

TIAGO DE HOLLANDA AYUPE

**COMPATIBILIDADE DOS FUNGOS NEMATÓFAGOS *Arthrobotrys robusta* E
Duddingtonia flagrans NO CONTROLE BIOLÓGICO DOS NEMATÓIDES
GASTRINTESTINAIS DE BEZERROS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL**

2014

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

A989c
2014 Ayupe, Tiago de Hollanda, 1979-
Compatibilidade dos fungos nematófagos *Arthrobotrys robusta* e *Duddingtonia flagrans* no controle biológico dos nematóides gastrintestinais de bezerros / Tiago de Hollanda Ayupe. – Viçosa, MG, 2014.
x, 33f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Jackson Victor de Araújo.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Fungos nematófagos. 2. Fungos nematófagos - Controle Biológico. 3. *Duddingtonia flagrans*. 4. *Arthrobotrys robusta*.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Veterinária. Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária. II. Título.

CDD 22. ed. 579.5

TIAGO DE HOLLANDA AYUPE

**COMPATIBILIDADE DOS FUNGOS NEMATÓFAGOS *Arthrobotrys robusta*
E *Duddingtonia flagrans* NO CONTROLE BIOLÓGICO DOS NEMATÓIDES
GASTRINTESTINAIS DE BEZERROS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.


APROVADA: 25 de setembro de 2014.



José Cola Zanuncio



Ita de Oliveira e Silva



Jackson Victor de Araújo
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

À Deus, por iluminar a minha vida e tornar possível mais essa vitória.

À minha esposa Bruna e à minha família pelo amor, apoio, compreensão e paciência.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realização do mestrado em Medicina Veterinária.

Ao amigo e orientador Jackson Victor de Araújo, pela oportunidade, confiança, orientação e também pelo apoio.

Ao amigo Fábio Ribeiro Braga, pela grande colaboração, ensinamentos e orientação no planejamento e execução do projeto.

Aos amigos do laboratório de Parasitologia, José Geraldo (Tuim), Ademir Alves, Wendeo Silveira, Alexandre Tavela, Anderson Dias, Juliana Milani e Lorendane Carvalho agradeço pela amizade, companheirismo e ajuda na realização dos trabalhos em laboratório e a campo.

Ao amigo professor Alcides Condé por possibilitar a realização deste trabalho e pelas boas conversas e conselhos.

Ao professor Leandro Grassi por ter aberto as portas do seu laboratório e à Thalita Avelar pela ajuda e orientação na execução do trabalho.

Aos professores, Eduardo Paulino da Costa, José Domingos Guimarães, Joaquim Patarroyo, Marlene Vilorio e Arthur Kanadani pelas conversas e conselhos.

Às secretárias da Pós-graduação em Medicina Veterinária, Rosi e Beth, pela paciência e ajuda fornecidas.

A todas as pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS E TABELAS	v
RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
INTRODUÇÃO GERAL	1
OBJETIVOS	4
Objetivo geral	4
Objetivos específicos	4
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	5

CAPÍTULO 1. COMPATIBILIDADE ENTRE OS FUNGOS NEMATÓFAGOS *Arthrobotrys robusta* e *Duddingtonia flagrans* EM CONDIÇÕES LABORATORIAIS

RESUMO	8
ABSTRACT	9
1. INTRODUÇÃO	10
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	11
2.1 Local do experimento.....	11
2.2 Ensaio	11
2.2.1 Teste de antagonismo e confrontação direta.....	11
2.2.2 Teste de antibiose	12
2.2.3 Teste de compostos voláteis	12
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	13
4. CONCLUSÃO	15
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	16

CAPÍTULO 2. ASSOCIAÇÃO DOS FUNGOS *Arthrobotrys robusta* e *Duddingtonia flagrans* NO CONTROLE DE NEMATÓIDES DE BEZERROS MESTIÇOS NO SUDESTE DO BRASIL

RESUMO	19
ABSTRACT	20
1. INTRODUÇÃO	22
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
2.1 Fungos	23
2.2 Animais.....	23
2.3 Ensaio	24

2.4 Análise dos dados	24
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
4. CONCLUSÕES	30
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Capítulo 1

Figura 1. Crescimento conjunto das colônias de *Duddingtonia flagrans* (x) e *Arthrobotrys robusta* (y). A - *D. flagrans* vs. *D. flagrans*; B - *D. flagrans* vs. *A. robusta*; C - *A. robusta* vs. *A. robusta*. 13

Tabela 1. Valores médios e desvio padrão (\pm) da área (cm²) de crescimento micelial, em tampas de placas de Petri, dos fungos *Duddingtonia flagrans* (tampa superior) vs. *Arthrobotrys robusta* (tampa inferior) e vice-versa quando comparados aos tratamentos *D. flagrans* vs. *D. flagrans* e *A. robusta* vs. *A. robusta* respectivamente 14

Capítulo 2

Figura 1. Temperatura média mensal: mínima, média e máxima (°C), umidade relativa do ar (UR%) e pluviosidade (mm³). Fevereiro a agosto de 2012 em Viçosa, Estado de Minas Gerais, sudeste do Brasil. 26

Figura 2. Médias mensais de ovos por grama de fezes (OPG) dos animais dos grupos controle e tratado com a associação dos fungos *Duddingtonia flagrans* e *Arthrobotrys robusta*. Fevereiro a agosto de 2012, em Viçosa, Estado de Minas Gerais, sudeste do Brasil. * Diferença significativa (p<0,05) entre os grupos controle e tratado..... 26

Figura 3. Médias (\pm DP) de larvas infectantes (L3) recuperadas das coproculturas dos grupos controle e tratado com os fungos nematófagos *Arthrobotrys robusta* e *Duddingtonia flagrans*. Fevereiro a agosto de 2012 em Viçosa, Estado de Minas Gerais, sudeste do Brasil. * Diferença significativa (p<0,05) entre os grupos controle e tratado..... 27

Tabela 1. Média de larvas infectantes dos gêneros *Haemonchus* spp. (Haem.), *Cooperia* spp. (Coop.) e *Oesophagostomum* spp. (Oeso.) e médias totais (\pm DP) recuperadas das coproculturas dos grupos tratado com a associação dos fungos nematófagos *Arthrobotrys robusta* e *Duddingtonia flagrans* e controle. Fevereiro a agosto de 2012 em Viçosa, Estado de Minas Gerais, sudeste do Brasil 28

Tabela 2. Média de larvas infectantes e médias gerais (\pm DP) dos gêneros *Haemonchus* spp., *Cooperia* spp. e *Oesophagostomum* spp. por quilograma (kg) de matéria seca (MS) de pastagem obtidas de 0-20 cm (A) e 20-40 cm (B) de distância dos bolos fecais, manejadas com os bezerros tratados com a associação dos fungos nematófagos *Arthrobotrys robusta* e *Duddingtonia. flagrans* (grupo tratado) e sem fungos (grupo controle). Fevereiro a agosto de 2012 em Viçosa, Estado de Minas Gerais, sudeste do Brasil

29

RESUMO

AYUPE, Tiago de Hollanda, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2014.
Compatibilidade dos fungos nematófagos *Arthrobotrys robusta* e *Duddingtonia flagrans* no controle biológico dos nematoides gastrintestinais de bezerros.
Orientador: Jackson Victor de Araújo. Coorientador: Fábio Ribeiro Braga.

