobotrys conoides</i> , <i>Arthrobotrys musiformis</i> e <i>Arthrobotrys</i> sp. e incubação por até 10 dias. UFLA, Lavras - MG, 1997.....	40
10	Quantidade de glucosamina expressa em $\mu\text{g}/0,5\text{g}$ de esterco bovino após repicagem com os fungos <i>Arthrobotrys conoides</i> , <i>Arthrobotrys musiformis</i> e <i>Arthrobotrys</i> sp. e incubação por até 10 dias. UFLA, Lavras - MG, 1997.....	42
11	Quantidade de glucosamina expressa em $\mu\text{g}/0,5\text{g}$ de quirera de arroz após repicagem com os fungos <i>Arthrobotrys conoides</i> , <i>Arthrobotrys musiformis</i> e <i>Arthrobotrys</i> sp. e incubação por até 10 dias. UFLA, Lavras - MG, 1997.....	43

- 12      Quantidade de glucosamina expressa em  $\mu\text{g}/0,5\text{g}$  de casca de arroz após repicagem com os fungos *Arthrobotrys conoides*, *Arthrobotrys musiformis* e *Arthrobotrys* sp. e incubação por até 10 dias. UFLA, Lavras - MG, 1997..... 44

## RESUMO

GURVITZ, Andrei Muratore. **Avaliação do crescimento de fungos antagonistas a nematóides pelo teor de glucosamina**. Lavras: UFLA, 1997. 56p. (Dissertação - Mestrado em Fitopatologia) .

*Arthrobotrys conoides*, *Arthrobotrys musiformis* e *Arthrobotrys* sp. cresceram e esporularam bem em meios BDA e YPSS. Nos substratos casca, farelo e quirera de arroz, palha de feijão e esterco bovino, o crescimento micelial pela observação visual parece ter ocorrido em todos eles, mas a esporulação ocorreu apenas com o fungo *A. musiformis* em casca de arroz, palha de feijão e esterco bovino. A avaliação do crescimento micelial desses fungos nos substratos pelo teor de glucosamina confirma a ocorrência de crescimento fúngico em todos os substratos. Os melhores substratos para o crescimento de *A. conoides*, *A. musiformis* e *Arthrobotrys* sp. foram farelo de arroz e palha de feijão, seguidos da quirera de arroz e do esterco bovino e por fim a casca de arroz. Os fungos tiveram crescimento exponencial a partir do segundo dia até o oitavo quando cultivados em farelo de arroz e palha de feijão. Entretanto essa velocidade de crescimento foi exponencial até o final do ensaio quando os mesmos fungos foram cultivados no esterco bovino. No cultivo em quirera de arroz, os fungos tiveram crescimentos diferenciados, com o *A. conoides* tendo crescimento exponencial até o final do ensaio e os demais até o oitavo dia de cultivo.

---

\*Orientador: Vicente Paulo Campos. Membros da Banca: Ricardo Magela de Souza e Romildo da Silva.

## ABSTRACT

### Evaluation of growth of nematode antagonistic fungi by glucosamine analysis

*Arthrobotrys conoides*, *Arthrobotrys musiformis* and *Arthrobotrys* sp. growth and sporulation were good when cultivated in PDA and YPSS media. The mycelial growth of those fungi cultivated in husk, brand and broken rice; bean straw and cow manure, occurred in all of them by visual estimation, but sporulation occurred for *A. musiformis* in husk rice, bean straw and cow manure only. The evaluation of mycelial growth of those fungi when cultivated in substrates above mentioned by chitin analysis, confirmed the fungi growth in all of them. The better substrates for the growth of *A. conoides*, *A. musiformis*, and *Arthrobotrys* sp. were rice brand and bean straw, followed by broken rice and cow manure, and finally in rice husk. The fungi had exponential growth after second day until eighth day of incubation when cultivated in rice brand and bean straw. However, this growth rate was exponential until the end of the experiment when the fungi were cultivated in cow manure. When the fungi were cultivated in broken rice, the growth rate were differentiated among fungus species. *A. conoides* had exponential growth rate until the end of the the experiment but other species until the eighth day of cultivation only. ~~the~~

## ABSTRACT

### **Evaluation of growth of nematode antagonistic fungi by glucosamine analysis**

*Arthrobotrys conoides*, *Arthrobotrys musiformis* and *Arthrobotrys* sp. growth and sporulation were good when cultivated in PDA and YPSS media. The mycelial growth of those fungi cultivated in husk, brand and broken rice, bean straw and cow manure, occurred in all of them by visual estimation, but sporulation occurred for *A. musiformis* in husk rice, bean straw and cow manure only. The evaluation of mycelial growth of those fungi when cultivated in substrates above mentioned by chitin analysis, confirmed the fungi growth in all of them. The better substrates for the growth of *A. conoides*, *A. musiformis*, and *Arthrobotrys* sp. were rice brand and bean straw, followed by broken rice and cow manure, and finally in rice husk. The fungi had exponential growth after second day until eighth day of incubation when cultivated in rice brand and bean straw. However, this growth rate was exponential until the end of the experiment when the fungi were cultivated in cow manure. When the fungi were cultivated in broken rice, the growth rate were differentiated among fungus species. *A. conoides* had exponential growth rate until the end of the the experiment but other species until the eighth day of cultivation only.

## 1 INTRODUÇÃO

Várias espécies fúngicas em diferentes gêneros, famílias, ordens e classes têm sido capazes de reduzir populações de fitonematóides, apresentando para tal estruturas especializadas na captura ou produzindo esporos capazes de infectar o nematóide (Barron, 1977; Mankau, 1980; Stirling, 1991). Sabe-se contudo, que os fungos são organismos filamentosos e portanto de difícil quantificação do crescimento micelial em substrato ou no solo. Diversas técnicas tem sido desenvolvidas para a quantificação do crescimento fúngico, como meios seletivos (Mitchell, Kannwisher-Mitchell e Dickson, 1987; Cabanillas e Barker, 1989; Gaspard, Jaffé e Ferris, 1990; De Leij e Kerry, 1991), diluições sucessivas (Eren e Pramer, 1965; Stirling, McKenry e Mankau, 1979; Dackman et al., 1987) e contagem direta de propágulos (Crump e Kerry, 1981).

Sabe-se, por exemplo, que os fungos utilizam substratos orgânicos para seu crescimento (Garraway e Evans, 1984), e que substratos infestados com o mesmo fungo podem ter comportamentos diferenciados quanto a eficiência do fungo nele desenvolvido, na redução da população do fitonematóide (Dias e Ferraz, 1994). Além disso, os fungos produzem esporos e micélio, e a quantificação apenas de esporos não expressa totalmente o crescimento desses organismos. O fungo pode não produzir esporos e estar crescendo vegetativamente, e exercendo o parasitismo nos nematóides, já que em sua grande maioria os fungos possuem necessidades

nutricionais distintas para estas duas fases (Dias e Ferraz, 1993). Por outro lado, o método de diluições em placas envolvendo a contagem do número de colônias não expressa quantitativamente a massa fúngica que resulta na produção de cada colônia, além da necessidade do organismo avaliado possuir característica única que o distinga com facilidade de outros organismos (Alexander, 1982).

Deste modo, nos últimos anos, diversos métodos químicos tem sido utilizados para a detecção de fungos ou de seus metabólitos finais, em alimentos e ambientes agrícolas. Entre eles se encontram aqueles capazes de detectar a quitina, polímero linear de  $\beta$ -1,4-*N*-acetilglucosamina, um dos principais componentes da parede celular dos fungos (Aronson, 1965). A glucosamina é obtida da quitina através de hidrólises ácidas (Blumenthal e Roseman, 1957), básicas (Donald e Mirocha, 1977) ou enzimática (Ride e Drisdale, 1971), podendo ser medida quimicamente. Métodos colorimétricos tem sido utilizados para detectar a quitina fúngica na forma de glucosamina em milho e soja contaminados (Donal e Mirocha, 1977; Bethlenfalvay, Pacovsky e Brown, 1981), grãos e plantas de trigo e cevada (Nandi, 1978; Golubchuk, Cuendet e Geddes, 1960; Mayama, Rehfeld e Daly, 1975; Whipps et al., 1980; Roberts et al., 1991), cebola (Becker e Gerdemann, 1977), plantas herbáceas (Wu e Stahmann, 1975; Ride e Drisdale, 1971; Ride e Drisdale, 1972; Toppan, Esquerré-Tugayé e Touzé, 1976), feno (Roberts et al., 1987a; Roberts et al., 1987b), e em produtos industrializados contaminados a base de tomate (Jarvis, 1977; Bishop et al., 1982; Cousin, Zeidler e Nelson, 1984; Lin e Cousin, 1985; Pettipher, Williams e Gutteridge, 1985).

A produção massal de fungos antagonistas de fitonematóides com objetivo de controle biológico, exige técnicas para monitorar quantitativamente o crescimento desses organismos em determinado substrato. O crescimento desses fungos em larga escala em substratos de baixo

custo, poderá constituir-se de importância econômica para o controle de fitonematóides na agricultura brasileira.

Desta forma, objetivou-se neste trabalho, avaliar a produção massal de três isolados dos fungos nematófagos *Arthrobotrys conoides*, *Arthrobotrys musiformis* e *Arthrobotrys* sp. nos substratos farelo de arroz, casca de arroz, quirera de arroz, palha de feijão e esterco bovino através da análise de quitina produzida, medida através do teor de glucosamina.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

Os fungos nematófagos são bastante comuns em solos naturais e solos agrícolas, e em materiais orgânicos em decomposição (Barron, 1977). Podem ser caracterizados como predadores, endoparasitas, parasitas de ovos e de cistos, e produtores de metabólitos tóxicos aos nematóides (Mankau, 1980; Jatala, 1986). Os predadores produzem modificações nas hifas resultando em órgãos de captura de nematóides, que podem ser adesivos ou não, sendo que o material adesivo pode cobrir totalmente a superfície da hifa ou, restringir-se às estruturas especializadas como ramificações, bulbos ou malhas. Em algumas espécies desses fungos desenvolvem-se órgãos não adesivos chamados de anéis, os quais são formados por três células, que em algumas espécies dilatam-se e capturam os nematóides (Mankau, 1980; Jatala, 1986; Barron, 1977). Uma vez o nematóide capturado, o seu corpo é penetrado pelas hifas que se alojam no seu interior e consomem o seu conteúdo (Barron, 1977). Esses fungos tem sido descritos e estudados por mais de um século (Stirling, 1991).

O controle biológico de fitonematóides através de fungos, apesar de suas vantagens para o meio ambiente, tem apresentado diversos problemas para uso extensivo no meio rural como por exemplo a produção massal, aplicação no campo, e melhoria da eficiência no controle

de fitonematóides. Diversos estudos têm sido desenvolvidos para a obtenção de substratos de baixo custo e de grande disponibilidade nas fazendas, para a produção massal e aplicação destes fungos nematófagos nas culturas, seguido do seu monitoramento no campo (Stirling, 1991).

Tarjan (1960) verificou que casca de aveia moída foi o melhor substrato orgânico no cultivo e esporulação dos fungos *Arthrobotrys musiformis* e *Arthrobotrys oligospora* em comparação com os substratos torta de filtro de cana de açúcar, farelo de milho, soja moída e casca de aveia. Embora o autor tenha encontrado estes resultados avaliando a esporulação e o crescimento micelial, o trabalho não se refere ao método utilizado para a avaliação do crescimento.

Naves e Campos (1991), demonstraram que *Arthrobotrys musiformis* e *Arthrobotrys conoides* veiculados em grãos de trigo foram eficazes no controle de *Meloidogyne javanica*, quando incorporado antes da infestação deste nematóide em vasos contendo plantas de tomate, em condições de casa de vegetação.

Dias e Ferraz (1994) concluíram que os fungos *Arthrobotrys irregularis* e *Arthrobotrys thaumasia* quando veiculados em milho triturado, foram capazes de reduzir o número de galhas também em cultura de tomate, tanto aos 60 dias após o transplântio como aos 30 dias nas raízes remanescentes do plantio anterior.

Dias e Ferraz (1993), avaliando a produção de micélio e esporulação de diversas espécies do fungo nematófago *Arthrobotrys* spp., em diversos substratos, como milho triturado, quirera de arroz, bagaço de cana-de-açúcar picado e casca de café, concluíram que houve boa produção de micélio para todas as espécies nos dois primeiros substratos, porém nestes, a esporulação foi muito pequena ou não ocorreu. Em contra partida, para os dois substratos seguintes não houve a produção de micélio, ou quando houve foi de difícil visualização. Para a

avaliação do crescimento micelial o autor utilizou da contagem em hemacitômetro, de conídios produzidos em um grama de substrato amostrado. A produção de micélio só foi observada quanto a ausência ou presença do mesmo, sem estabelecer relação com a massa fúngica produzida.

Campos (1994) obteve bom controle da população de *Meloidogyne incognita* raça 2 em feijoeiro e de *M. exigua* em cafeeiro ao utilizar *Arthrobotrys conoides* e *Arthrobotrys musiformis* cultivados em grãos de trigo. Machado (1994), cultivou os fungos *Verticillium chlamyosporium*, *Paecilomyces lilacinus* e *Arthrobotrys conoides* em farelo de arroz, casca de arroz, sabugo de milho, bagaço de cana, casca de café e esterco bovino, obtendo melhor crescimento micelial em farelo de arroz, sendo em contrapartida a casca de café, o substrato que apresentou o menor crescimento. O melhor controle de *Meloidogyne javanica* foi obtido quando estes fungos foram cultivados no esterco bovino e incorporados em tomateiros infestados por esse fitonematóide. A avaliação do crescimento micelial desses fungos nos substratos foi feita utilizando-se uma escala visual empírica, bem como a contagem de conídios produzidos.

Na maioria dos experimentos até agora realizados com fungos antagonistas visando o controle de fitonematóides, não se tem estimado o crescimento fúngico nos substratos usados no cultivo das plantas hospedeiras de fitonematóides, mas sim a população do nematóide hospedeiro do fungo e o crescimento da planta.

Stirling (1991), ressalta a pouca atenção dada ao monitoramento das populações de microorganismos introduzidos, com o objetivo de se confirmar se os mesmos são os legítimos responsáveis pelos níveis de controle observado.

Nas duas últimas décadas, técnicas tem sido desenvolvidas para a quantificação de esporos e propágulos. Assim Crump e Kerry (1981), desenvolveram para os fungos

*Nematophthor* *gynophila* e *Verticillium chlamydosporium* um procedimento de extração e contagem direta de clamidiosporos. Esta técnica é possível de ser modificada para outros fungos que possuam esporos de fácil identificação.

Também foi investigada a possibilidade do uso de meios seletivos para a quantificação de *Paecilomyces lilacinus* e *Verticillium chlamydosporium* para experimentos de monitoramento em campo por Mitchell, Kannwisher-Mitchell e Dickson (1987); Cabanillas e Barker (1989); Gaspard, Jaffé e Ferris (1990); De Leij e Kerry (1991). Para outros fungos nematófagos estas técnicas ainda precisam de adaptações e testes.

Métodos quantitativos envolvendo diluições em placas foram desenvolvidos por Eren e Pramer (1965); Stirling, McKenry e Mankau (1979); Dackman et al. (1987) para determinar o número provável de fungos predadores. No entanto, essas técnicas são demoradas necessitando-se de até duas semanas para o exame das placas.