Em todo o mundo, as parasitoses gastrintestinais em ruminantes causadas por nematoides, geram perdas econômicas muitas vezes não visíveis ou quantificadas na produção animal. Dessa forma, a utilização de fungos nematófagos associados, no controle biológico, pode ser uma alternativa eficaz e vantajosa para melhorar os resultados de tratamentos com fungos isoladamente e potencializar o controle dos nematoides que parasitam bovinos. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a compatibilidade entre os fungos nematófagos do grupo dos predadores *Arthrobotrys robusta* (isolado I31) e *Duddingtonia flagrans* (isolado AC001) em laboratório e a ação conjunta destes na redução ambiental de formas infectantes de nematoides parasitos gastrintestinais de bovinos jovens Holandês-Zebu. Primeiramente, a presença de compatibilidade entre os fungos *A. robusta* e *D. flagrans in vitro* foi verificada por testes de confronto direto, de antibiose e de compostos voláteis. Esses testes permitem identificar a competição por espaço entre os organismos e a produção de antibióticos e de compostos voláteis por algum desses fungos. No teste de confrontação direta, *A. robusta* colonizou aproximadamente 2/3 da placa, o que sugere competição por espaço e, portanto, antagonismo. No teste de antibiose, nenhum fungo produziu antibióticos sobre o meio de cultura, o que resultou na ausência de halo de inibição da cultura subsequentemente semeada na mesma placa. No teste de compostos voláteis, o isolado de *A. robusta* reduziu ($p < 0,05$) o crescimento de *D. flagrans*. No ensaio *in vivo*, cada animal do grupo tratado (A) recebeu 2g/10 kg de peso vivo (PV) de péletes de alginato de sódio com os isolados fúngicos AC001 (0,2 g de micélio/10 kg de PV) e I31 (0,2 g de micélio/10 kg de PV) com ração comercial duas vezes por semana durante 26 semanas, enquanto os animais do grupo controle (B) receberam somente ração comercial. Ao final do experimento, os animais do grupo A apresentaram em relação aos do grupo B os resultados: redução de 72,87% no número de ovos por grama de fezes (OPG) e de 6,07% no número de larvas recuperadas das coproculturas

respectivamente. Porém, o número total de larvas (L3) recuperadas por quilograma de matéria seca de pastagem foi semelhante ($p>0,05$) entre os grupos tratado e controle ao final do experimento.

ABSTRACT

AYUPE, Tiago de Hollanda, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, September, 2014.
The compatibility of nematophagous fungi *Arthrobotrys robusta* and *Duddingtonia flagrans* fungi in the biological control of gastrointestinal nematodes of calves.
Adviser: Jackson Victor de Araújo. Co-adviser: Fábio Ribeiro Braga.

Worldwide, gastrointestinal parasites in ruminants caused by nematodes produce economic losses often not visible or quantified for livestock production. Thus, the use of associated nematophagous fungi, as a form of biological control, can be an effective and advantageous alternative to improve the results of treatments using only fungi and to enhance the control of nematodes that parasitize cattle. The purpose of this study was to evaluate the compatibility between nematophagous fungi from the predator group *Arthrobotrys robusta* (isolate I31) and *Duddingtonia flagrans* (isolate AC001) under laboratory conditions and the joint action of these fungi in the environmental reduction of infective forms of gastrointestinal nematodes on young Holstein-Zebu cattle. Firstly, we detected the *in vitro* compatibility between *A. robusta* and *D. flagrans* through direct confrontation, antibiosis and volatile compounds testing. These tests allow the identification of the existence of competition for space between the organisms and the production of volatile compounds and antibiotics for some of these fungi. In direct comparison test, the *A. robusta* colonized approximately 2/3 of the plate, which suggests that there is competition for space between them and thus a form of antagonism. In antibiosis test, the production of antibiotics on culture medium by any fungus was not observed, which resulted in the absence of inhibition zone of fungus subsequently sown in the same plate. In the volatile compounds test, *A. robusta* reduced ($p < 0.05$) the growth of *D. flagrans*. On the *in vivo* test each animal in the treated group (A) received 2 g/ 10 kg body weight (BW) of sodium alginate pellets containing the fungal isolates AC001 (0.2 g mycelium / 10 kg of BW) and I31 (0.2 g mycelium / 10 kg of BW) with commercial ration twice a week for 26 weeks, whereas animals in the control group (B) received only commercial feed. At the end of the experiment, the animals of group A compared to group B showed the following results: 72.87% reduction in the average number of eggs per gram of feces (EPG) and 6.07% of the

average number of larvae recovered of coproculture, respectively. However, there was no difference ($p > 0.05$) of the total number of larvae (L3) recovered per kilogram of dry grassland between the treated and control groups at the end of the experiment.

INTRODUÇÃO GERAL

No Brasil, a bovinocultura é um dos principais destaques do agronegócio no cenário mundial. O país possui o segundo maior rebanho do mundo, com aproximadamente 200 milhões de cabeças e é líder nas exportações, comercializando 1.800 mil toneladas de carne em mais de 180 países. Além disso, ocupa a quinta posição mundial em produção e consumo de leite. O valor bruto da produção das cadeias produtivas de carne e leite, estimado em R\$ 67 bilhões, e a presença dessa atividade em todos os estados brasileiros, com geração de empregos e de renda, evidencia a importância econômica e social da bovinocultura no nosso país (ANUALPEC, 2014; BRASIL, 2014; MAPA, 2014).

O clima tropical e a extensão territorial do Brasil contribuem para esse resultado, pois permitem a criação da maioria do gado em pastagens. Da mesma forma, o controle da sanidade animal e da segurança alimentar colaboraram para que o País atendesse às exigências de mercados rigorosos e conquistasse espaço no cenário mundial (SANTOS et al., 2009; FERRAZ, FELÍCIO, 2010; MAPA, 2014). Esse sistema de criação e as condições climáticas podem determinar o comportamento de pastejo, o estado fisiológico, as infestações prévias e as reinfecções dos animais, além da infestação das pastagens pelos parasitos (WALLER, 2005; DIAS et al., 2007). Helmintoses gastrintestinais estão relacionadas com o número e espécies de larvas as quais o animal é exposto, e à quantidade de parasitos que se estabelecem em seu trato gastrintestinal (CAMPOS, 2006).

As infecções por nematoides parasitos gastrintestinais constitui um sério problema, na produção animal, devido aos prejuízos econômicos. Isto inclui o retardo na produção, custos com tratamentos profilático e curativo e a morte dos animais. Os custos do controle dessas doenças são significativos nos países desenvolvidos. Naqueles em desenvolvimento, causam prejuízos pela restrição à criação de animais com reduzida susceptibilidade às parasitoses, porém com baixas performances produtivas. As raças de animais com melhores índices produtivos, quase sempre criadas nos países

desenvolvidos, raramente se sobressaem em condições com grande disponibilidade de parasitos durante todo ano (MOTA et al., 2003, VAN DIJK et al., 2010).

Cooperia e *Haemonchus* são os gêneros de nematoides parasitos gastrintestinais mais prevalentes em bovinos, no sudeste do Brasil, seguidos pelo gênero *Oesophagostomum*, conforme verificado por Luns (2013).

A anemia resultante da hemorragia da mucosa provocada pela fixação dos vermes e pelo seu hábito hematófago é a principal enfermidade provocada por *Haemonchus*. Algumas espécies dos gêneros *Cooperia*, durante a penetração na superfície epitelial do intestino delgado, podem romper a mucosa causando perda de proteínas plasmáticas e atrofia das vilosidades, reduzindo a superfície de absorção de nutrientes e líquidos. Nematoides do gênero *Oesophagostomum* migram profundamente na mucosa do intestino, provocando uma resposta inflamatória com formação de nódulos, podendo levar a quadros de colite ulcerativa, levando na fase final da doença ao desenvolvimento de anemia e hipoalbuminemia, devido à perda proteica e extravasamento de sangue através da mucosa lesada (CAMPOS, 2006). Na região sudeste do Brasil, o índice de mortalidade devido às helmintoses em bezerros é de 5% a 10%, principalmente, em rebanho leiteiro (SILVA, LIMA, 2009).

Animais com desempenho aceitáveis dependem do controle destas infecções com anti-helmínticos de largo espectro, que eliminam a carga parasitária, e de produtos com atividade persistente que impedem o estabelecimento de larvas infectantes (L3) ingeridas após o tratamento (SUTHERLAND, LEATHWICK, 2011). Contudo, esses produtos podem deixar resíduos na carne e no leite e causar impacto ambiental (FLOATE, 2006; MARTÍNEZ, LUMARET, 2006; MENDOZA-DE-GUIVES, TORRES-ACOSTA, 2012). Além disso, o emprego indiscriminado e em larga escala de anti-helmínticos representa um problema mundial devido à resistência, inclusive múltipla causada pela utilização de diferentes bases sobre uma população de parasitos (MEJÍA et al., 2003; MERTZ et al., 2005; MELLO et al., 2006). A resistência aos antiparasitários está redefinindo os métodos de controle dos nematoides, incluindo o uso dos anti-helmínticos. Tratamentos baseados na epidemiologia, eliminação de vermifugações desnecessárias e uso contínuo de uma mesma classe de anti-helmíntico, além da rotação de compostos químicos são práticas recomendadas. Assim, algumas alternativas, não químicas, como a rotação de pastagem, definição de cruzamentos

raciais, seleção de animais geneticamente resistentes às infecções por parasitos e o aumento da imunidade pela nutrição adequada são práticas de manejo importantes para programas integrados e sustentáveis de controle de parasitos (MOTA et al., 2003; KAPLAN, VIDYASHANKAR, 2012).

Antagonistas naturais de helmintos, incluindo protozoários, bactérias, vírus, ácaros, fungos e besouros, podem atuar no controle biológico (GRONVOLD et al., 1996), mas os fungos nematófagos têm mostrado maior potencial (DIAS et al., 2007; VAN OOIJ, 2011; WARD et al., 2012). Estes fungos são divididos em três grupos: endoparasitas, predadores e ovicidas ou fungos oportunistas. Os fungos endoparasitas produzem conidióforos com esporos que, uma vez ingeridos, se desenvolvem em hifas responsáveis pela absorção do conteúdo interno do nematoide. Os oportunistas ou ovicidas podem colonizar o conteúdo dos ovos e das larvas em desenvolvimento (FRASSY et al., 2010; DALLEMOLE-GIARETTA et al., 2012.). Suas hifas penetram na casca do ovo através dos pequenos poros. Ao atravessar a camada vitelínica e mover-se através das camadas adjacentes de quitina e de lipídios as hifas aumentam de tamanho. Como consequência desse processo, a camada vitelínica é dividida, a de quitina se torna vacuolizada e a lipídica torna-se dispersa provocando alterações na permeabilidade da casca. Hifas endógenas emergem do ovo e produzem conidióforos que atuam como uma fonte de conídios. Além disso, como saprófitas, não dependem da presença dos parasitas no solo, o que facilita seu cultivo em laboratório (BRAGA, ARAÚJO, 2014).

Fungos predadores são os mais utilizados no controle biológico de nematoides que parasitam o gado. Esses fungos produzem estruturas em forma de anéis constritores e não constritores, hifas, botões e redes tridimensionais adesivas ao longo do micélio com a função de capturar os nematoides. Dessa forma, as hifas conseguem penetrar na cutícula do nematoide, se desenvolvem e digerem os conteúdos internos dos parasitos. Além disso, apresentam maior potencial para industrialização (BRAGA, ARAÚJO, 2014). Alguns destes organismos, como os fungos *Arthrobotrys robusta* e *Duddingtonia flagrans* podem suportar a passagem pelo trato gastrintestinal dos ruminantes após administração oral, e uma vez nas fezes podem germinar, colonizar o bolo fecal e capturar as larvas de parasitas antes que elas migrem para a pastagem (RODRIGUES et al., 2001; ARAÚJO & RIBEIRO, 2003; MOTA et al., 2003). Esses fungos têm

capacidade de reduzir o desenvolvimento das larvas de um grande número de helmintos nas fezes sem impacto negativo sobre nematoides não-alvo e ao meio ambiente (BRAGA, ARAÚJO, 2014). Contudo, a compatibilidade entre os diversos grupos de fungos nematófagos é pouco conhecida (ARAÚJO et al., 2004; ARAÚJO et al., 2006; TAVELA et al., 2012).

Assim, a associação de isolados fúngicos pode ocasionar um sinergismo, e a potencialização de suas ações ou reduzir falhas com o uso de um único isolado.

OBJETIVOS

Objetivo geral

- Avaliar a compatibilidade entre os fungos nematófagos *Arthrobotrys robusta* (isolado I31) e *Duddingtonia flagrans* (isolado AC001) em condições laboratoriais e a ação conjunta desses fungos na redução das nematodioses gastrintestinais de bovinos.

Objetivos específicos

- Verificar a compatibilidade entre os fungos *Arthrobotrys robusta* (isolado I31) e *Duddingtonia flagrans* (isolado AC001) com os testes de confrontação direta, antibiose e de compostos voláteis em laboratório;
- Avaliar as reduções das contagens de ovos de nematoides por grama de fezes (OPG) e do número de larvas infectantes (L3) recuperadas das coproculturas;
- Realizar a contagem de larvas infectantes (L3) por quilograma de matéria seca recuperadas da pastagem nos grupos tratado e controle.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANUALPEC: **Anuário estatístico da produção animal**. São Paulo: FNP Consultoria & Comércio, 1-333, 2014.

ARAÚJO, J. V.; RIBEIRO, R. R. Atividade predatória sobre larvas de trichostrongilídeos (Nematoda: Trichostrongyloidea) de isolados fúngicos do gênero *Monacrosporium* após a passagem pelo trato gastrointestinal de bovinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 12, n. 2, p. 76-81, 2003.

ARAÚJO, J. V.; MOTA, M. A.; CAMPOS, A. K. Controle biológico de helmintos parasitos de animais por fungos nematófagos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Seropédica-RJ, v. 13, p. 165-170, 2004.

ARAÚJO, J. V. et al. Efeito antagônico de fungos predadores dos gêneros *Monacrosporium*, *Arthrobotrys* e *Duddingtonia* sobre larvas infectantes de *Cooperia* sp. e *Oesophagostomum* sp. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 3, p. 373-380, 2006.

BRAGA, F. R.; ARAÚJO, J. V. Nematophagous fungi for biological control of gastrointestinal nematodes in domestic animals. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, p. 71-82, 2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Plano mais pecuária/ Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Assessoria de Gestão Estratégica. - Brasília: MAPA/ACS, 32 p. 2014.

CAMPOS, A. K. Fungos nematófagos no controle de nematoides gastrintestinais de ruminantes. 2006. 138 f. Tese (Doutorado) Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2006.

DALLA PRIA, M.; FERRAZ, S. Controle biológico de *Meloidogyne incognita*, raça 3, por seis espécies de *Monacrosporium*, isoladas ou combinadas com *Verticillium chlamydosporium*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 21, n. 1, p. 30-34, 1996.

DALLEMOLE-GIARETTA, R. et al. Screening of *Pochonia chlamydosporia* Brazilian isolates as biocontrol agents of *Meloidogyne javanica*. **Crop Protection**, v. 42, p. 102-107, 2012.

DIAS, A. S. et al. Relação entre larvas recuperadas da pastagem e contagem de ovos por gramas de fezes (OPG) de nematoides gastrintestinais de bovinos na microrregião de Viçosa. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 16, n. 1, p. 33-36, 2007.