Sabe-se, contudo, que os fungos produzem esporos e micélio, e que a quantificação apenas de esporos não expressa totalmente o crescimento desses organismos. O fungo pode não produzir esporos e estar crescendo vegetativamente, e exercendo o parasitismo nos nematóides, já que em sua grande maioria, os fungos possuem necessidades nutricionais distintas para estas duas fases (Dias e Ferraz, 1993). Por outro lado o método de diluições em placas envolvendo contagem do número de colônias não expressa quantitativamente os propágulos que resultam na produção de cada colônia fúngica, além da necessidade do organismo avaliado possuir característica única que o distinga com facilidade dos demais (Alexander, 1982). Deste modo, a utilização de métodos químicos na avaliação do crescimento de fungos antagonistas poderá ser mais quantitativa avaliando-se, portanto, a produção de micélio e de esporos. Como a quitina não

ocorre em plantas superiores e se restringe a um pequeno grupo de organismos (Tracey, 1955), a avaliação do seu teor poderá ser útil na quantificação de fungos antagonistas a fitonematóides.

No século dezenove, Braconnot (1811), citado por Aronson (1965) e Tracey (1955) publicou resultados de análises químicas em diversas espécies fúngicas. Em todas elas foi notada a presença marcante de um componente da parede, bastante resistente e que após tratamentos com reagentes altamente alcalinos, permanecia intacto. Acreditando ter descoberto uma característica única dos fungos, Braconnot nomeou esta substância de “fungina”.

Em estudos sobre a natureza de integumentos de insetos, Odier (1823), também citado por ambos autores acima listados, descobriu um componente que também resistia a ação de reagentes alcalinos. Para esta substância foi proposto o nome quitina. Odier não avaliou a possibilidade da semelhança entre as duas substâncias, “fungina” e “quitina” mas, mesmo assim o termo quitina ganhou aceitação geral. Quitina é proveniente do grego Chiton, significa capa ou cobertura, podendo portanto ser aplicada corretamente tanto para constituição celular dos fungos como dos insetos.

A quitina é um polímero linear constituído de moléculas do monômero *N*-acetilglucosamina unidas por ligações  $\beta$  (1-4), formando a  $\beta$ -1,4-*N*-acetilglucosamina (Lehninger, 1984; Tracey, 1955), e constitui um dos principais componentes da parede celular de alguns grupos de fungos como as das classes quitridiomycetes e zigomicetes e os das subdivisões ascomycotina, basidiomycotina e deuteromycotina, estando presente também na parede de esporos e endósporos de bactérias, carapaça ou exoesqueleto de artrópodes, insetos e crustáceos (Lehninger, 1984; Donald e Mirocha, 1977). Além disso, a quitina não ocorre em algumas leveduras nem em oomicetes (Krugner e Bacchi, 1995), os quais possuem a sua parede constituída principalmente de cadeias de celulose.

A quitina pode ser considerada como um análogo da cadeia principal das glucanas dos peptídeo-glucanos, constituído das subunidades  $\beta$ -(1-4)-*N*-acetilglucosamina e ácido-*N*-acetilmurâmico, constituintes característicos da parede celular dos procariontes (Romeiro, 1995). A quitina fúngica se diferencia destes por ser um polímero constituído estritamente de moléculas de *N*-acetilglucosamina, enquanto os peptídeo-glucanos são polímeros heterogêneos com as moléculas de *N*-acetilglucosamina intercaladas com as de ácido-*N*-acetilmurâmico (Goto, 1992). Diferenciam-se também da quitina dos procariontes por serem formadas somente pela ação de uma única enzima, enquanto os peptídeo-glicanos necessitam da interferência de mais enzimas (Husley e Burnet, 1970; Godday, 1977), e também por serem encontradas em maior quantidade nos fungos do que nas bactérias (Cochrane, 1958). Muzzarelli (1977), citado por Zeltins e Schrempf (1995), em análise visual, baseada na difração de raio X, da molécula de quitina fúngica, demonstrou uma maior quantidade da conformação microcristalina conhecida como  $\alpha$ -quitina, na qual presumivelmente suas cadeias de microfibrilas ocorrem de forma antiparalela, em relação a  $\beta$ -quitina, que possui cadeias paralelas.

Apesar da quitina ser considerada comumente como um homopolímero de *N*-acetilglucosamina, mesmo nas moléculas de quitina cristalizada, pode existir uma certa quantidade de resíduos de glucosamina não acetilada. Estas são chamadas de quitosan, ou seja, moléculas de glucosamina não acetiladas. Podem também existir diversos polímeros com graus diferentes de acetilação entre a quitina e o quitosan na parede celular fúngica (Wessels, 1986).

Com respeito a síntese de parede, muitos estudos radiográficos têm demonstrado que os componentes desta, como a quitina e as glucanas, são mais ativamente sintetizados na porção apical da hifa em crescimento (Wessels, 1986; Gooday, 1977).

Há grandes evidências de que a síntese de quitina ocorra somente ao nível da membrana plasmática, sendo este o principal sítio de sua polimerização. Não existem evidências de nenhuma pré-polimerização intracelular seguida de posterior movimento extravasativo destas macromoléculas. Também não existem evidências da ação de componentes lipídicos pertencentes a membrana plasmática como intermediários nesse processo (Moore-Landecker, 1996).

Durante o crescimento da parede celular fúngica, as reações bioquímicas de produção da quitina envolvem diversas enzimas e substratos como na maioria dos organismos (Lenhinger, 1984). Isto pode ser visualizado na Figura 1 que demonstra a rota metabólica de produção de quitina.

Como citado anteriormente durante o crescimento da parede celular fúngica, tem-se somente detectado a ação de uma única enzima responsável pela polimerização da quitina, a quitina sintetase (Gooday, 1977). Porém Bulawa (1993) encontrou três tipos de enzimas quitina sintetase semelhantes, as quitina sintetase I, II e III, no fungo *Saccharomyces cerevisiae*. Estas três enzimas seriam resultantes da ação de três gens CHS1, CHS2 e CHS3, respectivamente. Nas células, estas três enzimas possuem funções diferenciadas. As enzimas quitina sintetase I e II, seriam responsáveis pela produção de somente 10% da quitina celular, enquanto 90% seria pela ação da quitina sintetase 3. A quitina sintetase I é requisitada para ação na germinação normal. A quitina sintetase II age na morfologia normal, septação e separação celular. Enquanto que a quitina sintetase III possui ação na cicatrização celular e no crescimento da parede lateral.

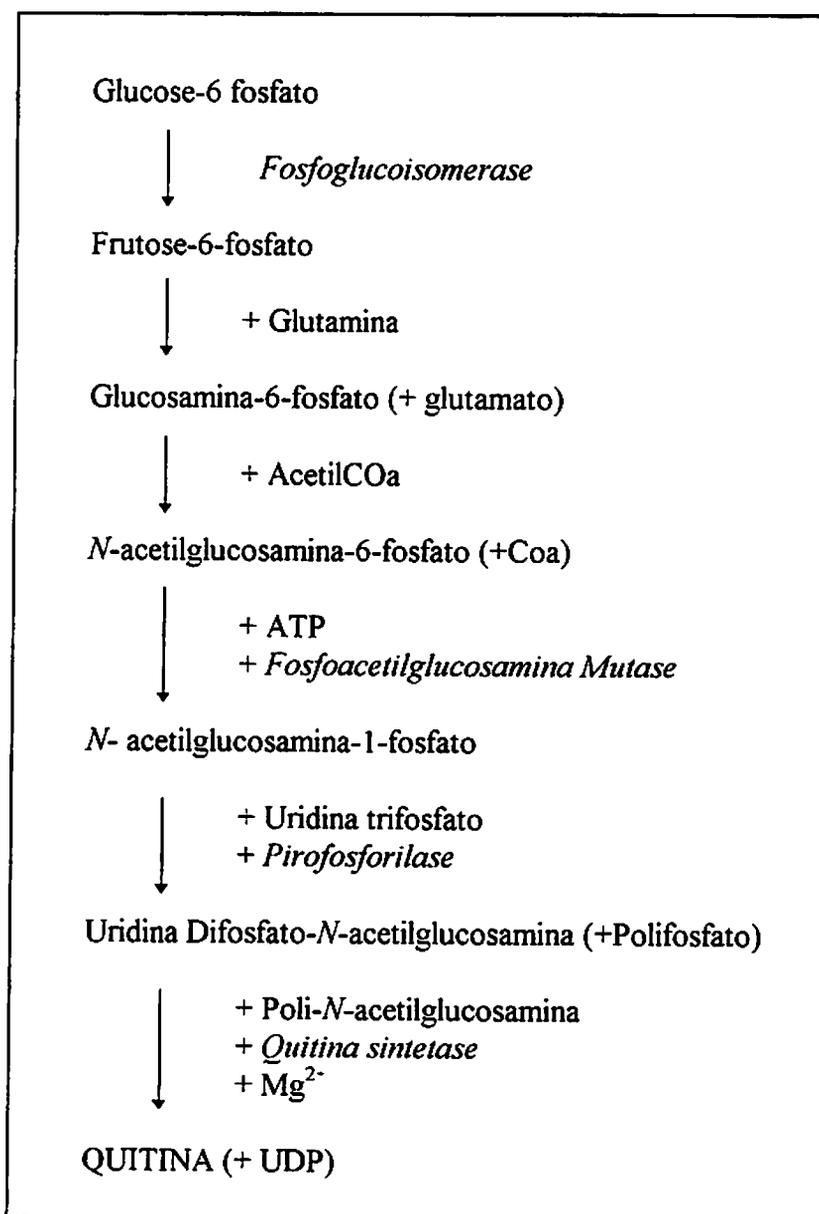


FIGURA 1 - Reações enzimáticas responsáveis pela síntese de quitina na parede celular fúngica (Adaptado de Burnett, 1976).

A quitina sintetase possui ação alostérica e atua principalmente na membrana plasmática. A sua atuação é ativada principalmente pela presença do substrato uridina difosfato *N*-acetilglucosamina (Figura 2). Levando-se em conta a ausência de outros fatores, a enzima

somente é apreciadamente ativada quando a presença deste substrato se encontra em concentrações suficientes para proporcionar a formação de produtos macromoleculares com cadeias longas (Gooday, 1977).

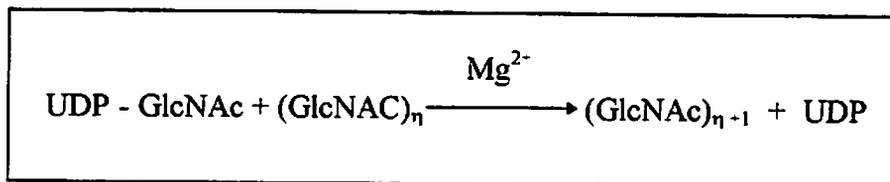


FIGURA 2. Reação de ativação de enzima quitina sintetase (Adaptado de Gooday, 1977).

Os principais produtos desta ação enzimática são o polímero *N*-acetilglucosamina e a uridina difosfato, sendo este último um potente inibidor desta enzima. Possuindo característica semelhante a todas as enzimas alostéricas, a quitina sintetase também possui, além do monômero *N*-acetilglucosamina, diversos fatores que atuam no seu controle enzimático, tais como, o dímero da quitina, o diacetil chitobiose, que são capazes de ativá-la. Porém estes dois fatores não se encontram livres entre os componentes celulares, mas provavelmente se encontram em locais onde a dinâmica da biosíntese é bastante ativa. Portanto eles devem exercer importante função no equilíbrio da biosíntese (Wessels, 1986).

A parede celular do fungo, possuindo rigidez considerável, concede estabilidade para as formas de hifas vegetativas e várias estruturas reprodutivas (Aronson, 1965). A textura fibrosa das paredes celulares fúngicas foi observada pela primeira vez por Frey-Wyssling e Mühlethaler (1950) no esporangióforo de *Phycomyces*, conforme citado por Aronson (1965).

Estudos ultraestruturais tem demonstrado uma similaridade geral na construção da parede, entre os diversos grupos fúngicos, sendo geralmente destacada a existência de uma camada interna contendo microfibras de quitina ou celulose aparentemente embebidas em outros polímeros, seguida de uma ou mais camadas exteriores. Como regra geral as camadas mais exteriores são solúveis em reagentes básicos, restando a camada mais interna como resíduo insolúvel (Wessels, 1986).

Hunsley e Burnett (1970) estudando a parede celular do fungo *Neurospora crassa* modelaram a parede como uma estrutura tipicamente em camadas. Do exterior para o interior se encontram as seguintes camadas: a)  $\alpha$  e  $\beta$ -glucanas; b) retículos glicoprotéicos fundidos em uma camada proteinácea; c) camada constituída de proteínas distintas; d) região quitinácea interior na qual as microfibrilas de quitina se encontram embebidas em material proteináceo. É importante se destacar que não ocorre uma divisão distinta entre essas camadas, sendo que na verdade elas se encontram interrelacionadas nos diversos locais de transição.

Quanto a hifa fúngica, a principal característica do seu crescimento é a presença localizada de crescimento apical (Wessels, 1986; Gooday, 1977). Característica esta também encontrada em tubos políneos e pontas de raízes (Steer e Steer, 1989). Com base nesta característica a região de crescimento foi dividida em três subregiões distintas, principalmente quanto a presença de organelas. A região distal é chamada de domo apical e se caracteriza por apresentar vesículas de diversos tamanhos, responsáveis pelo transporte de diversos precursores

da parede, e também as enzimas responsáveis pela quebra e construção da parede e extensão da membrana plasmática. Entre estas vesículas se encontram os quitossomos, que são envelopes contendo a enzima quitina sintetase e responsáveis pelo transporte e assimilação desta enzima a membrana plasmática. Estas vesículas se agregam à membrana plasmática formando o lomassoma, uma invaginação da membrana, responsável pela sua extensão (Deacon, 1983). No domo apical também ocorre o Spitzenkörper, estrutura densa provavelmente responsável pelo direcionamento do crescimento da hifa. Esta estrutura ocorre somente em hifas em processo de crescimento (Deacon, 1983, Grove e Bracker, 1970). Na região subapical se encontram as organelas comuns a outros organismos eucariotas como complexo de golgi, mitocôndrias, ribossomas e retículos endoplasmáticos. Estas organelas se encontram intimamente relacionadas com a produção das vesículas anteriormente citadas (Moore-Landecker, 1996). Após esta região o número destas organelas diminui em quantidade, sendo que começam a aparecer vacúolos, bem como o número de núcleos geralmente tende a aumentar. Também ocorre o aparecimento de cristais de glicogênio e corpos lipídicos, bem como inclusões cristalinas, entre elas algumas constituídas de esterol, mais especificamente o ergosterol (Grove e Bracker, 1970).

A dinâmica da adição de moléculas de quitina a parede celular, ocorre de forma bastante equilibrada, envolvendo enzimas liticas e a enzima quitina sintetase, sendo as mesmas responsáveis pela quebra e reconstrução da parede no domo apical, respectivamente. Este mesmo estudo demonstrou que a quitina sintetizada no ápice é insolúvel em bases. Um estudo subsequente usando microscopia eletrônica autoradiográfica em preparações refletidas, revelou que a quitina em ápices de crescimento, ainda insolúvel em bases, se encontra em um estado conformacional completamente diferente daquela em ápices em repouso e partes subsequentes.

Em contraste com a quitina destas partes mais velhas, a nova quitina sintetizada nos ápices aparece de forma não fibrilar (Wessels, 1986). Esta claro que a minúscula quantidade de material presente na parede do ápice de crescimento não contribui significativamente para a quantificação da quitina total em análises químicas. De fato, este material apical pode estar totalmente ausente em preparações onde a parede das hifas são quebradas (Wessels, 1993)

Após tratamentos químicos para visualizar as microfibrilas de quitina, foi observado o aumento em espessura e densidade das mesmas da extremidade para a base da hifa (Wessels, 1986).