DIAS, A. S. et al. Application of a formulation of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* in the control of cattle gastrointestinal nematodiosis. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, p. 1245-1252, 2007.

FERRAZ, J. B. S.; FELÍCIO, P. E. Production systems: an example from Brazil. **Meat Science**, v. 84, p. 238-243, 2010.

FLOATE, K. D. Endectocide use in cattle and fecal residues: environmental effects in Canada. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 70, p. 1-10, 2006.

FRASSY, L. N. et al. Destruição de ovos de *Toxocara canis* pelo fungo nematófago *Pochonia chlamydosporia*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, p. 102-104, 2010.

GRONVOLD, J. et al. Induction of traps by *Ostertagia ostertagi* larvae, chlamydospore production and growth rate in the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans*. **Journal of Helminthology**, v. 70, p. 291-297, 1996.

KAPLAN, R. M.; VIDYASHANKAR, A. N. An inconvenient truth: Global worming and anthelmintic resistance. **Veterinary Parasitology**, v. 186, p. 70-78, 2012.

LUNS, F. D. Avaliação da interação entre os isolados fungicos *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium* e *Arthrobotrys robusta* no controle biológico de nematóides gastrintestinais de bovinos leiteiros a campo. 2013. 39 f. Dissertação (Mestrado) Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2013.

MAPA. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento do Brasil. Disponível em: <www.agricultura.gov.br>. Acesso em 24/08/2014.

MARTÍNEZ, M. I.; LUMARET, J. P. Las prácticas agropecuárias y sus consecuencias em la entomofauna y el entorno ambiental. **Folia Entomológica Mexicana**, v. 45, n. 1, p. 57-68, 2006.

MEJÍA, M. E. et al. Multispecies and multiple anthelmintic resistance on cattle nematodes in a farm in Argentina: the beginning of high resistance. **Veterinary Research**, v. 34, p. 461-467, 2003.

MELLO, M. H. A. et al. Resistência lateral às macrolactonas em nematodas de bovinos. **Archives of Veterinary Science**, v. 11, n. 1, p. 8-12, 2006.

MENDOZA-DE-GIVES, P.; TORRES-ACOSTA, F. Biotechnological use of fungi in the control of ruminant parasitic nematodes. In: Arias MS, Paz-Silva A (eds) Fungi: types, environmental impact and role in disease. **Nova Editorial**, New York, p. 389-408, 2012.

MERTZ, K. J.; HILDRETH, M. B.; EPPERSON, W. B. Assessment of the effect of gastrointestinal nematode infestation on weight gain in grazing beef cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 226, p. 779-783, 2005.

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

RODRIGUES, M. L. A. et al. Trapping capability of *Arthrobotrys* sp. and *M. thaumasium* on cyathostome larvae. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 10, n. 2, p. 51-54, 2001.

SANTOS, M. E. R. et al. Produção de bovinos em pastagens de capim braquiária diferidas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. 4, p. 635-642, 2009.

SILVA, M. E.; LIMA, W. S. Controle e aspectos epidemiológicos das helmintoses de bovinos. Boletim Técnico - **Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais**, v. 93, p. 1-40, 2009.

SUTHERLAND I. A.; LEATHWICK, D. M. Anthelmintic resistance in nematode parasites of cattle: a global issue? **Trends in Parasitology**, v. 27, p. 176-181, 2011.

TAVELA, A. O.; ARAÚJO, J. V.; BRAGA, F. R.; ARAUJO, J. M.; MAGALHÃES, L. Q.; SILVEIRA, W. F.; BORGES, L. A. *In vitro* association of nematophagous fungi *Duddingtonia flagrans* (AC001), *Monacrosporium thaumasium* (NF34) and *Pochonia chlamidosporia* (VC1) to control horse cyathostomin (Nematoda: Strongylidae). **Biocontrol Science and Technology**, v. 22, p. 607-610, 2012.

WALLER, P. J. Sustainable nematode parasite control strategies for ruminant livestock by grazing management and biological control. **Animal Feed Science Technology**, v. 126, p. 277-289, 2005.

WARD, E. et al. The *Pochonia chlamydosporia* serine protease gene *vcp1* is subject to regulation by carbon, nitrogen and pH: implications for nematode biocontrol. **PLOS ONE**, v. 7, p. 35657, 2012.

VAN DIJK, J. et al. Climate change and infectious disease: helminthological challenges to farmed ruminants in temperate regions. **Animal**, v. 4, p. 377-392, 2010.

VAN OOIJ, C. Fungal pathogenesis: hungry fungus eats nematode. **Natural Reviews Microbiology**, v. 9, p. 766-767, 2011

CAPÍTULO 1

COMPATIBILIDADE ENTRE OS FUNGOS NEMATÓFAGOS *Arthrobotrys robusta* E *Duddingtonia flagrans* EM CONDIÇÕES LABORATORIAIS

RESUMO

O uso combinado de fungos nematófagos representa uma alternativa que poderá maximizar o controle dos nematoides gastrintestinais de bovinos. Entretanto, para um resultado de sucesso, torna-se necessária a seleção de isolados fúngicos eficientes e não antagônicos. Assim, os isolados fúngicos I31 de *Arthrobotrys robusta* e AC001 de *Duddingtonia flagrans* foram submetidos aos testes de confrontação direta, de antibiose e de compostos voláteis para a verificação da compatibilidade entre ambos. No teste de confrontação direta, o *A. robusta* colonizou aproximadamente 2/3 da placa de Petri, o que sugere competição por espaço entre eles e, portanto, antagonismo. No teste de antibiose, nenhum fungo apresentou produção de antibióticos no meio de cultura, resultando na ausência de halo de inibição da cultura subsequentemente semeada na mesma placa. No teste de compostos voláteis, o isolado de *A. robusta* reduziu ($p < 0,05$) o crescimento de *D. flagrans*. Assim, em princípio, os dois fungos não mostraram aptidão para uso conjunto na mesma formulação para o controle biológico.

Palavras-chave: *Arthrobotrys robusta*; antibiose; compostos voláteis; *Duddingtonia flagrans*; fungos helmintófagos.

ASSESSMENT OF COMPATIBILITY BETWEEN NEMATOPHAGOUS FUNGI
Arthrobotrys robusta AND *Duddingtonia flagrans* IN LABORATORIAL
CONDITIONS

ABSTRACT

The use of combined helminthophagous fungi represents a promising alternative that could maximize the control of cattle gastrointestinal nematodes. However, for a successful result, a selection of efficient isolated fungal and not antagonistic is necessary. Thus, the fungic isolates *Arthrobotrys robusta* (I31) and *Duddingtonia flagrans* (AC001) were submitted to tests of direct confrontation, antibiosis and volatile were checked for the compatibility between both of them. In a direct comparison test, the *A. robusta* colonized approximately two thirds of the Petri plate, which suggests that there is competition for space between them and therefore a form of antagonism. In antibiosis test, the production of antibiotics on culture medium by any fungus was not observed, which resulted in the lack of inhibition zone of the subsequently fungus sown in the same plate. In the volatile compounds test, *A. robusta* reduced ($p < 0.05$) the growth of *D. flagrans*. Thus, this study demonstrated that, originally, the two fungi in question were not fit to be used together in the same formulation in biological controls.

Keywords: *Arthrobotrys robusta*; antibiosis; volatile compounds; *Duddingtonia flagrans*; helminthophagous fungi

1. INTRODUÇÃO

Fungos nematófagos são utilizados no controle biológico de pragas e doenças, como os fitonematoides, que causam perdas econômicas mundiais (SIKORA, FERNANDEZ, 2005), nematoides gastrintestinais parasitos de animais domésticos destinados a produção (MENDOZA DE GUIVES et al., 2006; DIAS et al., 2007; ASSIS et al., 2012) e também os nematoides potencialmente zoonóticos (BRAGA et al., 2011; ARAUJO et al., 2012; FERNANDES et al., 2012). O controle biológico desses patógenos em plantas e animais tem sido estudado (FREITAS, CARNEIRO, 2000; BRAGA et al., 2009; BRAGA et al., 2010), mas a maioria das abordagens tem sido baseada no uso de um único antagonista contra o(s) nematoide(s) alvo(s) (SIDDIQUI, SHAUKAT, 2002).