Diversos trabalhos tem sido feitos utilizando a técnica de extração de quitina com o objetivo de detectar, quantificar e monitorar o crescimento de fungos. A técnica tem sido utilizada em diversos elementos como produtos industrializados de tomate (Jarvis, 1977; Bishop et al., 1982; Cousin, Zeidler e Nelson, 1984; Lin e Cousin, 1985; Pettipher, Williams e Gutteridge, 1985), grãos armazenados (Donald e Mirocha, 1977; Bethlenfalvay, Pacovsky e Brown, 1981; Nandi, 1978; Golubchuk, Cuendet e Geddes, 1960; Mayama, Rehfeld e Daly, 1975; Whipps et al., 1980; Roberts et al., 1991), tecidos vegetais (Wu e Stahmann, 1975; Ride e Drisdale, 1971; Ride e Drisdale, 1972, Toppan, Esquerré-Tugayé e Touzé, 1976), feno de alfafa (Roberts et al., 1987a; 1987b). Esta técnica consiste, primeiramente em se provocar a quebra das cadeia polipeptídicas da molécula de quitina através da hidrólise, a qual pode ser feita sob ação ácida (Weng e Hotchkiss, 1991; Blumenthal e Roseman, 1957), básica (Donald e Mirocha, 1977; Nandi, 1978; Ride e Drisdale, 1972) ou enzimática (Ride e Drisdale, 1971). A hidrólise básica possui diversas vantagens como digestão básica de artefatos provenientes do material vegetal, redução no tempo de análise, e tornando desnecessário o uso de enzimas específicas (Bishop et al., 1982). Nesta hidrólise básica a quitina é despolimerizada através da ação de reagentes básicos

a altas temperaturas. Neste processo surge o quitosan, que se encontra parcialmente despolimerizado e deacetilado. O quitosan mantém-se insolúvel na solução básica e o restante dos componentes da parede é retirado com sucessivas lavagens e centrifugações em soluções aquoetanólicas. O quitosan é posteriormente transformado em glucosamina através da deaminação com ácido nitroso, para formar o aldeído 2,5-anidromanose, o qual pode ser determinado colorimetricamente (Ride e Drisdale, 1972).

Bethlenfalvay, Pacovsky e Brown (1981) concluíram que autoclavagens superiores a uma hora na extração poderiam gerar menor intensidade da coloração devido a degradação da quitina. Lin e Cousin (1985) definiram como 2 horas o melhor tempo para autoclavagem. Entretanto, a maioria dos trabalhos sugere o tempo médio de 1 hora para a hidrólise.

Cousin, Zeidler e Nelson (1984), concluíram que durante etapa de extração alguns fatores não influenciam os resultados obtidos na análise de quitina como a diluição da amostra, uso dos reagentes preparados a temperatura ambiente e a intervalos de uma hora durante cada etapa do processo. Porém outros fatores podem alterar os resultados, como a adição de reagentes fora de seqüência, falha no aquecimento e na mistura das soluções nos devidos tempos, bem como a utilização de reagentes preparados com muita antecedência (velhos) ou mal armazenados.

Esta técnica utilizada na detecção de patógenos em sementes tem demonstrado algumas vantagens, sendo principalmente a rapidez na obtenção de resultados (4 a 5 horas) em comparação com os métodos mais comumente utilizados, como o plaqueamento (7 a 8 dias). Porém a análise de sementes através do teor de glucosamina apresenta desvantagens como a não descrição dos fungos atuantes nas sementes, a quantificação de glucosamina proveniente de

fungos já mortos e não ativos e a falta de parâmetros relativos aos tempos de infecção para comparação com os coeficientes de controle previamente estipulados. (Donald e Mirocha, 1977).

Nandi (1978), fazendo amostragens semanais durante o armazenamento de sementes de trigo inoculadas com os fungos *Aspergillus candidus* Link, *Aspergillus glaucus* Link, *Penicillium* sp., demonstrou que houve um aumento constante na taxa de glucosamina durante o período avaliado para os três fungos. Donald e Mirocha (1977), estudaram a viabilidade da técnica de glucosamina na avaliação de grãos armazenados de soja e milho, em comparação com a técnica de plaqueamento, também obtiveram resultados semelhantes. Estes resultados demonstraram que ocorre uma relação entre estes dois parâmetros, porém sendo ambos distintos. O primeiro informa a quantidade de glucosamina fúngica total encontrada na amostra, enquanto o segundo informa a porcentagem de sementes infectadas e as espécies de fungos infectantes. Isto gera controvérsia pois pode-se obter uma amostra com 100% das sementes infectadas, porém com baixa quantidade de glucosamina existente, e por outro lado pode-se obter um lote com alto teor de glucosamina e somente poucas sementes com alto grau de infecção.

Golubchuk, Cuendet e Geddes (1960), testaram a técnica de quitina com relação a diversos parâmetros de avaliação de armazenamento de sementes de trigo, e obtiveram uma relação inversamente proporcional entre a quantidade de quitina extraída, a viabilidade da sementes e a quantidade de ácidos graxos existentes. Não foi observada nenhuma relação entre o número de esporos extraídos e a quantidade de quitina extraída.

Roberts et al. (1991) também encontrou uma boa relação, entre a quitina extraída de grãos de cevada infectados naturalmente e artificialmente com o índice visual de contaminação para os fungos *Aspergillus ochraceus*, além de ter obtido boa relação entre esta técnica e a contagem de esporos. Rotter et al. (1989) também estudando este fungo em grãos de cevada

obteve resultados semelhantes, além de observar a variação de quitina entre *A. ocraceus* e outras espécies de fungos, bem como variação de acordo com o tempo de armazenamento.

Um dos fatores que interfere mais nos resultados obtidos, superestimando-os é a presença de compostos glicoproteicos semelhantes a glucosamina no interior de sementes. (Pusztai, 1964).

Nandi (1978) demonstrou que existe uma certa quantidade de glucosamina no interior de sementes de trigo, atingindo valores em torno de 123  $\mu\text{g/g}$ . Este fato também foi demonstrado por Pusztai (1964) em sementes de Trevo, nas quais foram encontrados valores de até 51.000  $\mu\text{g/g}$ , e por Donal e Mirocha (1977) em grãos de soja e milho, os quais atingiram valores de 15-25  $\mu\text{g/g}$  e 100-120  $\mu\text{g/g}$  respectivamente. Porém tem sido observado na prática que está interferência não ocorre, ou quando ocorre a mesma é insignificante.

Em produtos de tomate também tem sido utilizada a técnica de extração de quitina para a determinação de contaminação fúngica. Pettipher, Williams e Gutteridge (1985), obtiveram uma boa relação entre a contagem de fungos pela técnica de Howard, a qual se baseia em contagem direta de hifas, e a análise de quitina, porém esta última demonstrou ser mais demorada.

Bishop et al. (1982), também encontrou uma boa relação entre estes dois parâmetros, entre diversos fungos adicionados a produtos industrializados de tomate, obtendo retorno de até 100% da quantidade fúngica adicionada. Estes trabalhos tem demonstrado grande vantagem em relação a técnica de Howard principalmente quando relacionada com produtos triturados, pois neste caso obtem-se um número maior de hifas pertencentes a um mesmo inóculo contaminante, o que superestima a população avaliada pela técnica de Howard. Este fato também foi percebido por Cousin, Zeidler e Nélon (1984). Jarvis (1977), obteve os mesmos resultados das pesquisas

anteriormente citadas, além de perceber que a taxa de quitina nos fungos aumenta em função do tempo, porém não de forma linear, além de ocorrerem diferenças entre as espécies testadas.

Roberts et al. (1987a) utilizaram-se da extração alcalina de quitina para poder estimar a contaminação fúngica em feno de alfafa. Este trabalho objetivou relacionar esta técnica com o número de esporos obtidos e o índice visual estimativo. Para o primeiro parâmetro não houve relação significativa mas a mesma ocorre para o segundo parâmetro

Para fungos micorrízicos a quitina também tem sido utilizada para estimar a massa fúngica em relação a vegetal, tanto de maneira direta como indireta. Benthalfavay, Pacovsky e Brown (1981), estudando o fungo micorrízico *Glomus fasciculatus* em soja, obtiveram relação significativa de 90% entre os processos quantitativos de avaliação histológica e a extração de quitina, para porcentagens de infecção de até 60%, não havendo diferença em porcentagens de infecção superiores. Hepper (1977), utilizando este método colorimétrico, objetivou encontrar uma relação entre a intensidade de infecção de fungos micorrízicos endofíticos, através do peso fresco e seco das raízes, e a quantidade de glucosamina. Esta relação foi bastante significativa para os quatro gêneros de plantas e quatro fungos micorrízicos testados. Porém para este caso supõem-se que a quantidade de hifas fora e dentro da raiz são iguais e que as paredes dos fungos também, o que na realidade não ocorre.

A produção de quitina nos fungos poderá variar com o meio de cultivo empregado. Blumenthal e Roseman (1957) testando diversos fungos fitopatogênicos quanto a porcentagem de quitina presente na parede celular, chegaram a conclusão de que a quantidade da mesma aumenta com o passar do tempo quando os mesmos se encontram em meio de cultura ácido. Wu e Stahmann (1975), utilizando um fungo saprófita isolado em meio de cultura, quantificaram

quitina através da análise de glucosamina, e encontraram uma relação linear entre o peso seco micelial e a quantidade de quitina extraída deste fungo.

Plassard, Mousain e Salsac (1982), utilizando a técnica de extração de quitina em diversos basidiomicetes cultivados “in vitro”, obtiveram uma relação linear entre o peso seco e o peso fresco micelial e a quantidade de glucosamina analisada. Bishop et al. (1982) observaram a variação da quantidade de quitina em função da espécie do fungo, condições nutricionais e de aeração dos meios de cultura e da idade da cultura.

Contudo, esses casos reforçam a necessidade de melhor controle experimental incluindo testemunhas para análise do teor inicial no substrato em estudo.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

O experimentos foram realizados no Laboratório de Nematologia do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras - UFLA, MG.

#### **3.1 Isolamento e manutenção dos fungos nematófagos**

Os fungos foram isolados a partir de amostras de terra da região de Lavras, Minas Gerais. Foi utilizada a técnica de centrifugação diferencial de Barron (1969), modificada por Nicolay e Sikora (1988) e adaptada por Naves e Campos (1991). Suspenderam-se 150g de solo em 100 ml de água, completando-se o volume para 350ml e agitando-se por 10 minutos. Em seguida, passou-se este volume por uma peneira de 0,810 mm, lavando-se os resíduos com mais água e coletando-se a suspensão num becker. Esta suspensão foi novamente agitada por 10 minutos e passado por uma peneira de 0,250 mm sendo novamente repetido o processo de lavagem e coleta. Novamente a suspensão foi agitada por 10 minutos e passado em peneira de 0,044 mm. A suspensão final foi distribuída em tubos de centrifuga e centrifugado por 2 minutos a 680g (1740 rpm). Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e o resíduo distribuído

em forma de cruz sobre placas de Petri de 90 mm de diâmetro contendo meio ágar-água 2%. Nessas placas foram adicionados fragmentos de meio cultura contendo os nematóides-isca, *Panagrellus redivivus*. As placas foram então lacradas e incubadas a 20°C. Foram feitas observações diárias a procura de estruturas fúngicas predatórias, bem como estruturas reprodutivas. Após o surgimento dos conidióforos, os mesmos foram transferidos, com o auxílio de um microscópio estereoscópico instalado em câmara de fluxo laminar, para placas de Petri contendo meio BDA (batata, dextrose e ágar).

Os fungos isolados foram *Arthrobotrys conoides*, *Arthrobotrys musiformis*, e *Arthrobotrys* sp., os quais foram mantidos em meio de cultura BDA.

O nematóide-isca, *Panagrellus redivivus*, foi multiplicado e mantido em cultura bacteriana. Este nematóide já se encontrava isolado e tem sido mantido em meio de cultura pelo Laboratório de Nematologia da Universidade Federal de Lavras. Placas de Petri receberam meio artificial esterilizado por autoclavagem a 120°C por 20 min., composto de 0,3% de farinha láctea, 1,5% de ágar e água destilada o suficiente para completar o volume para 1000 ml, sendo em seguida adicionados os nematóides-isca. As placas foram mantidas a 20°C e repicadas a cada 20 dias.

### **3.2 Avaliação do crescimento micelial e esporulação de *Arthrobotrys conoides*, *Arthrobotrys musiformis* e *Arthrobotrys* sp. em meios de cultura**

Para avaliação do crescimento micelial e esporulação em meio de cultura foram utilizados os meios BDA (batata, dextrose e ágar) e YPSS (4g extrato de levedura; 1g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,5g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 20g amido solúvel; 1000 ml H<sub>2</sub>O destilada), segundo Stirling, McKenry e

Mankau (1979) modificado pela adição de 20g de ágar/litro de meio. Placas contendo os respectivos meios de cultura receberam discos de micélio de 4 mm de diâmetro provenientes de culturas fúngicas crescidas em meio BDA com 7 dias de idade.

Para avaliação do crescimento micelial foi medido o diâmetro da colônia no quarto dia após a repicagem.

A avaliação da esporulação foi feita no décimo segundo dia após a repicagem. Em cada placa adicionaram-se 10 ml de água e 2 gotas de Tween para auxiliar na dispersão dos esporos. Com o auxílio de um bastão de vidro cada placa foi raspada levemente em sua superfície, sendo a suspensão de esporos recolhida e levada para avaliação em hemacitômetro.

Foram feitas 5 repetições para cada fungo testado nos diferentes meios de cultura. A leitura em hemacitômetro foi feita duas vezes para diminuição do erro de leitura.

### **3.3 Avaliação da esporulação e crescimento micelial de *Arthrobotrys conoides*, *Arthrobotrys musiformis* e *Arthrobotrys* sp. em substratos de baixo custo**

#### **3.3.1 Obtenção e preparo dos substratos de baixo custo**

Os fungos também foram testados quanto ao crescimento micelial e esporulação para substratos de baixo custo. Os substratos testados foram farelo de arroz, quirera de arroz, casca de arroz, esterco bovino e palha de feijão. Os substratos tiveram preparações semelhantes, somente sendo diferenciadas em dois aspectos, quanto a retirada de materiais estranhos e secagem prévia a moagem.

O esterco bovino foi adquirido em propriedade local, sendo seco ao ar livre e peneirado, para a retirada de resíduos vegetais e pedras. O substrato palha de feijão foi obtido restos de lavoura pertencente a Universidade Federal de Lavras, sendo utilizado para a sua produção folhas, caules, raízes e vagens. Os substratos casca de arroz, farelo de arroz e quirera de arroz foram obtidos no comércio local. Todos os substratos após secos e selecionados foram moídos em moinho tipo Marconi-MA048 contendo peneira de malhas. Em cada substrato foi adicionado água destilada e esterilizada por autoclavagem durante um período de 30 minutos para umedecimento. Em seguida, retirou-se o excesso de água através da passagem em peneira. Em placas de Petri de 90 mm de diâmetro foram colocados 10g de cada substrato. Esses recipientes foram autoclavados a 120°C durante uma hora. O processo foi repetido três vezes com intervalo de dois dias entre as autoclavagens.

A cada placa contendo os substratos foram adicionados 4 discos de micélio de 4 mm de diâmetro de forma equidistante, contendo os fungos *Arthrobotrys conoides*, *Arthrobotrys musiformis* e *Arthrobotrys* sp. Após a repicagem as placas foram vedadas com “rolopac” e levadas para incubação durante 20 dias a 27°C. As testemunhas não receberam inóculo fúngico.

### **3.3.2 Avaliação da esporulação através de hemacitômetro**

Para a avaliação da esporulação dos fungos nos substratos de baixo custo , foram feitas amostragens ao décimo e vigésimo dia. De cada placa foi retirado 1,0 g de substrato que após homogeneizado, foi colocado em béquer de 50ml contendo 10 ml de água destilada mais 2 gotas de Tween. Estimou-se o número de conídios produzidos em hemacitômetro.

### **3.3.3 Avaliação do crescimento micelial através da quantidade de quitina produzida**

As amostragens para a avaliação da quitina produzida foram feitas aos 2, 4, 6, 8 e 10 dias após a repicagem de cada cultura fúngica para os substratos. As placas foram abertas em câmara de fluxo laminar e homogeneizadas, sendo a seguir retirado 1,0 g de substrato, em seguida a amostra foi dividida em duas subamostras de 0,5 g, para a extração da quitina. As testemunhas não repicadas com os fungos antagonistas, foram também amostradas da mesma forma para análise de quitina.

#### **3.3.3.1 Construção da curva padrão de glucosamina.**

Para a determinação da curva padrão, determinou-se a absorbância de diferentes concentrações de D (+) - glucosamina Sigma (grau de pureza: 99%) pura, sendo as mesmas 50µg, 100µg, 150µg e 200 µg de glucosamina por ml de HCl. Na amostra em branco a glucosamina-HCl foi substituída por água destilada, deionizada e esterilizada. Estas soluções e a amostra em branco sofreram todos os processo de colorimetria idênticos as amostras dos substratos abaixo descritas.

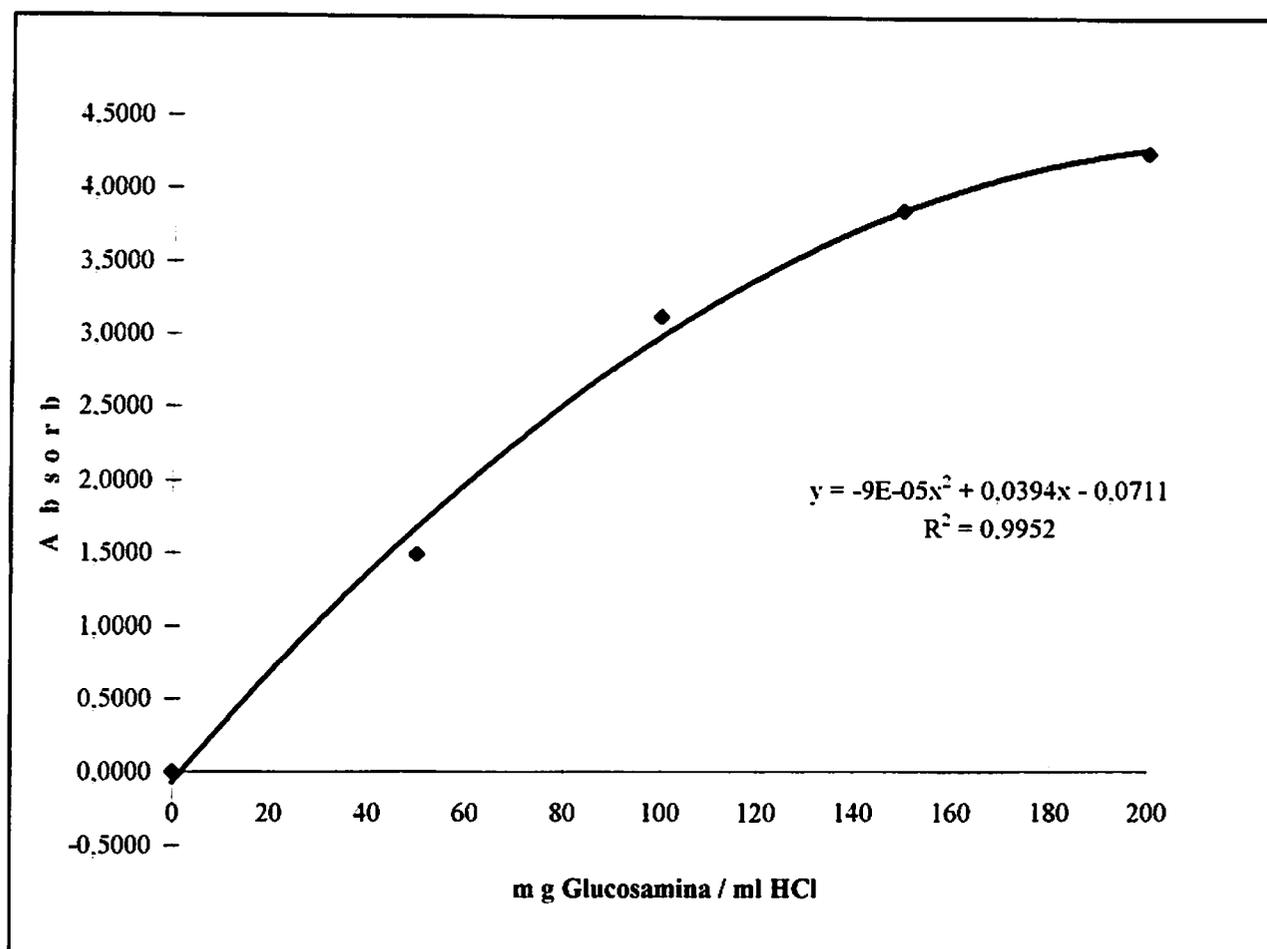


FIGURA 3: Curva padrão de glucosamina expressa em  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de HCl.UFLA, Lavras - MG, 1997.

Quanto a característica da curva padrão de glucosamina-HCl, esta apresentou tendência linear entre as concentrações de 0 e  $50\mu\text{g}$  de glucosamina. Com o aumento das concentrações a curva de resposta de absorbância tendeu a estabilidade. Diversos autores relatam este fato em seus trabalhos. Cousin, Zeidler e Néelson (1984), utilizando uma curva padrão com variação entre 0 e  $150\mu\text{g}$  de glucosamina obtiveram uma resposta linear até  $50\mu\text{g}$  e não linear após este valor. Esta mesma característica foi obtida por Bishpo et al. (1982) e Tsuji,

Kinoshita e Hoshino (1969). Para Pettipher, Williams e Gutteridge (1985) resposta se encontrou entre os valores de 0 $\mu$ g e 70 $\mu$ g de glucosamina.

### 3.3.3.2 Extração da quitina fúngica

O teor de quitina foi avaliado através da extração da glucosamina dos substratos utilizando-se a técnica de Ride e Drisdale (1972), adaptada por Donald e Mirocha (1977). A técnica consiste na hidrólise básica da quitina da parede celular até glucosamina. Primeiramente, 0,5g do substrato foi colocado em um tubo plástico de centrífuga de fundo cônico e tampa rosqueável adicionando-se a seguir 4,0 ml de KOH (120g KOH/1000ml H<sub>2</sub>O). Os tubos foram parcialmente fechados, de modo a proporcionar a troca de gases, autoclavados a 125°C por 1 hora, e resfriados a 0°C, pela imersão em gelo moído. A seguir cada tubo recebeu 8ml de solução aquo-etanólica (70%) resfriada a 4°C e cobertura com 1,0 ml de Celite (1g/20ml de etanol 70%), sendo então centrifugados a 7000 rpm por 10 minutos em centrífuga refrigerada a 0°C. O sobrenadante foi descartado e em cada tubo foram adicionados 8,0 ml de solução aquo-etanólica (40%) resfriada a 4°C. Nova centrifugação foi feita e o sobrenadante foi novamente descartado. A seguir, foram feitas mais duas centrifugações com 8,0 ml de água destilada deionizada e resfriada a 4°C. O sedimento final foi resuspenso em água destilada deionizada e esterilizada, e o volume ajustado para 1,5 ml para análise colorimétrica.

### 3.3.3.3 Análise colorimétrica da quitina

O processo colorimétrico utilizado foi descrito por Tsuji, Kinoshita e Hoshino (1969), e também utilizado por Donald e Mirocha (1977), Ride e Drisdale (1972) e Nandi (1978) em seus trabalhos. Para cada amostra foram adicionados 1,5 ml de  $\text{KHSO}_4$  (5% p/v) e 1,5 ml de  $\text{NaNO}_2$  (5% p/v). O precipitado foi, então, resuspenso nesta solução por um período de 15 minutos. Esta mistura foi centrifugada a 7000 rpm a  $0^\circ\text{C}$  por 10 minutos. Deste sobrenadante foram retiradas duas alíquotas de 1,5 ml e colocadas em tubos separados. Em cada tubo foi adicionado 1,5 ml de  $\text{NH}_4\text{SO}_3\text{NH}_2$  (12% p/v), agitando por 5 minutos. Posteriormente foi adicionado 1,5 ml de 3-metil-2-benzothiozalone hidrazona (MBTH) (0,5% p/v) e agitou-se novamente. Os tubos foram colocados em banho-maria a  $100^\circ\text{C}$  por 4 minutos. Após resfriamento em gelo, adicionou-se a cada tubo, 1,5 ml de  $\text{FeCl}_3$  (0,5% p/v), com no máximo dois dias de preparo. Após o descanso de 30 minutos determinou-se a absorvância das soluções, já à temperatura ambiente, em espectrofotômetro a 650 nm.

O teor de glucosamina por 0,5 g de substrato foi determinado através da curva padrão de glucosamina, representada na Figura 3.

### 3.4 Delineamento experimental

A avaliação crescimento micelial em meio de cultura foi montada seguindo o delineamento inteiramente casualizado, sendo avaliados os diâmetros das colônias dos fungos

*Arthrobotrys conoides*, *Arthrobotrys musiformis* e *Arthrobotrys* sp. nos meios YPSS e BDA ao quarto dia após a repicagem. Os tratamentos tiveram 5 repetições.

A esporulação da esporulação dos fungos em meio de cultura também seguiu o delineamento inteiramente casualizado, com o fatorial  $3 \times 2 \times 1$ , sendo 3 fungos testados, 2 meios de cultura e 1 período de avaliação ao 7 dia após a repicagem. Os tratamentos tiveram 5 repetições.

A avaliação da esporulação nos substratos de baixo custo foi baseada no delineamento inteiramente casualizado no esquema fatorial  $3 \times 5 \times 2$ , sendo 3 isolados fúngicos (*Arthrobotrys conoides*, *Arthrobotrys musiformis* e *Arthrobotrys* sp.), em cinco substratos, isto é, casca de arroz, quirera de arroz, farelo de arroz, palha de feijão e esterco bovino, avaliados ao décimo e vigésimo dia após a repicagem. Os tratamentos foram constituídos de 5 repetições.

O experimento responsável pela avaliação do crescimento micelial nos substratos através da produção de quitina foi montado seguindo o delineamento inteiramente casualizado, no esquema fatorial  $3 \times 5 \times 5$  sendo 3 isolados fúngicos (*Arthrobotrys conoides*, *Arthrobotrys musiformis* e *Arthrobotrys* sp.), 5 substratos para desenvolvimento fúngico, isto é, casca de arroz, farelo de arroz, quirera de arroz, palha de feijão e esterco bovino e 5 épocas para avaliação da produção de quitina através do teor de glucosamina, 2, 4, 6, 8, e 10 dias após a repicagem fúngica. Esse teor foi obtido pela interpolação na curva padrão e depois subtraído do teor original do substrato antes da repicagem. A testemunha foi constituída dos substratos sem a presença dos inóculos fúngicos. Todos os tratamentos tiveram 5 repetições.

A comparação das médias dos tratamentos foram efetuadas pelo teste de Tukey a 5%

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Avaliação do crescimento micelial e esporulação de *Arthrobotrys conoides*, *Arthrobotrys musiformis* e *Arthrobotrys* sp. em meios de cultura, e da esporulação nos substratos casca, quirera e farelo de arroz, palha de feijão e esterco bovino

O crescimento micelial dos fungos *Arthrobotrys conoides*, *Arthrobotrys musiformis* e *Arthrobotrys* sp. em meio de cultura expresso em diâmetro médio das colônias no quarto dia após a repicagem (Tabela 1), foi melhor no meio de cultura YPSS. Também foi observado diferença no crescimento micelial entre as três espécies fúngicas num mesmo meio (Tabela 1). Melhor crescimento micelial foi de *Arthrobotrys musiformis*.

TABELA 1 - Diâmetro médio (mm) das colônias dos fungos *Arthrobotrys conoides*, *Arthrobotrys musiformis* e *Arthrobotrys* sp. Quatro dias após repicagem em dois meios de cultura. UFLA, Lavras, MG, 1997.

Meio de Cultura	<i>Arthrobotry conoides</i>	<i>Arthrobotrys musiformis</i>	<i>Arthrobotrys</i> sp.
BDA	40,77	50,36	43,01
YPSS	68,22	74,83	59,22

\* Média de cinco repetições.

Dias e Ferraz (1993) comparando o crescimento de diferentes espécies deste gênero em diversos meios de cultura também obtiveram crescimento diferencial nesses dois meios sendo que YPSS proporcionou o melhor crescimento seguido do meio BDA.

Os fungos estudados também apresentaram diferenças na reprodução nesses dois meios de cultura (Tabela 2). Maior produção de conídios ocorreu sempre em meio YPSS, concordando com Dias e Ferraz (1993) que obtiveram resultados diferenciados entre as espécies e meios.

TABELA 2 - Conídios ( $\times 10^5$ ) produzidos pelos fungos *Arthrobotrys conoides*, *Arthrobotrys musiformis* e *Arthrobotrys* sp., por placa, ao sétimo dia após a repicagem em meio de cultura BDA e YPSS. UFLA, Lavras - MG, 1997.

Meio	<i>Arthrobotrys conoides</i>	<i>Arthrobotrys musiformis</i>	<i>Arthrobotrys</i> sp.
BDA	30,7	9,1	6,6
YPSS	98,5	24,7	15,3

\* Média de cinco repetições.

Nos substratos casca, farelo e quirera de arroz, palha de feijão e esterco bovino, apesar da análise visual demonstrar crescimento micelial em todos eles, a esporulação ocorreu apenas com o fungo *Arthrobotrys musiformis* nos substratos casca de arroz, palha de feijão e esterco bovino, no período de 20 dias (Tabela 3). Dias e Ferraz (1993) não obteve esporulação ou as vezes fraca esporulação em quirera de arroz e milho triturado, demonstrando assim exigências nutricionais diferenciadas dessas espécies para a reprodução. Entretanto essas espécies, nesse mesmo período de tempo, esporularam em meio de cultura (Tabela 2). Essa falta de esporulação

em diversos substratos dificulta a avaliação quantitativa por métodos diretos através da extração de esporos (Crump e Kery, 1981; Eren e Pramer, 1965; Stirling, McKenry e Mankau, 1979).

TABELA 3 - Conídios ( $\times 10^5$ ) produzidos pelos fungos *Arthrobotrys conoides*, *Arthrobotrys musiformis* e *Arthrobotrys* sp. por grama dos substratos casca, farelo e quirera de arroz, palha de feijão e esterco bovino aos 10 e 20 dias após a repicagem. UFLA, Lavras - MG, 1997.

Substratos	10 dias			20 dias		
	<i>A.conoides</i>	<i>A.musiformis</i>	<i>A.sp.</i>	<i>A.conoides</i>	<i>A.musiformis</i>	<i>A.sp.</i>
Casca de Arroz	0	1,5	0	0	3,0	0
Farelo de Arroz	0	0	0	0	0	0
Quirera de Arroz	0	0	0	0	0	0
Palha de Feijão	0	8,0	0	0	90,0	0
Esterco Bovino	0	17,0	0	0	21,0	0

\* Média de cinco repetições.

#### 4.2. Avaliação do crescimento de *Arthrobotrys conoides*, *Arthrobotrys musiformis* e *Arthrobotrys* sp. nos substratos casca, farelo e quirera de arroz, palha de feijão e esterco bovino pela análise do teor de glucosamina

Na avaliação inicial dos teores de glucosamina nos substratos casca, farelo e quirera de arroz, palha de feijão e esterco bovino observou-se que os teores originais eram diferentes, provavelmente devido a própria constituição dos substratos e a flora microbiana, insetos, e outros associados antes da esterilização. Porém estes teores não variaram significativamente durante o período incubação nos tratamentos sem a repicagem fúngica, apesar de ter ocorrido maior

variação no teor de glucosamina no esterco bovino aos 8 e 10 dias comparado com os demais períodos de incubação (Figura 4), talvez devido ao desenvolvimento de microorganismos como bactérias termófilas que resistiram ao processo de esterilização, porém em baixa população.