A presença de mais de um agente de biocontrole é considerada um dos principais fatores que contribuem para a presença de solos supressivos a doenças (FERREIRA et al., 2008). Todavia, na maioria dos casos onde o controle biológico ocorra naturalmente, o resultado pode ser consequência da mistura de antagonistas, muito mais do que a alta população de apenas um deles (SIDDIQUI, SHAUKAT, 2003). Contudo, características como a compatibilidade entre os isolados, é necessária para que estes organismos sejam utilizados no controle biológico de pragas e doenças (ARAÚJO et al., 2004). A utilização de mais de um fungo nematófago, conjuntamente, pode minimizar possíveis falhas na administração ou mesmo potencializar suas ações como agentes biocontroladores (DALLA PRIA, 1996). No entanto, mecanismos de controle biológico como a capacidade de produzir substâncias com efeito fungicida, podem variar entre espécies e isolados da mesma espécie durante a vida dos antagonistas. Dessa forma, é importante conhecer as características desses agentes para aumentar a efetividade do biocontrole e torná-lo viável (MARTINS-CORDER, MELO, 1988).

Os gêneros *Duddingtonia* e *Arthrobotrys*, produtores de armadilhas e enzimas que degradam a cutícula dos nematoides se destacam entre os fungos nematófagos

(YANG et al., 2011; BRAGA et al., 2012). A comprovação da eficácia desses fungos, avaliados isoladamente (MENDOZA-DE-GUIVES et al., 1992; FERREIRA et al., 2012; BRAGA et al., 2014) e testes feitos associando isolados fungicos (ARAÚJO et al., 2006), indicam que novas avaliações devem ser realizadas em condições laboratoriais e *in vivo* para confirmar os potenciais desses agentes biocontroladores associados. A compatibilidade entre os gêneros *Duddingtonia* spp. e *Arthrobotrys* spp. ainda é desconhecida e não existem relatos que mencionem sinergismo, na atividade predatória entre eles laboratório. Fatores como o teor de matéria orgânica, pH, umidade e troca de gases podem afetar a interação entre esses organismos e nos resultados *in vitro*. (MONTEIRO, 2013).

O presente trabalho objetivou estudar a compatibilidade entre os fungos *Arthrobotrys robusta* e *Duddingtonia flagrans*, em condições laboratoriais.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Local do experimento

Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Controle Biológico de Fitonematóides (Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária - BIOAGRO) do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Minas Gerais, Brasil.

Dois fungos predadores, *D. flagrans* (isolado AC001) e *A. robusta* (isolado I31) foram utilizados. Esses fungos, do solo brasileiro, foram mantidos em meio Corn Meal Agar (CMA2%) no laboratório de parasitologia da UFV.

2.2 Ensaio

2.2.1 Teste de antagonismo em confrontação direta

Um disco de cultura contendo o isolado AC001 e um disco do isolado I31 foram colocados em posições opostas em placas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo o meio de cultura Batata Dextrose Agar 2% (BDA). Essas placas foram incubadas por 10 dias a

26°C na ausência de luz e após esse período foram avaliadas com uma escala de notas (BELL et al., 1982): 1- colonização completa da placa por *D. flagrans*; 2- colonização de 2/3 da placa por *D. flagrans*; 3- colonização de 50% da placa por fungo; 4- colonização de 2/3 da placa pelo fungo *A. robusta*; 5- colonização completa da placa pelo fungo *A. robusta*. O experimento teve cinco repetições.

2.2.2 Teste de Antibiose

Suspensões contendo estruturas dos fungos *D. flagrans* e *A. robusta* foram obtidas de colônias cultivadas em BDA, durante 10 dias, a 25°C, na concentração de 10⁵ e 10⁴ clamidósporos e conídios por mL respectivamente.

Placas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo o meio BDA 2% foram cobertas assepticamente com membrana de celulose. Em seguida, discos de cultura com *D. flagrans* e *A. robusta* foram colocados nos centros das placas, sobre a membrana de celulose. Essas placas foram incubadas por oito dias, a 26°C, no escuro. Após esse período, as colônias foram delimitadas com caneta de tinta permanente para possibilitar a verificação da formação do halo de inibição. As membranas de celulose, com as colônias, foram removidas das placas. Essas placas foram invertidas e 1 mL de clorofórmio foi adicionado na sua parte inferior, para eliminar resíduos estruturais dos fungos. Após a evaporação do clorofórmio, as placas foram mantidas na posição original e deixadas por 30 minutos sob irradiação direta de luz ultravioleta, no interior da câmara de fluxo laminar. Em seguida, uma suspensão contendo estruturas do fungo *A. robusta* foi adicionada sobre a superfície do meio de cultura onde anteriormente foi cultivado *D. flagrans*. Este procedimento foi repetido para o fungo *D. flagrans* onde anteriormente foi cultivado *A. robusta*. A suspensão foi espalhada uniformemente sobre o meio com auxílio da alça de Drigalsky. As placas foram mantidas a 26°C, na ausência de luz. Após 10 dias de incubação, foi avaliada a formação do halo de inibição (Martins-Corder & Melo, 1988).

2.2.3 Teste de compostos voláteis

O efeito de metabólitos voláteis foi avaliado com metodologia de Bharat et al. (1980). Duas tampas de placas de Petri com 9 cm de diâmetro foram posicionadas uma sobre a outra, após meio BDA 2 % ter sido vertido em cada uma delas. Um disco com micélio de *D. flagrans* foi colocado na superfície da tampa inferior e, na superior, *A. robusta*. *A. robusta* foi também testado na tampa inferior e *D. flagrans* na superior, ambas na forma de discos de cultura. As placas foram vedadas lateralmente e mantidas a 25°C, por cinco dias no escuro. Os diâmetros de cada colônia foram medidos em centímetros para o cálculo da área, e posteriormente os dados foram submetidos à análise de variância e ao teste de Tukey ao nível de significância de 5 % e os graus de liberdade dos tratamentos desdobrados em contrastes ortogonais. O delineamento foi inteiramente casualizado, com quatro repetições.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Duas alíquotas de fungos da mesma espécie, cultivados em uma mesma placa, apresentaram crescimento homogêneo no teste de confrontação direta, o que confirma a não interferência de um fungo sobre o outro (Figura 1 - A e C). Porém, no teste com *A. robusta* e *D. flagrans*, o primeiro fungo colonizou aproximadamente 2/3 da placa, equivalente a nota 4, o que sugere competição entre eles e, portanto, algum antagonismo (Figura 1 - B). Contudo, não houve evidência de hiperparasitismo, sem crescimento de uma colônia sobre a outra.