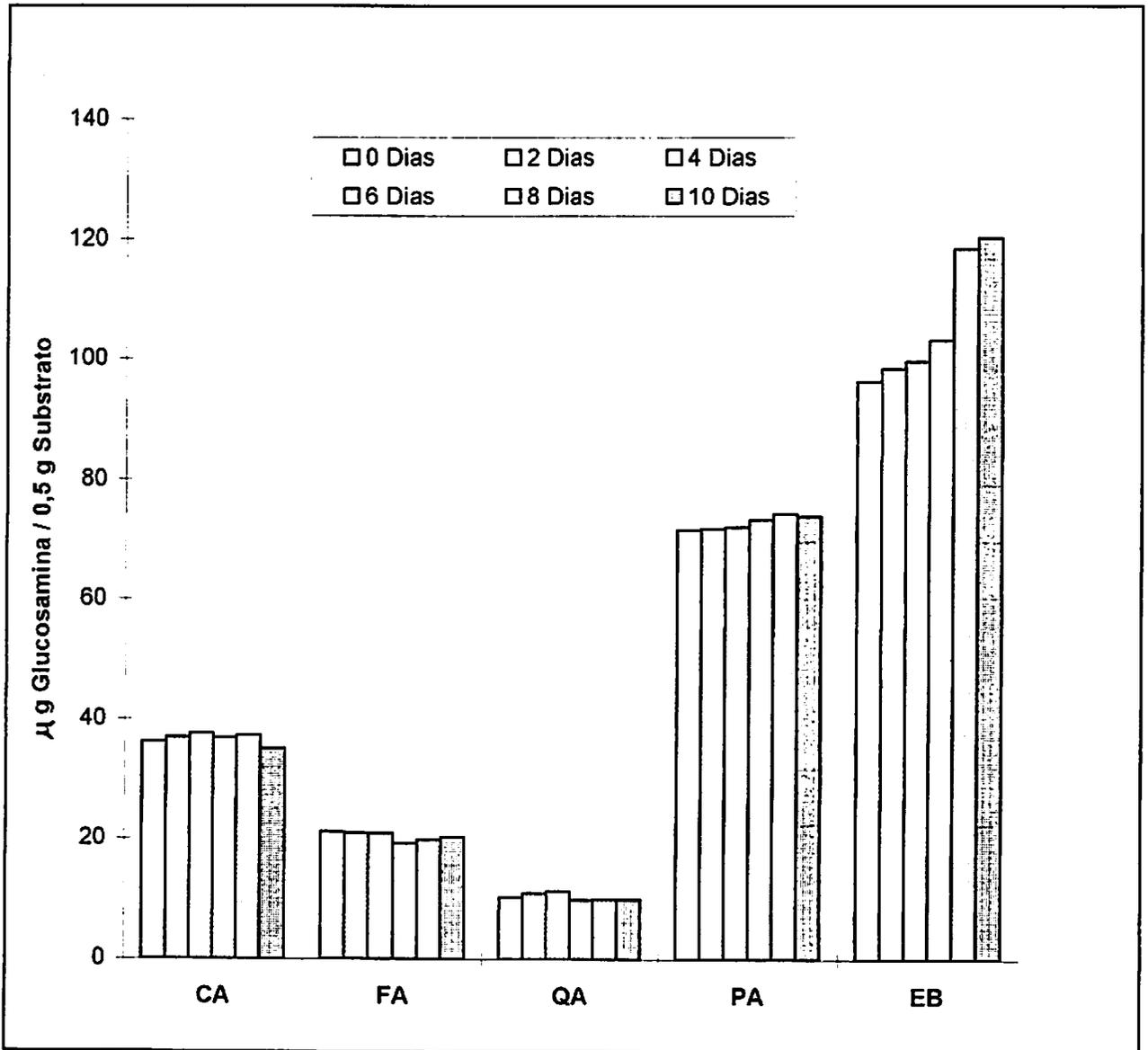


FIGURA 4: Teor de glucosamina expresso em  $\mu\text{g}/0,5$  g de substrato das testemunhas casca de arroz (CA), farelo de arroz (FA), quirera de arroz (QA), palha de feijão (PF) e esterco bovino (EB) aos 0, 2, 4, 6, 8 e 10 dias após a implantação do experimento. UFLA, Lavras - MG, 1997.

Esses resultados vêm reforçar a importância da perfeita esterilização dos substratos, além de um monitoramento dos mesmos, através de testemunhas, durante todo o processo experimental (Sharma, Fisher e Webster, 1977). O processo de esterilização por autoclavagens intercaladas a cada 2 dias, demonstrou ser bastante eficiente para os substratos casca de arroz, quirera de arroz, farelo de arroz, e palha de feijão (Figura 4).

O maior crescimento micelial do fungo *Arthrobotrys conoides*, avaliado no décimo dia de crescimento nos substratos, através da quantidade de quitina pelo teor de glucosamina ocorreu no farelo de arroz seguido da palha de feijão. Por outro lado, o menor crescimento fúngico ocorreu no substrato casca de arroz (Figura 5).

Para o fungo *Arthrobotrys musiformis* o substrato que melhor proporcionou o crescimento micelial foi a palha de feijão, seguida do farelo de arroz. Novamente o menor crescimento micelial ocorreu quando se utilizou a casca de arroz como substrato (Figura 6).

Para o fungo *Arthrobotrys* sp. os resultados foram semelhantes àqueles obtidos para o fungo *Arthrobotrys conoides*, sendo que o substrato que proporcionou o melhor crescimento micelial, foi o farelo de arroz seguido da palha de feijão, e o menor crescimento foi obtido quando se usou a casca de arroz (Figura 7).

Portanto os dois substratos considerados como melhores para o desenvolvimento micelial dos três fungos testados, foram o farelo de arroz e a palha de feijão, concordando com resultados obtidos por Machado (1994), usando escala de observação visual. Já o substrato que proporcionou menor crescimento fúngico foi a casca de arroz, e os intermediários foram a quirera de arroz e o esterco bovino.

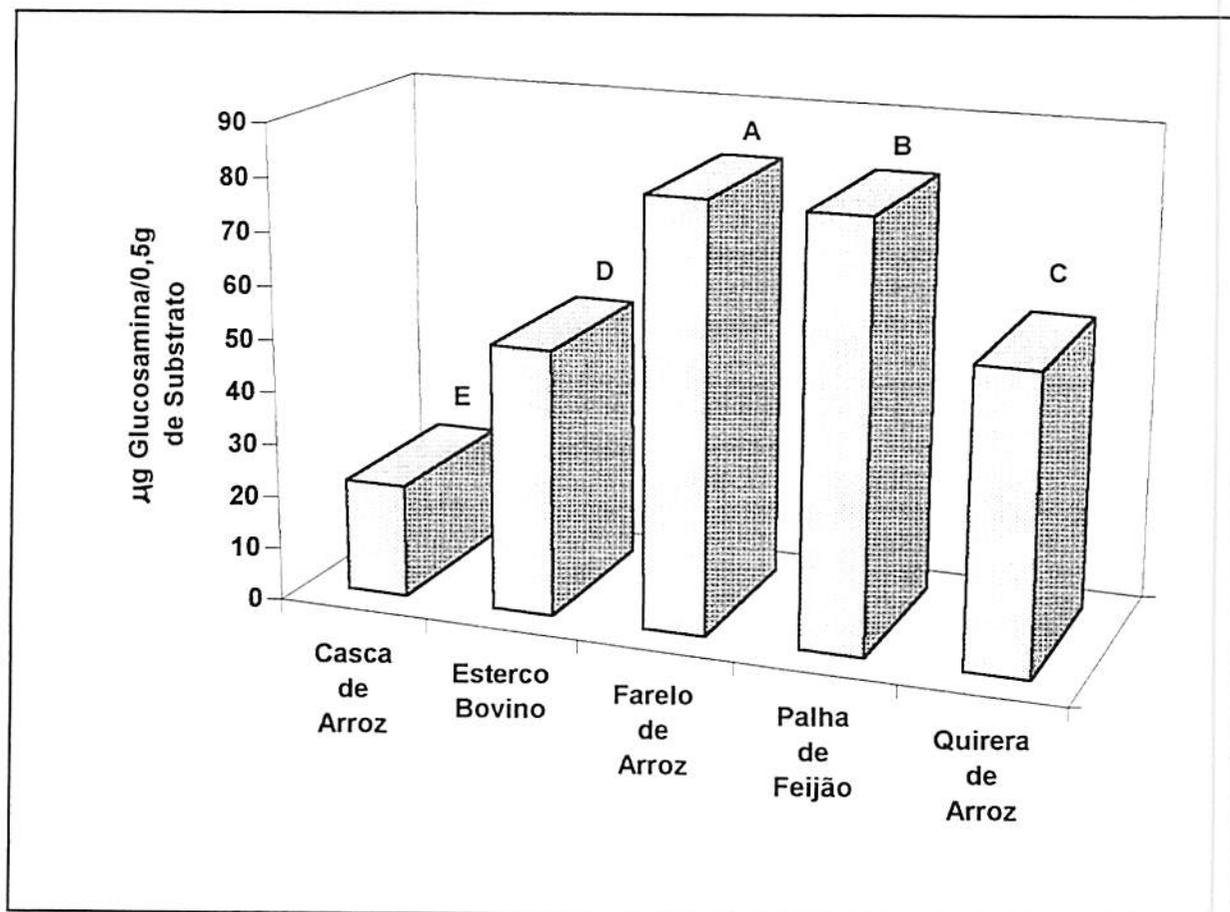


FIGURA 5: Teor de glucosamina expresso em  $\mu\text{g}/0,5\text{g}$  de substrato produzida pelo fungo *Arthrobotrys conoides* ao décimo dia após a repicagem nos substratos casca de arroz, esterco bovino, farelo de arroz, palha de feijão e quirera de arroz. UFLA, Lavras - MG, 1997. Letras distintas referem-se a diferenças estatísticas pelo teste de Tukey a 5%.

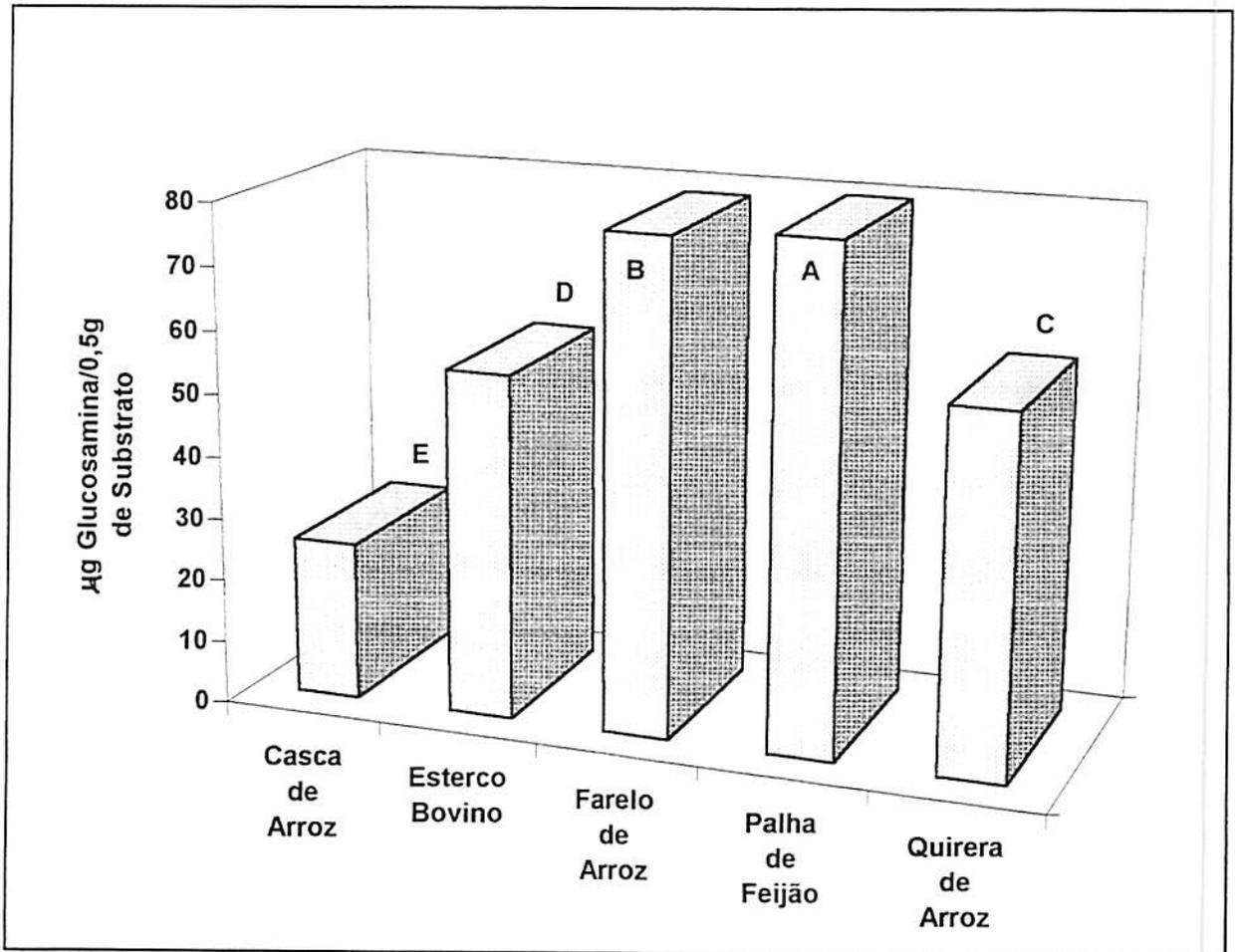


FIGURA 6: Teor de glucosamina expresso em  $\mu\text{g}/0,5\text{g}$  de substrato produzida pelo fungo *Arthrobotrys musiformis* ao décimo dia após a repicagem nos substratos casca de arroz, esterco bovino, farelo de arroz, palha de feijão e quirera de arroz. UFLA, Lavras - MG, 1997. Letras distintas referem-se a diferenças estatísticas pelo teste de Tukey a 5%.

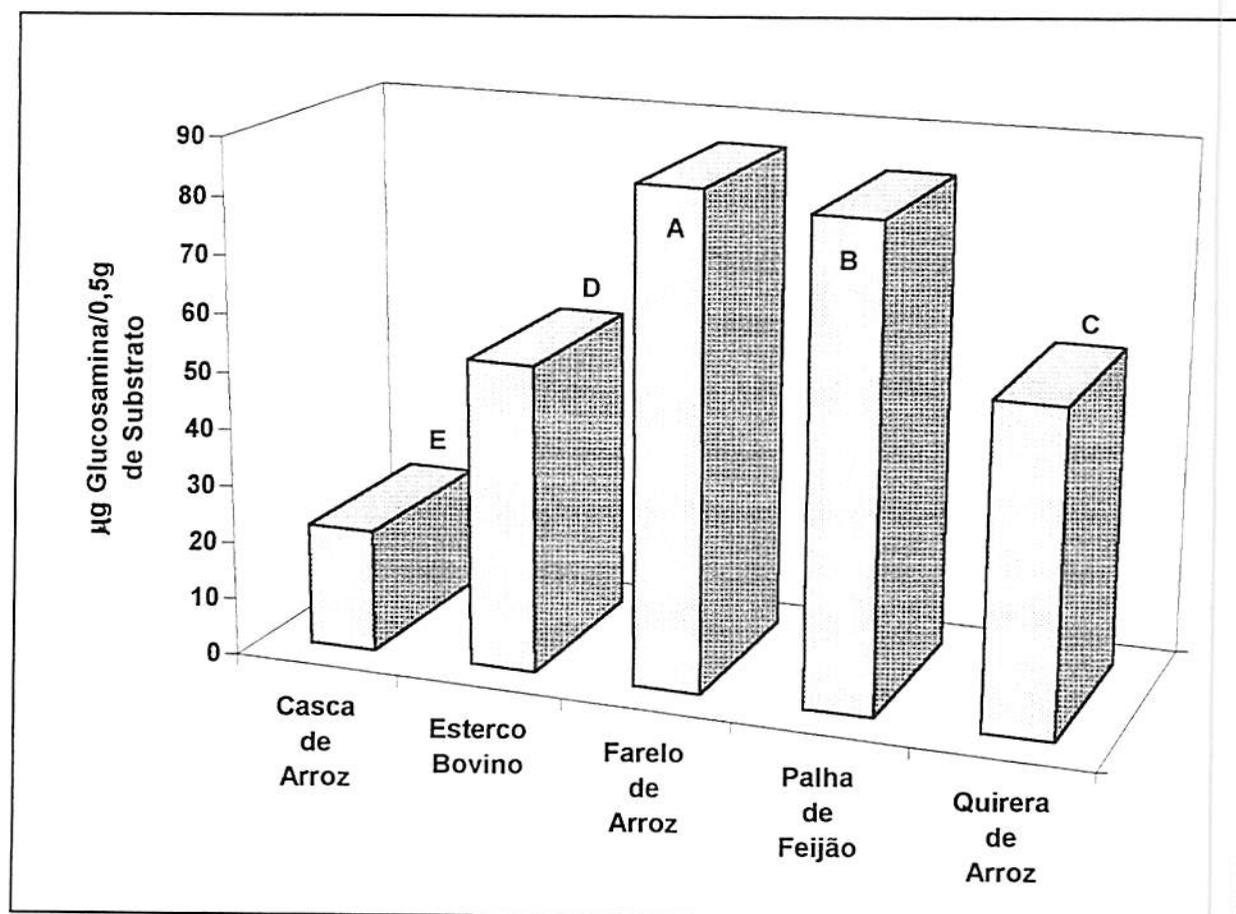


FIGURA 7: Teor de glucosamina expresso em  $\mu\text{g}/0,5\text{g}$  de substrato produzida pelo fungo *Arthrotrrys* sp. ao décimo dia após a repicagem nos substratos casca de arroz, esterco bovino, farelo de arroz, palha de feijão e quirera de arroz. UFLA, Lavras - MG, 1997. Letras distintas referem-se a diferenças estatísticas pelo teste de Tukey a 5%.

A quirera de arroz considerada como ótimo substrato para o crescimento micelial de *Arthrobotrys* spp. por Dias e Ferraz (1993), através de avaliação visual, não se comportou como tal quando esse crescimento foi avaliado pelo teor de glucosamina (Figuras 5, 6 e 7) e nem pela contagem de esporos (Tabela 3).

Já a casca de arroz demonstrou-se como substrato pouco promissor para a produção massal de fungos antagonistas, possivelmente as propriedades químicas da casca de arroz, como a presença de alto teor de lignina, podem ser a causa do baixo crescimento micelial observado nesse substrato, já que dificultaria a degradação destes componentes pelos fungos. Dias e Ferraz (1993) não obtiveram bom crescimento micelial de diversas espécies do fungo *Arthrobotrys* spp. em casca de café.

A variação do teor de glucosamina nos diversos substratos a 10 dias após a repicagem com os fungos antagonistas (Figuras 5, 6 e 7), apesar de indicar a quantidade de massa micelial nesse período, pode não expressar o potencial nutricional de cada substrato para estes fungos. Pois de acordo com a variação da composição química de cada um deles, será exigido dos fungos a ativação de diferentes sistemas enzimáticos em tempos distintos. Desta forma, a análise do comportamento do crescimento populacional nesse período, poder indicar a necessidade de se prolongar o período de incubação para melhor utilização do substrato.

Para *Arthrobotrys conoides*, *Arthrobotrys musiformis* e *Arthrobotrys* sp., cultivados em farelo de arroz e palha de feijão, o teor de glucosamina foi exponencial a partir do segundo dia até o oitavo, apresentando a partir de então saturação no crescimento, demonstrando que as condições necessárias para o crescimento no substrato, já não se encontram propícias passando a limitar o crescimento (Figuras 8 e 9).

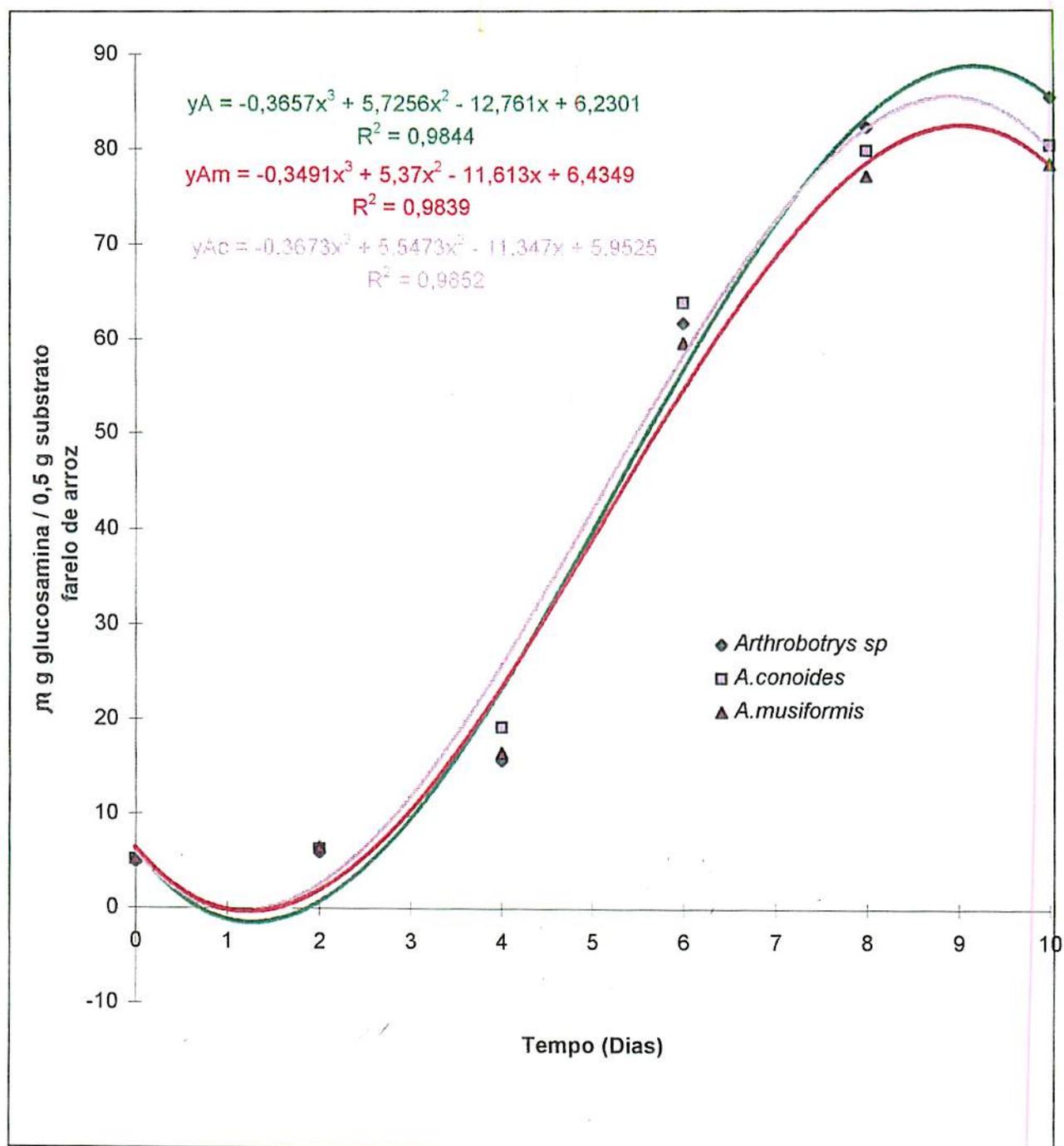


FIGURA 8: Quantidade de glucosamina, expressa em  $\mu\text{g}/0,5\text{g}$  de farelo de arroz após repicagem com os fungos *Arthrobotrys conoides*, *Arthrobotrys musiformis* e *Arthrobotrys sp.* e incubação por até 10 dias. UFLA, Lavras - MG, 1997.

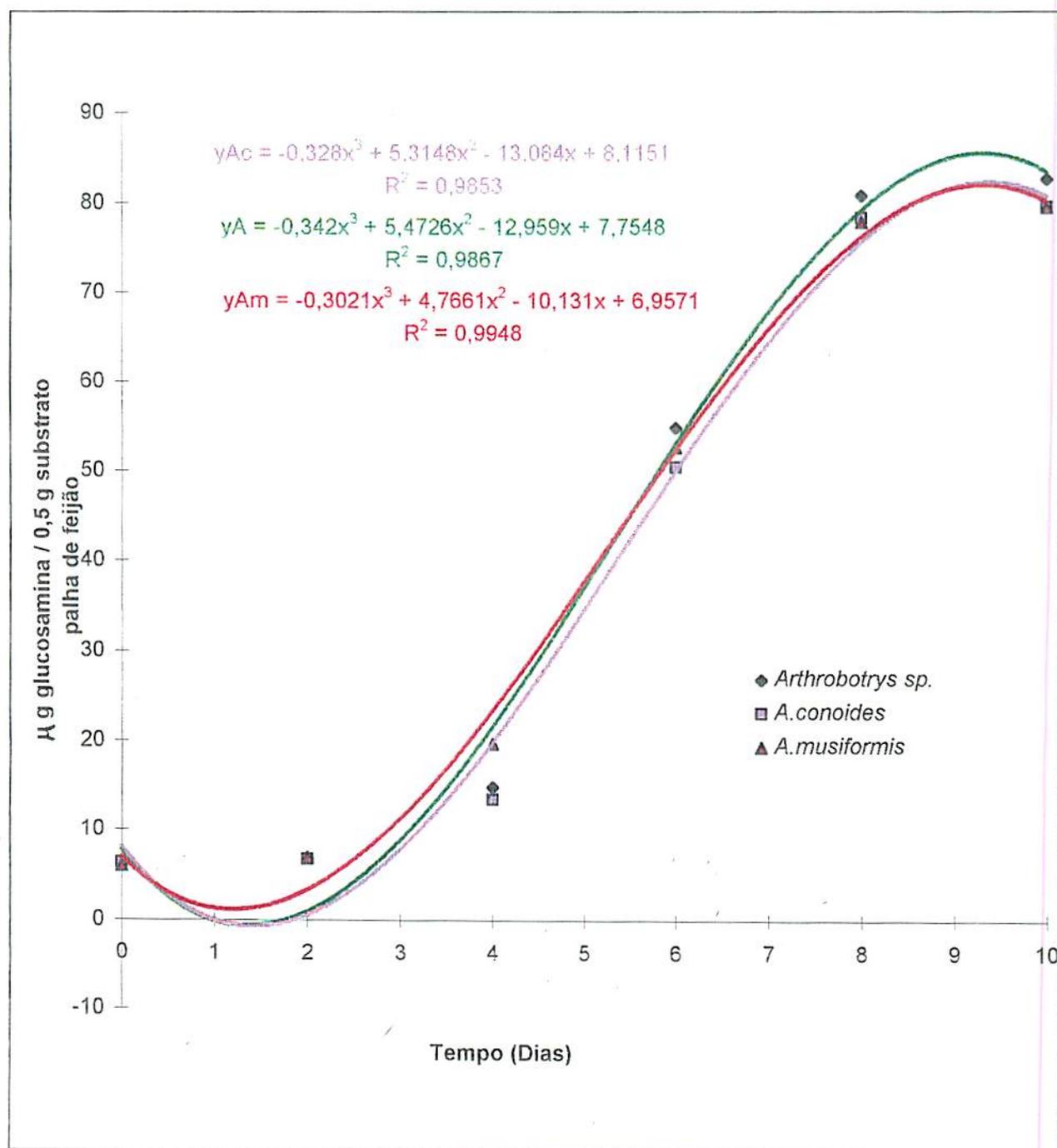


FIGURA 9: Quantidade de glucosamina expressa em  $\mu\text{g}/0,5\text{g}$  de palha de feijão após repicagem com os fungos *Arthrobotrys conoides*, *Arthrobotrys musiformis* e *Arthrobotrys sp.* e incubação por até 10 dias. UFLA, Lavras - MG, 1997.

Já no esterco bovino esses fungos continuaram na fase exponencial até o décimo dia demonstrando que o substrato ainda não limitou o crescimento fúngico (Figura 10). Por outro lado observou-se que a massa fúngica analisada pelo teor de glucosamina foi sempre mais baixa neste substrato (Figura 5, 6 e 7). Desta forma, esses fungos quando repicados nesse substrato, provavelmente requerem maior período de tempo para a adaptação do seu acervo enzimático ao substrato.

No substrato quireira de arroz os três fungos apresentaram comportamentos diferentes no seu crescimento (Figura 11). *Arthrobotrys conoides* obteve crescimento exponencial até o décimo dia, enquanto *Arthrobotrys musiformis* e *Arthrobotrys* sp. tiveram o ponto de inflexão com oito dias, iniciando a partir daí a diminuição do crescimento. (Figura 11).

No substrato casca de arroz, os três fungos, tiveram comportamentos semelhantes, apresentando o ponto de inflexão no oitavo dia, iniciando a seguir a diminuição do crescimento (Figura 12).

Em todos os recipientes contendo os diferentes substratos repicados com os fungos antagonistas observou-se aumento do teor de glucosamina com o aumento do tempo de incubação (Figuras 8, 9, 10, 11 e 12) demonstrando que a análise feita estima a massa fúngica. Tal resultado demonstra existir relação entre a quantidade de quitina e a massa fúngica existente nos substratos estudados, concordando com Bishop et al. (1982); Wu e Stahmann (1975); Plassard, Mousain e Salsac (1982).