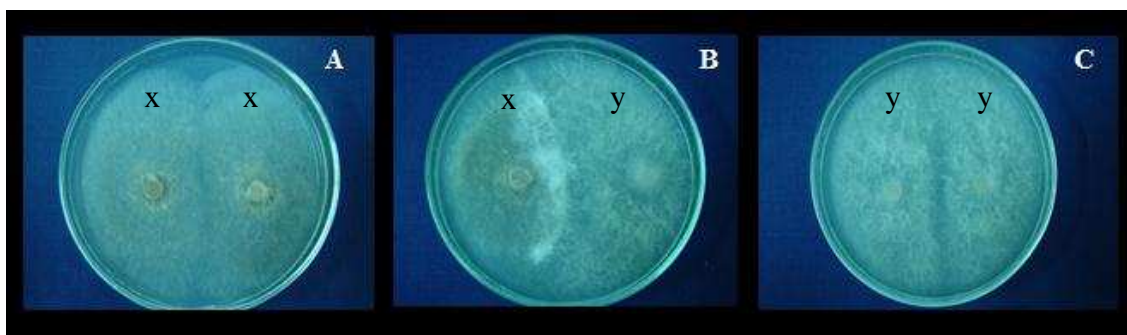


Figura 1. Crescimento conjunto das colônias de *Duddingtonia flagrans* (x) e *Arthrobotrys robusta* (y). A - *D. flagrans* vs. *D. flagrans*; B - *D. flagrans* vs. *A. robusta*; C - *A. robusta* vs. *A. robusta*.

Os requerimentos nutricionais, dos fungos do gênero *Arthrobotrys* spp., como: carbono, nitrogênio e vitaminas podem indicar suas condições de desenvolvimento em diversos ambientes. Vários meios de cultura têm sido utilizados para avaliar o crescimento desses fungos em meios naturais ou sintéticos em condições adequadas de temperatura e pH (CARDOSO et al., 2009). O fungo *Arthrobotrys oligospora* demonstrou capacidade de inibir o crescimento ou competir por recursos alimentares com outros fungos predadores, além de crescer e matar nematóides mais rapidamente que outros fungos cultivados em meio sólido, o que pode explicar o fato de ser o fungo predador mais comumente encontrado no mundo (ANDALÓ et al., 2008). Dessa forma, as condições do presente teste, possivelmente, favoreceram o crescimento de *A. robusta* comparado ao *D. flagrans*.

A produção de metabólitos tóxicos pelos fungos *D. flagrans* e *A. robusta* não é conhecida, por isto, foi importante mostrar que não produzem compostos capazes de inibir um ao outro em aplicação conjunta. Isso foi verificado pela não produção de antibióticos pelos fungos no meio de cultura, o que resultou na ausência de halo de inibição da cultura subsequentemente semeada na mesma placa.

O isolado de *A. robusta* reduziu o crescimento de *D. flagrans* sugerindo a ação de antibióticos voláteis na inibição do crescimento micelial. Por outro lado, *D. flagrans* não reduziu o crescimento de *A. robusta* (Tabela 1).

Tabela 1. Valores médios e desvio padrão (\pm) da área (cm²) de crescimento micelial, em tampas de placas de Petri, dos fungos *Duddingtonia flagrans* (tampa superior) vs. *Arthrobotrys robusta* (tampa inferior) e vice-versa quando comparados aos tratamentos *D. flagrans* vs. *D. flagrans* e *A. robusta* vs. *A. robusta* respectivamente.

<i>Duddingtonia flagrans</i> (tampa superior)		<i>Arthrobotrys robusta</i> (tampa superior)	
Tratamentos	Área (cm ²)	Tratamentos	Área (cm ²)
<i>D. flagrans</i>		<i>A. robusta</i>	
vs.	28,50 * \pm 6,01	vs.	57,61 ^{ns} \pm 1,10
<i>A. robusta</i>		<i>D. flagrans</i>	
<i>D. flagrans</i>		<i>A. robusta</i>	
vs.	34,98 \pm 0,52	vs.	57,06 \pm 1,28
<i>D. flagrans</i>		<i>A. robusta</i>	

CV (%)	21,09	1,91
--------	-------	------

ns: não significativo pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

* significativo pelo teste a 5% de probabilidade

CV: Coeficiente de Variação

4. CONCLUSÃO

Os isolados de *Arthobotrys robusta* (I31) e de *Duddingtonia flagrans* (AC001) mostraram, preliminarmente, incompatibilidade quando avaliados em conjunto. O primeiro apresentou desenvolvimento superior ou inibiu o crescimento do segundo. A associação desses fungos em futuras formulações, podem ser de utilização limitada.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDALÓ, V. Suscetibilidade de *Heterorhabditis amazonensis* (Rhabditida: Heterorhabditidae) a fungos predadores de nematóides. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba (SP), v. 32 (33), p. 177-184, 2008.

ARAÚJO, J. M. et al. Survival of *Pochonia chlamydosporia* in the gastrointestinal tract of experimentally treated dogs. **Research in Veterinary Science**, v. 93, p. 803-806, 2012.

ARAÚJO, J. V. et al. Atividade in vitro dos fungos nematófagos dos gêneros *Arthrobotrys*, *Duddingtonia* e *Monacrosporium* sobre nematoides trichostrongilídeos (Nematoda: Trichostrongyloidea) parasitos gastrintestinais de bovinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Seropédica-RJ, v. 13, n. 2, p. 65-71, 2004.

ARAÚJO, J. V. et al. Efeito antagônico de fungos predadores dos gêneros *Monacrosporium*, *Arthrobotrys* e *Duddingtonia* sobre larvas infectantes de *Cooperia* sp. e *Oesophagostomum* sp. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte-MG, v. 58, n. 6, p. 373-380, 2006.

ASSIS, R. C. L. et al. Biological control of trichostrongyles in beef cattle by the fungus *Duddingtonia flagrans* in alginate pellets formulation under natural grazing conditions in Brazil. **Experimental Parasitology**, v. 132, p. 373-377, 2012.

BELL, D. K. et al. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. **Phytopathology**, v. 72, p. 379-382, 1982.

BHARAT, R.; SINGH, V. N.; SINGH, D. B. *Trichoderma viride* as a mycoparasite of *Aspergillus* spp. **Plant and Soil**, v. 57, p. 131-135, 1980.

BRAGA, F. R. et al. Avaliação in vitro do fungo predador de nematoides *Duddingtonia flagrans* sobre larvas infectantes de ciatostomíneos de equinos (Nematoda: Cyathostominae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, p. 83-85, 2009.

BRAGA, F. R. et al. In vitro predatory activity of the fungi *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium*, *Monacrosporium sinense* and *Arthrobotrys robusta* on *Ancylostoma ceylanicum* third-stage larvae. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 146, p. 183-186, 2010.

BRAGA, F. R. et al. Destruição de larvas infectantes de *Strongyloides venezuelensis* pelos fungos *Duddingtonia flagrans*, *Arthrobotrys robusta* e *Monacrosporium sinense*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, p. 389-391, 2011.

BRAGA, F. R. et al. An extracellular serine protease of an isolate of *Duddingtonia flagrans* nematophagous fungus. **Biocontrol Science and Technology**, v. 22, p. 1131-1142, 2012.

BRAGA, F. R. et al. Predatory capability of the nematophagous fungus *Arthrobotrys robusta* preserved in silica gel on infecting larvae of *Haemonchus contortus*. **Tropical Animal Health and Production**, v. 46, p. 1-10, 2014.

CARDOSO, E. R.; ASSIS, L. C.; NAHAS, E. Nutrição e crescimento do fungo nematófago *Arthrobotrys oligospora*. **Summa Phytopathology**, Botucatu, v. 35, n. 4, p. 265-272, 2009.

DALLA PRIA, M.; FERRAZ, S. Controle biológico de *Meloidogyne incognita*, raça 3, por seis espécies de *Monacrosporium*, isoladas ou combinadas com *Verticillium chlamydosporium*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 21, n. 1, p. 30-34, 1996.

DIAS, A. S. et al. Application of a Formulation of the Nematophagous Fungus *Duddingtonia flagrans* in the control of cattle gastrointestinal nematodiosis. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, p. 1245-1252, 2007.

FERNANDES, F. M. et al. In vitro biological control of infective larvae of *Ancylostoma ceylanicum*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária** (Online), v. 21, p. 283-286, 2012.

FERREIRA, S. R. et al. *In vitro* sensitivity of infective larvae of *Oesophagostomum* species to nematophagous fungi. **Vetscan**, v. 7, p. 60-67, 2012.

FREITAS, L. G.; CARNEIRO, R. M. D. G. Controle biológico de fitonematóides por *Pasteuria* spp. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed). **Controle Biológico**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, v. 388, 2000.

FERREIRA, P. A., FERRAZ, S.; LOPES, E. A.; FREITAS, L. G. Parasitismo de ovos de *Meloidogyne exigua* por fungos nematófagos e estudo da compatibilidade entre os isolados fúngicos. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 2, n. 3, p. 21, 2008.

MARTINS-CORDER, M. P.; MELO, I. S. Antagonismo in vitro de *Trichoderma* spp. a *Verticillium dahliae* Kleb. **Scientia Agricola**, v. 55, p. 01-08, 1988.

MENDOZA-DE-GIVES, P. et al. Interaction between the nematode destroying fungus *Arthrobotrys robusta* (*Hyphomycetales*) and *Haemonchus contortus* infective larvae in vitro. **Veterinary Parasitology**, 41, 101-107. 1992.

MENDOZA-DE-GIVES, P. et al. Biological Control of Gastrointestinal Parasitic Nematodes Using *Duddingtonia flagrans* in Sheep under Natural Conditions in Mexico. **Annals of the New York Academy of Science**, p. 355-359, 2006.

MONTEIRO, T. S. A. Controle biológico do nematóide das galhas *Meloidogyne javanica*, e promoção de crescimento vegetal com os fungos *Pochonia chlamidosporia* e *Duddingtonia flagrans*: Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, 55f., Dissertação (Mestrado em Fitopatologia), 2013.

SIKORA, R. A.; FERNANDEZ, E. Nematode parasites of vegetables. In: Luc, M., Sikora, R.A., Bridge, J. (Eds.), Plant-Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture, second ed. CABI Publishing, Wallingford, UK, p. 319–392, 2005.

SIDDIQUI, I. A.; SHAUKAT, S. S. Mixtures of plant disease suppressive bacteria enhance biological control of multiple tomato pathogens. **Biology and Fertility of Soils**, v. 36, p. 260-268, 2002.

SIDDIQUI, I. A. & SHAUKAT, S. S. Combination of *Pseudomonas aeruginosa* and *Pochonia chlamydosporia* for control of root-knot infecting fungi in tomato. **Journal of Phytopathology**, v. 151, p. 215-222, 2003.

YANG, J. et al. Genomic and proteomic analyses of the fungus *Arthrobotrys oligospora* provide insights into nematode-trap formation. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 9, p. 1-12, 2011.

CAPÍTULO 2

ASSOCIAÇÃO DOS FUNGOS *Arthrobotrys robusta* E *Duddingtonia flagrans* NO CONTROLE DE NEMATOIDES DE BEZERROS MISTIÇOS NO SUDESTE DO BRASIL

RESUMO

A associação de dois fungos helmintófagos, *Duddingtonia flagrans* (isolado AC001) e *Arthrobotrys robusta* (isolado I31), foi avaliada no controle de nematóides gastrintestinais de bovinos a campo. Dois grupos de dez bezerros, mestiços Holandês-Zebu, com aproximadamente 15 meses de idade, foram mantidos em piquetes de *Brachiaria decumbens*, de fevereiro a agosto de 2012 em Viçosa, Minas Gerais, sudeste do Brasil. Cada animal do grupo tratado (A) recebeu 2 g/10 kg de peso vivo (PV) de péletes de alginato de sódio contendo os isolados fúngicos AC001 (0,2 g de micélio/10 kg de PV) e I31 (0,2 g de micélio/10 kg de PV) com ração comercial duas vezes por semana durante 26 semanas, enquanto os animais do grupo controle (B) receberam somente ração comercial. Ao final do experimento, o grupo A em relação ao grupo B apresentou os resultados: redução de 72,87 % do número de ovos por grama de fezes (OPG) e de 9,19 % do número de larvas recuperadas das coproculturas. O número de larvas infectantes recuperadas por quilograma de matéria seca de pastagem entre os grupos foi semelhante ($p > 0,05$). Assim, os fungos *D. flagrans* (AC001) e *A. robusta* (I31) não mostraram eficácia para controlar os helmintos parasitos de bovinos. Contudo, a associação desses isolados fúngicos e entre outros potencialmente eficazes no controle biológico das helmintoses gastrintestinais de bovinos a campo devem ser melhor estudadas.

**ASSOCIATION OF THE *Arthrobotrys robusta* AND *Duddingtonia flagrans*
FUNGI TO CONTROL NEMATODE OF CROSSBRED CALVES IN
SOUTHEASTERN BRAZIL**

ABSTRACT

Dois grupos de dez bezerros, mestiços Holandês-Zebu, com aproximadamente 15 meses de idade, foram mantidos em piquetes de *Brachiaria decumbens*, de fevereiro a agosto de 2012 em Viçosa, Minas Gerais, sudeste do Brasil. Cada animal do grupo tratado (A) recebeu 2 g/10 kg de peso vivo (PV) de péletes de alginato de sódio contendo os isolados fúngicos AC001 (0,2 g de micélio/10 kg de PV) e I31 (0,2 g de micélio/10 kg de PV) com ração comercial duas vezes por semana durante 26 semanas, enquanto os animais do grupo controle (B) receberam somente ração comercial. Ao final do experimento, o grupo A em relação ao grupo B apresentou os resultados: redução de 72,87 % do número de ovos por grama de fezes (OPG) e de 9,19 % do número de larvas recuperadas das coproculturas. O número de larvas infectantes recuperadas por quilograma de matéria seca de pastagem entre os grupos foi semelhante ($p>0,05$). Assim, os fungos *D. flagrans* (AC001) e *A. robusta* (I31) não mostraram eficácia para controlar os helmintos parasitos de bovinos. Contudo, a associação desses isolados fúngicos e entre outros potencialmente eficazes no controle biológico das helmintoses gastrintestinais de bovinos a campo devem ser melhor estudadas.

The combining of two helminthophagous fungi, *Duddingtonia flagrans* (AC001) and *Arthrobotrys robusta* (I31), was assessed in control of gastrointestinal nematodes of field cattle. Two groups of ten calves, crossbred Holstein-Zebu, with approximately 18 months of age, were kept in paddocks of *Brachiaria decumbens* from February to August 2012 in Viçosa, Minas Gerais State, in southeastern Brazil. Each animal in the treated group (A) received 2 g / 10 kg body weight (BW) of sodium alginate pellets

containing the fungal AC001 (0.2 g mycelium / 10 kg of BW) and I31 (0.2 g mycelium / 10 kg of BW) with commercial ration twice a week for 26 weeks, while the animals in the control group (B) received only commercial feed. At the end of the experiment, group A compared to group B showed the following results: 72.87% reduction in the average number of eggs per gram of feces (EPG) and 9.19% of the average number of larvae recovered from coprocultures. However, there was no difference ($p>0.05$) in the number of infective larvae recovered per kilogram of pasture dry matter between the groups. Thus, this result showed that treatment using fungi *D. flagrans* (AC001) and *A. robusta* (I31) was not effective for controlling helminth parasites in cattle. However, other experiments should be conducted with this association between fungal isolates and other potentially effective in the biological control of gastrointestinal helminths of field cattle.