Diversos autores como Cousin, Zeidler e Nelson (1984); Whipps et al. (1980); Whipps e Lewis (1980), concluíram também que a quantidade de quitina na parede fúngica aumenta com a idade do fungo. Além disto alguns autores perceberam que este aumento não ocorre de forma

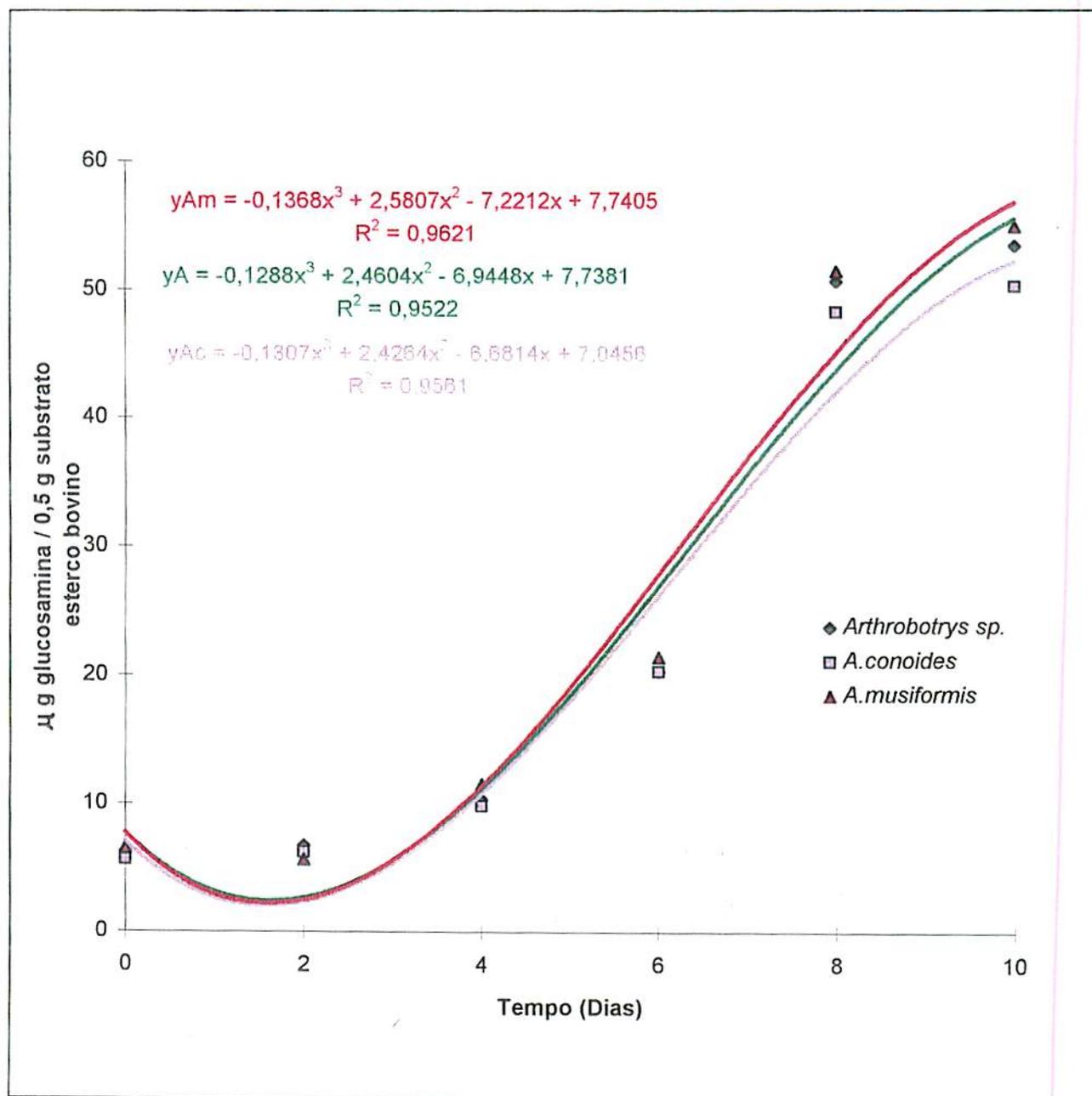


FIGURA 10: Quantidade de glucosamina expressa em  $\mu\text{g}/0,5\text{g}$  de esterco bovino após repicagem com os fungos *Arthrobotrys conoides*, *Arthrobotrys musiformis* e *Arthrobotrys sp.* e incubação por até 10 dias. UFLA, Lavras - MG, 1997.

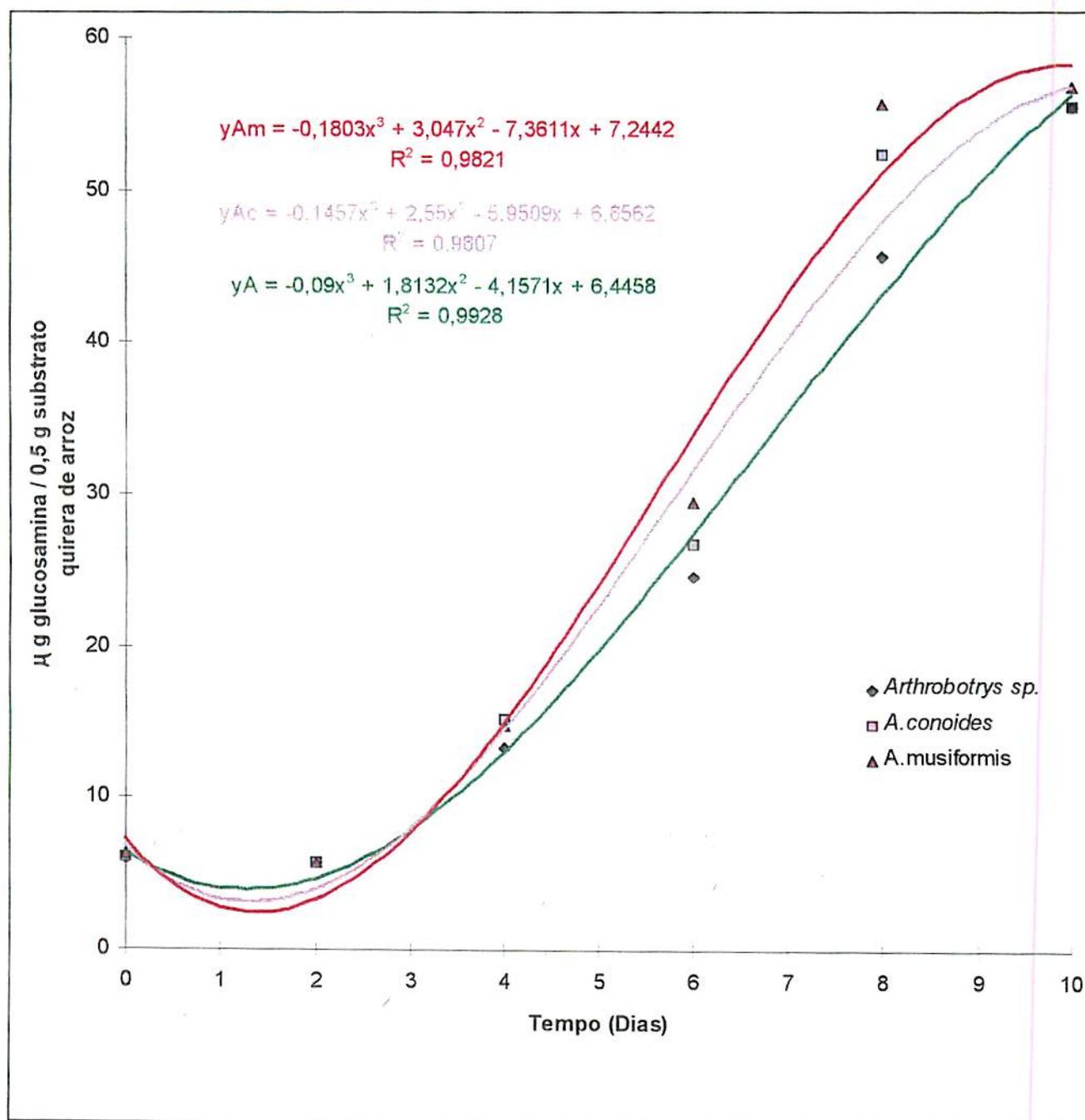


FIGURA 11: Quantidade de glucosamina expressa em  $\mu\text{g}/0,5\text{g}$  de quirera de arroz após repicagem com os fungos *Arthrobotrys conoides*, *Arthrobotrys musiformis* e *Arthrobotrys sp.* e incubação por até 10 dias. UFLA, Lavras - MG, 1997.

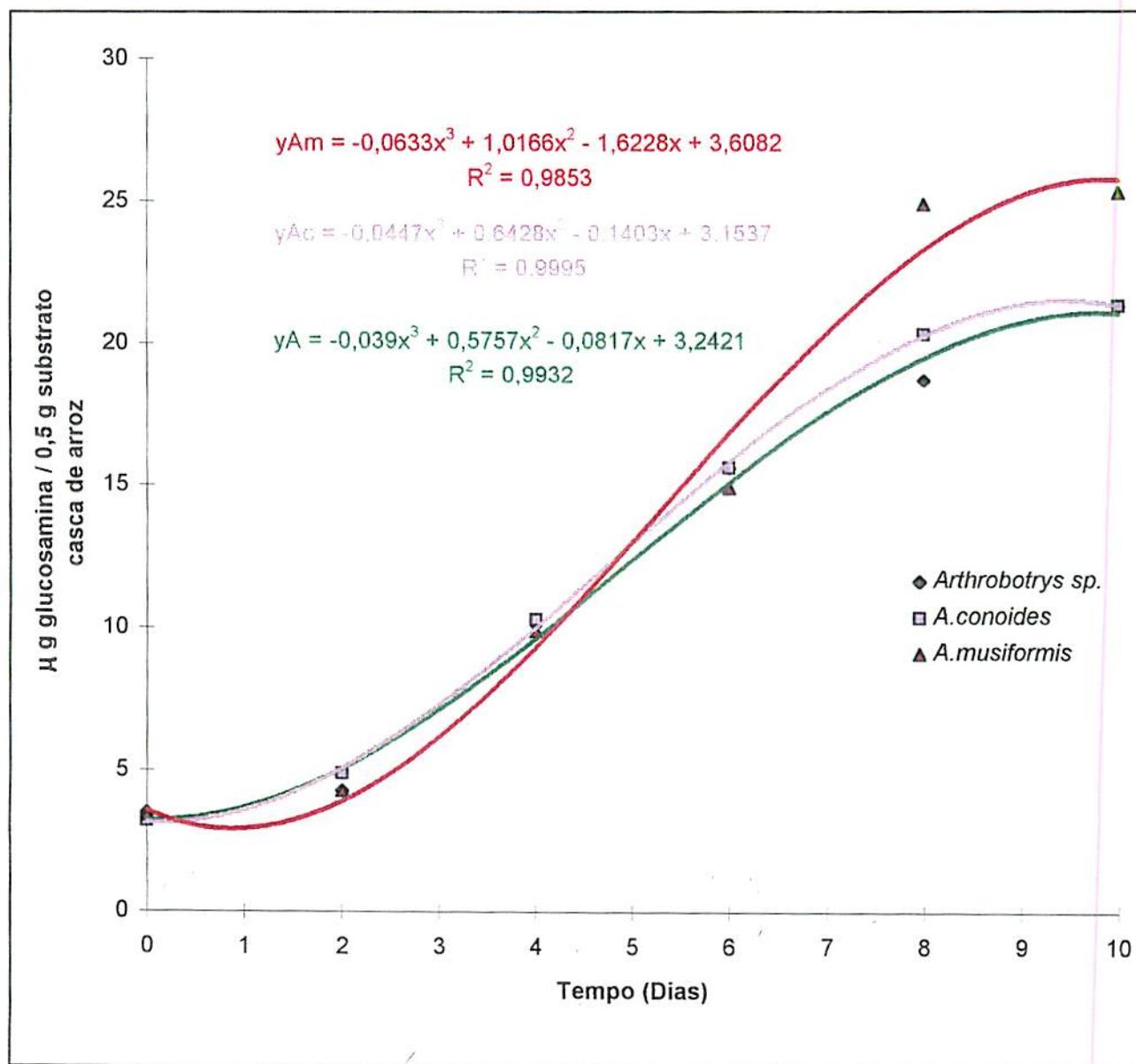


FIGURA 12: Quantidade de glucosamina, expressa em  $\mu\text{g}/0,5\text{g}$  de casca de arroz após repicagem com os fungos *Arthrobotrys conoides*, *Arthrobotrys musiformis* e *Arthrobotrys sp.* e incubação por até 10 dias. UFLA, Lavras - MG, 1997.

linear, ou seja, podem ocorrer variações da taxa de produção de quitina no fungo dentro de um espaço de tempo constante (Jarvis, 1977; Sharma, Fisher e Webster, 1977; Cousin, Zeidler e Nelson, 1984). Neste trabalho pode-se perceber que ocorreu variação de produção de glucosamina no intervalo de dois dias de incubação, sendo que a maior variação ocorreu entre os dias quatro e oito. Isto pode ser notado para todos os fungos em todos os substratos.

É importante se destacar que para todos os três fungos testados em todos os substratos, a variação de glucosamina no tempo, foi semelhante a curva exponencial de crescimento (Figuras 8, 9, 10, 11 e 12). Weng e Hotchkiss (1991), também obtiveram esta mesma característica de curva de crescimento, além de obterem uma relação entre a quitina produzida e o oxigênio e gás carbônico, consumido e produzido, respectivamente, quando estudando o crescimento do fungo *Rhizopus stolonifer* em meio de cultura BDA.

## **5 CONCLUSÕES**

1. O melhor crescimento micelial dos fungos testados, avaliado pelo teor de quitina ocorreu nos substratos farelo de arroz e palha de feijão.
2. O menor crescimento ocorreu no substrato casca de arroz.
3. O teor de quitina, proporcionou o monitoramento do crescimento fúngico.
4. Não existe relação entre a produção de conídios e a produção de micélios, sob o ponto de vista de quantificação de fungos nematófagos.
5. As curvas de crescimento fúngico nos substratos estudados tiveram comportamento diferenciado.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDER, M. Most probable number method for microbial populations. **Methods of Soil Analysis, Part.2**, 1982. p.815-820.
- ARONSON, J.M. The fungal cell wall. In: AINSWORTH, G.C.; SUSSMANP, A.S. (eds.). **The fungi: an advanced treatment**. New York: Academic Press, 1965. v.1. p.49-76.
- BARRON, G.L. Isolation and maintenance of endoparasitic nematophagous hyphomycetes. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.47, n.12, p.1899-1902, Dec. 1969.
- BARRON, G.L. **The nematode destroying fungi**. Ontario: Canadian Biological, 1977. 140p.
- BECKER, W.N.; GERDEMANN, J.W. Colorimetric quantification of vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in onion. **The New Phytologist**, London, v.78, n.2, p.289-295, Feb. 1977.
- BETHLENFALVAY, G.J.; PACOVSKY, R.S.; BROWN, M.S. Measurement of mycorrhizal infection in soybeans. **Soil Science Society of American Journal**, Atlanta, v.45, n.5, p.871-875, Sept./Oct. 1981.
- BISHOP, R.H.; DUNCAN, C.L.; EVANCHO, G.M., YOUNG, H. Estimation of fungal contamination in tomato products by a chemical assay for chitin. **Journal of Food Science**, Chicago, v.47, n.2, p.437-439, Mar./Apr. 1982.
- BLUMENTHAL, H. J.; ROSEMAN, S. Quantitative estimation of chitin in fungi. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.74, n.2, p.222-224, Aug. 1957.
- BURNETT, J.H. **Fundamentals of mycology**. 2.ed. London: Edward Arnold, 1976. 673p.

- BULAWA, C.E. Genetics and molecular biology of chitin synthesis in fungi. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v.47, p.505-534, 1993.
- CABANILLAS, E.; BARKER, K.R. Impact of *Paecilomyces lilacinus* inoculum level and application time on control of *Meloidogyne incognita* on tomato. **Journal of Nematology**, West Lafayette, v.21, n.1, p.115-120, Jan. 1989.
- CAMPOS, H.D. Controle de *Meloidogyne incognita* raça 2 em feijoeiro e *Meloidogyne exigua* em cafeeiro com fungos predadores e parasitas de ovos de fitonematóides. Lavras: ESAL, 1994. 67p. (Tese - Mestrado em Fitopatologia).
- COUSIN, M. A.; ZIEDLER, C.S.; NELSON, P. E. Chemical detection of mold in processed foods. **Journal of Food Science**, Chicago, v.49, n.2, p.439-445, Mar./Apr. 1984.
- COCHRANE, V.W. **Physiology of fungi**. New York: John Wiley, 1958. 465p..
- CRUMP, D.H.; KERRY, B.R. A quantitative method for extracting resting spores of two nematode parasitic fungi, *Nematophthora gynophila* and *Verticillium chlamydosporium*, from soil. **Nematologica**, Leiden, v.27, p.330-339, July 1981.
- DACKMAN, C.; OLSSON, S.; JANSSON, H.; LUNDGREN, B.; NORBRING-HERTZ, B. Quantification of predatory and endoparasitic nematophagous fungi in soil. **Microbial Ecology**, New York, v.13, p.89-93, Apr. 1987.
- DEACON, J.W. **Introduction to modern mycology**. 2.ed. Oxford: Blackwell Scientific, 1983. 239p.
- DE LEIJ, F.A.A.M.; KERRY, B.R. The nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium* as a potencial biological control agent for *Meloidogyne arenaria*. **Revue de Nématologie**, Paris, v.14, n.1, p.151-156, jan 1991.
- DIAS, W.; FERRAZ, S. Crescimento e esporulação de *Arthrobotrys* ssp. em diferentes substratos, meios de cultura, pH e níveis de temperatura. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v.17, n.2, p.168-181, jul. 1993.
- DIAS, W.; FERRAZ, S. Avaliação de espécies de *Arthrobotrys* para o controle de *Meloidogyne incognita*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.19, n.2, p.189-192, jun. 1994.
- DONALD, W. W.; MIROCHA, C. J. Chitin as a measure of fungal growth in stored corn and soybean seed. **Cereal Chemistry**, St. Paul, v.54, n.3, p.466-474, May/June 1977.

- EREN, J.; PRAMER, D. The most probable number of nematode-trapping fungi in soil. **Soil Science**, Baltimore, v.99, n.4, p.285, Apr. 1965.
- FREY-WYSSLING, A.; MÜTHLEHALER, K. Der submikroskopische feinebau, von chitinzellwänden. **Vierteljahresschr. Naturforsch. Ges. Zurich**, v.95, n. , p.45-52, 1950.
- GARRAWAY, M.O.; EVANS, R.C. **Fungal nutrition and physiology**. New York: J. Wiley, 1984. 401p.
- GASPARD, J.T.; JAFFEE, B.A.; FERRIS, H. Association of *verticillium chlamydosporim* with *Paecilomyces lilacinus* with root-knot nematode infested soil. **Journal of Nematology**, West Lafayette, v.22, n.2, p.207-213, Apr. 1990.
- GOODAY, G.W. Biosynthesis of the fungal wall - mechanisms and implications. **Journal of General Microbiology**, Cambridge, v.99, n.1, p.1-11, Mar. 1977.
- GOLUBCHUK, M.; CUENDET, L.S.; GEDDES, W.F. Grain storage studies: Chitin content of wheat as an index of mold contamination and wheat determination. **Cereal Chemistry**, St. Paul, v.37, n.3, p.405-411, May 1960.
- GOTO, M. **Fundamentals of bacterial plant pathology**. London: Academic Press. 1992. 342p.
- GROVE, S.N.; BRACKER, C.E. Protoplasmic organization of hyphal tips among fungi: vesicles and spitzenkörper. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.104, n.2, p.989-1009, Nov. 1970.
- HEPPER, C.M. A colorimetric method for estimating vesicular-arbuscular micorrhizal infection in roots. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.9, n. 1, p.15-18, Sept. 1977.
- HUNSLEY, D.; BURNETT, J.H. The ultrastructural architecture of the walls of some hyphal fungi. **Journal of General Mycobiology**, Cambridge, v.62, n.2, p.203-218, Mar. 1970.
- JARVIS, B. A chemical method for the estimation of mould in tomato products. **Journal of Food Technology**, Oxford, v.12, n.6, p.581-591, Dec. 1977.
- JATALA, P. Biological control of plant-parasitic nematodes. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.24, p.453-48, 1986.

- KRUGNER, T.L.; BACCHI, L.M.A. Fungos. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. (eds.). **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v.1, 919p.
- LEHNINGER, A.L. **Princípios de bioquímica**. Tradução por W.R. Lodi e A. A. Simões. São Paulo: Sarvier, 1984. 725p. Tradução de Principles of Biochemistry.
- LIN, H.H.; COUSIN, M.A. Detection of mold in processed foods by high performance liquid chromatography. **Journal of Food Protection**, Ames, v.48, n.8, p.671-678, Aug. 1985.
- MACHADO, V. de O.F. **Avaliação de substratos para produção massal de fungos antagonistas a *Meloidogyne javanica***. Lavras: ESAL, 1994. 80p. (Tese - Mestrado em Fitopatologia).
- MANKAU, R. Biological control of nematode pests by natural enemies. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.18, p.415-440, 1980.
- MAYAMA, S.; REHFELD, W.D.; DALY, J.M. A comparison of the development of *Puccinia graminis tritici* in resistant and susceptible wheat based on glucosamine content. **Physiological Plant Pathology**, London, v.7, n.5, p.243-257, 1975.
- MITCHELL, D.J.; KANNWISCHER-MITCHELL, M.E.; DICKSON, D.W. A semi-selective medium for the isolation of *Paecilomyces lilacinus* from soil. **Journal of Nematology**, West Lafayette, v.19, n.2, p.255-256, Apr. 1987.
- MOORE-LANDECKER, E. **Fundamentals of the fungi**. 4.ed. London: Prentice-Hall International. 1996. 347p.
- NANDI, B. Glucosamine analysis of fungus-infected wheat as a method to determine the effect of antifungal compounds in grain preservation. **Cereal Chemistry**, St. Paul, v.55, n.2, p.121-126, Mar./Apr. 1978.
- NAVES, R. de L.; CAMPOS, V.P. Ocorrência de fungos predadores de nematóides no sul de Minas Gerais e estudo da capacidade predatória e crescimento in vitro de alguns de seus isolados. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v.15, n.2, p.152-162, jun. 1991.
- NICOLAY, R.; SIKORA, R.A. Improved techniques for the detection of nematophagous fungi and their activity against target nemtodes. **Revue de Nématologie**, Paris, v.11, n.1, p.115-116, jan. 1988.

- PETTIPHER, G.L.; WILLIAMS, R.A.; GUTTERIDGE, C.S. An evaluation of possible alternative methods to the Howard Mould Count. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.1, n.3, p.49-51, Marc. 1985.
- PLASSARD, C.S.; MOUSAIN, D.G.; SALSAC, L.E. Estimation of mycelial growth of basidiomycetes by means of chitin determination. **Phytochemistry**, Elmsford, v.21, n.2, p.345-348, Feb. 1982.
- PUSZTAI, A. Hexosamines in the seeds of higher plants (Spermatophytes). **Nature**, London, v. 201, n.4926, p.1328-1329, Mar. 1964.
- RIDE, J. P.; DRYSDALE, R. B. A chemical method for estimating *Fusarium oxysporum* f. *Lycopersici* in infected tomato plants. **Physiological Plant Pathology**, London, v.1, n.4, p.409-420, Apr. 1971.
- RIDE, J. P.; DRYSDALE, R. B. A rapid method for the chemical estimation of filamentous fungi in plant tissue. **Physiological Plant Pathology**, London, v.2, n. 1, p.7-15, Jan. 1972.
- ROBERTS, C.A.; MARQUARDT, R.R.; FROHLICH, A.A.; MCGRAW, R.L.; ROTTER, R.G.; HENNING, J.C. Chemical and spectral quantification of mold in contaminated barley. **Cereal Chemistry**, St. Paul, v.68, n.3, p.272-275, May/June 1991.
- ROBERTS, C.A.; MOORE, J.; GRAFFIS, D.W.; KIRBY, H.W.; WALGENBACH, R.P. Quantification of mold in hay by near infrared reflectance spectroscopy. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.70, n.12, p.2560-2564, Dec. 1987a.
- ROBERTS, C.A.; MOORE, K.J.; GRAFFIS, D.W.; KIRBY, H.W.; WALGENBACH, R.P. Chitin as an estimate of mold in hay. **Crop Science**, Madison, v.27, n. 4, p.783-785, July/Aug. 1987b.
- ROMEIRO, R.S. **Bactérias fitopatogênicas**. Viçosa-MG: UFV, 1995. 283p.
- ROTTER, R.G.; FROHLICH, A.A.; MARQUARDT, R.R.; MILLS P.A. Estimation of fungal contamination of cereal grains as determined by measuring glucosamine concentration. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v.69, n.1, p.235-245, Mar. 1989.
- SHARMA, P.D.; FISHER, P.J.; WEBSTER, J. Critique of the chitin assay for estimation of fungal biomass. **Transactions of the British Mycology Society**, Cambridge, v.69, n.3, p.479-483, 1977.

- STEER, M.W.; STEER, J.M. Pollen tube tip growth. **The New Phytologist**, London, v.111, n.3, p.323-35, Mar. 1989.
- STIRLING, G.R. **Biological control of plant parasitic nematodes: progress, problems and prospects**. Wallingford: CAB International, 1991. 281p.
- STIRLING, G.R.; MCKENRY, M.V.; MANKAU, R. Biological control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) on peach. **Phytopathology**, Lancaster, v.69, n.8, p.806-809, Aug. 1979.
- TARJAN, A.C. Predacious activity and growth of nematophagous fungi on various organic substances. **Phytopathology**, Lancaster, v.50, n.8, p.577, Aug. 1960.
- TSUJI, A.; KINOSHITA, T.; HOSHINO, M. Determination of hexosamines using 3-methyl-2-benzothiazolone hydrazone hydrochloride. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, Oxford, v.17, n.5, p.1505-1510, Sept. 1969.
- TRACEY, M.V. Chitin. In: PEACH, K.; TRACEY, M.V. (eds.). **Modern methods of plant analysis**. Berlin: Springer, 1955. v.2, p.264-274.
- TOPPAN, A.; ESQUERRÉ-TUGAYÉ, M.T.; TOUZÉ, A. An improved approach for the accurate determination of fungal pathogens in diseased plants. **Physiological Plant Pathology**, London, v.9, n.3, p.241-251, Mar. 1976.
- WENG, Y.; HOTCHKISS, J.H. Headspace gas composition and chitin content as measures of *Rhizopus stolonifer* growth. **Journal of Food Science**, Chicago, v.56, n.1, p.274-275, Jan./Feb. 1991.
- WESSELS, J.G.H. Cell wall synthesis in apical hyphal growth. **International Review of Cytology**, San Diego: Academic Press, 1986. v.104, p.37-79.
- WESSELS, J.G.H. Wall growth, protein excretion and morphogenesis in fungi. **The New Phytologist**, London, v.123, n.3, p.397-413, Mar. 1993.
- WHIPPS, J.M.; CLIFFORD, B.C.; RÖDERICK, H.W.; LEWIS D.H. A comparison of development of *Puccinia hordei* Otth. on normal and slow rusting varieties of barley (*Hordeum vulgare* L.) using analyses of fungal chitin and mannan. **The New Phytologist**, London, v.85, n.2, p.191-199, June 1980.
- WHIPPS, J.M.; LEWIS, D.H. Methodology of a chitin assay. **Transaction of the British Mycology Society**, Cambridge, v.74, n.2, p.416-418, Apr. 1980.

WU, L.; STAHMANN, M.A. Chromatographic estimation of fungal mass in plants material. **Phytopathology**, Lancaster, v.65, n.6, p.1032-1034, Dec. 1975.

ZELTINS, A.; SCHREMPF, H. Visualization of  $\alpha$ -chitin with a specific chitin-binding protein (CHB1) from *Streptomyces olivaceoviridis*. **Analytical Biochemistry**, New York, v.231, n.2, p.287-294, Feb. 1995.

**ANEXOS**

TABELA 1A - Quantidade média de glucosamina expressa em  $\mu\text{g}/0,5\text{g}$  de substratos repicados com *Arthrobotrys conoides*, *Arthrobotrys musiformis* e *Arthrobotrys* sp. cultivados por até 10 dias.

*A. conoides*

Tempo / dias	0	2	4	6	8	10
Casca de Arroz	3,2 D	4,9 C	10,3 D	15,6 E	20,3 E	21,3 E
Farelo de Arroz	5,1 C	6,3 AB	19,2 A	54,9 A	79,8 A	80,3 A
Quirera de Arroz	5,6 B	5,9 B	15,2 B	26,7 C	52,3 C	55,4 C
Palha de Feijão	6,3 A	6,7 A	13,5 C	50,5 B	78,4 B	79,6 B
Esterco Bovino	5,6 B	6,2 B	9,8 E	20,3 D	48,2 D	50,2 D

*A. musiformis*

Tempo / dias	0	2	4	6	8	10
Casca de Arroz	3,2 D	4,9 C	10,3 D	15,6 E	20,3 E	21,3 E
Farelo de Arroz	5,1 C	6,3 AB	19,2 A	54,9 A	79,8 A	80,3 A
Quirera de Arroz	5,6 B	5,9 B	15,2 B	26,7 C	52,3 C	55,4 C
Palha de Feijão	6,3 A	6,7 A	13,5 C	50,5 B	78,4 B	79,6 B
Esterco Bovino	5,6 B	6,2 B	9,8 E	20,3 D	48,2 D	50,2 D

*Arthrobotrys* sp.

Tempo/ dias	0	2	4	6	8	10
Casca de Arroz	3,5 D	4,3 D	10,1 D	15,6 E	18,7 E	21,3 E
Farelo de Arroz	4,9 C	5,9 B	15,7 A	52,7 B	82,3 A	85,4 A
Quirera de Arroz	5,5 B	5,9 B	13,4 C	24,6 C	45,7 D	55,4 C
Palha de Feijão	6,1 A	6,8 A	14,9 B	54,9 A	80,8 B	82,7 B
Esterco Bovino	6,2 A	6,7 A	10,3 D	20,3 D	50,6 C	53,4 D

Médias nas colunas seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

TABELA 2A - Quantidade média de glucosamina por 0,5 g de casca de arroz, farelo de arroz, quirera de arroz, palha de feijão e esterco bovino, repicados com os fungos *Arthrobotrys conoides*, *Arthrobotrys musiformis* e *Arthrobotrys* sp. e incubados por até 10 dias. UFLA, Lavras, MG, 1997.

Casca de Arroz						
Tempo / dias	0	2	4	6	8	10
<i>A.conoides</i>	3,2 A	4,9 A	10,3 A	15,6 A	20,3 B	21,3 B
<i>A.musiformis</i>	3,4 A	4,3 A	9,9 A	14,9 B	24,9 A	25,3 A
<i>A.sp.</i>	3,5 A	4,3 B	10,1 AB	15,6 A	18,7 C	21,3 B
Farelo de Arroz						
Tempo / dias	0	2	4	6	8	10
<i>A.conoides</i>	5,1 AB	6,3 A	19,2 A	54,9 A	79,8 B	80,3 B
<i>A.musiformis</i>	5,3 A	6,5 A	16,5 B	50,6 C	77,1 C	78,3 C
<i>A.sp.</i>	4,9 B	5,9 B	15,7 C	52,7 B	82,3 A	85,4 A
Quirera de Arroz						
Tempo / dias	0	2	4	6	8	10
<i>A.conoides</i>	5,6 A	5,9 A	15,2 A	26,7 B	52,3 B	55,4 B
<i>A.musiformis</i>	5,8 A	5,9 A	14,8 B	29,4 A	55,6 A	56,7 A
<i>A.sp.</i>	5,5 A	5,9 A	13,4 C	24,6 C	45,7 C	55,4 B
Palha de Feijão						
Tempo / dias	0	2	4	6	8	10
<i>A.conoides</i>	6,3 A	6,7 A	13,5 C	50,5 C	78,4 A	79,6 B
<i>A.musiformis</i>	5,9 B	6,9 A	19,7 A	52,7 B	77,9 B	79,5 B
<i>A.sp.</i>	6,1 AB	6,8 A	14,9 B	54,9 A	80,8 C	82,7 A
Esterco Bovino						
Tempo / dias	0	2	4	6	8	10
<i>A.conoides</i>	5,6 B	6,2 B	9,8 C	20,3B	48,2 A	50,2 A
<i>A.musiformis</i>	6,5 A	5,6 C	11,5 A	21,4 A	51,4 B	54,9 B
<i>A.sp.</i>	6,2 A	6,7 A	10,3 B	20,3 B	50,6 C	53,4 C

Médias na coluna seguidas por letras distintas, diferem entre si pelo teste Tukey ao nível de 5%.