1. INTRODUÇÃO

Infecções por nematoides constituem um sério problema, com perdas na produção animal, muitas vezes não visíveis ou quantificadas (MOTA et al., 2003). Esses organismos causam prejuízos na criação de ruminantes (principalmente a animais jovens) devido ao déficit produtivo proveniente de infecções subclínicas ou clínicas, custos com tratamentos profiláticos e curativos e à mortalidade de animais (FORBES et al., 2002; PERRI et al., 2011). O conhecimento da epidemiologia dos parasitos e suas interações com os hospedeiros em um determinado ambiente e sistema produtivo é o requerimento mais importante no estabelecimento de um sistema de controle efetivo. A falta dessas informações pode levar à utilização inadequada de tratamentos anti-helmínticos, relacionada ao rápido desenvolvimento de resistência e traduzida em aumentos de casos clínicos e de perdas produtivas (ARAÚJO et al., 2006).

O controle das infecções por parasitos gastrintestinais é imprescindível e tem sido realizado, principalmente, com anti-helmínticos na produção de bovinos. O emprego indiscriminado e em larga escala desses químicos aumenta os problemas com resistência (KAPLAN, 2004), inclusive múltipla (MEJÍA et al., 2003) pela utilização de diferentes bases sobre uma população de parasitos (COLES, 2002; MELLO et al., 2006). Resíduos na carne e no leite e a agressão ambiental são consequências indesejáveis da aplicação dos quimioterápicos no rebanho (ARAÚJO et al., 2004; FLOATE, 2006; MENDOZA-DE-GUIVES, TORRES-ACOSTA, 2012). Além disso, o ciclo biológico é dividido em duas fases, uma parasitária e outra de vida livre. Esses fatos revelam a necessidade de estudos com formas alternativas de controle que podem reduzir a dependência das bases químicas, e a utilização dos fungos nematófagos é promissora (DIAS et al., 2007; JOBIM et al., 2008; ASSIS et al., 2012).

Nematoides gastrintestinais podem passar pelo trato gastrintestinal dos bovinos após a sua administração oral, colonizar o bolo fecal e capturar as larvas infectantes dos nematoides antes que elas migrem para a pastagem (PAZ-SILVA et al., 2011; FITZ-ARANDA, 2013; ARIAS et al., 2013). Os fungos *D. flagrans* (AC001) e

Monacrosporium thaumasium (NF34) associados em péletes de alginato de sódio mostraram sinergismo na atividade predatória sobre larvas infectantes de ciathostomíneos após passagem pelo trato gastrintestinal de cavalos (TAVELA et al., 2013). Formulações a base de alginato de sódio com fungos predadores tem sido utilizada a campo, mas a compatibilidade entre os fungos *D. flagrans* e *A. robusta* após passagem pelo trato gastrintestinal de bezerros é pouco conhecida.

O objetivo desse trabalho foi avaliar a ação conjunta dos fungos nematófagos *A. robusta* (isolado I31) e *D. flagrans* (isolado AC001) na redução dos nematoides gastrintestinais de bovinos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Fungos

Os fungos predadores *D. flagrans* (AC001) e *A. robusta* (I31) foram utilizados. Esses fungos, provenientes do solo brasileiro, foram mantidos em meio Corn Meal Agar (CMA 2 %) no Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal de Viçosa, Estado de Minas Gerais Brasil. Discos de cultura (5 mm de diâmetro) dos isolados testados foram tranferidos para frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 150 mL de meio líquido Batata Dextrose (Difco), pH 6,5 e incubados sob agitação de 120 rpm no escuro a 26 °C durante 10 dias para a produção de micélio fúngico. Em seguida, os micélios foram peletizados com alginato de sódio (WALKER, CONNICK, 1983).

2.2 Animais

O experimento foi realizado na região de Viçosa, Minas Gerais, sudeste do Brasil, (latitude 20°45'20" e longitude 42°52'40"), de fevereiro a agosto de 2012. Vinte bezerros mestiços Holandês-Zebu, com idade média de 15 meses e peso médio de 150 kg, vermifugados com ivermectina 3,5 % Vet Brands[®] (0,70 mg/kg PV) foram utilizados. Sessenta dias após o tratamento com o anti-helmíntico, os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos (A e B) com dez animais cada em dois piquetes com 5,0 hectares de *Brachiaria decumbens* com histórico de pastejo por animais naturalmente infectados por nematóides parasitos gastrintestinais de bovinos. O

ensaio experimental seguiu procedimentos recomendados pelas normas estabelecidas pelo Comitê de Ética (Protocolo 46/2013), da Universidade Federal de Viçosa.

2.3 Ensaio

Cada animal do grupo tratado (A) recebeu por via oral duas vezes na semana 10 g de péletes por 10 kg de peso vivo de cada fungo (0,2 g de micélio/ 10 kg de PV) misturados em ração comercial para bovinos, enquanto os animais do grupo controle (B) receberam somente ração comercial (DIAS et al., 2007). Amostras fecais dos animais dos dois grupos foram colhidas semanalmente diretamente da ampola retal para a contagem de ovos por grama de fezes (OPG) e coproculturas (GORDON, WHITLOCK, 1939).

As coproculturas foram feitas com, aproximadamente, 20 g de fezes misturadas com vermiculita industrial autoclavada (NS Barbosa Ind. Com.[®]). Em seguida, foram incubadas a 26°C, durante oito dias, para se obter larvas infectantes (L3) de nematoides parasitos do trato gastrointestinal de bovinos. As larvas foram identificadas em nível de gênero (KEITH, 1953).

Amostras com 500 g de pastagens dos piquetes A e B foram coletadas de seis pontos distintos em zigue-zague em intervalos de quinze dias para a recuperação de larvas infectantes da pastagem (AMARANTE et al., 1996). Posteriormente, as amostras foram colocadas em estufa de secagem a 100°C durante três dias para a determinação da quantidade de matéria seca. Diariamente, as médias mensais das temperaturas mínima, média e máxima, umidade relativa do ar e precipitação pluvial foram obtidas da estação especializada na região de Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

2.4 Análise dos dados

Os percentuais de redução do OPG e do número de larvas recuperadas das coproculturas de ambos os grupos foram analisados (MENDOZA-DE-GUIVES et al., 1999) com a fórmula:

$$\% \text{ Redução} = (XC - XT) / XC \times 100$$

Onde:

XC= Média do número de ovos do grupo controle

XT= Média do número de ovos do grupo tratado

XC= Média do número de larvas recuperadas no grupo controle

XT= Média do número de larvas recuperadas no grupo tratado

Os números de ovos por grama de fezes (OPG) e de larvas infectantes (L3) recuperadas das coproculturas e o de larvas (L3) recuperadas das pastagens dos grupos tratado e controle, foram comparadas ao longo do período experimental. Os dados foram transformados em $\log(x + 1)$ e submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de Tukey (5%) de probabilidade. As análises foram realizadas com o software BioEstat 5.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O OPG do grupo tratado com a associação dos fungos *D. flagrans* e *A. robusta* (A) comparado ao grupo controle (B) mostrou redução de (72,87 %). O OPG diferiu entre os dois grupos ao final do teste ($p < 0,05$). Esses resultados concordam com aqueles de ensaios experimentais a campo com bovinos (ARAÚJO et al, 2000; DIMANDER et al., 2003; SILVA et al., 2014) em trabalhos, apenas, com o fungo *D. flagrans*. Os baixos níveis de OPG em fevereiro podem resultar da vermifugação prévia dos animais, pois nos meses seguintes os animais ficaram expostos às condições ambientais que permitiram repetidas reinfecções (Figura 2). O nível de parasitismo foi maior até o final do experimento (DIAS et al. 2007). O número do OPG seguiu tendência semelhante nos dois grupos durante o período experimental. Os animais dos grupos A e B apresentaram maior OPG nos meses de abril e junho, possivelmente, pela elevação do índice pluviométrico de março a junho (Figuras 1 e 2).

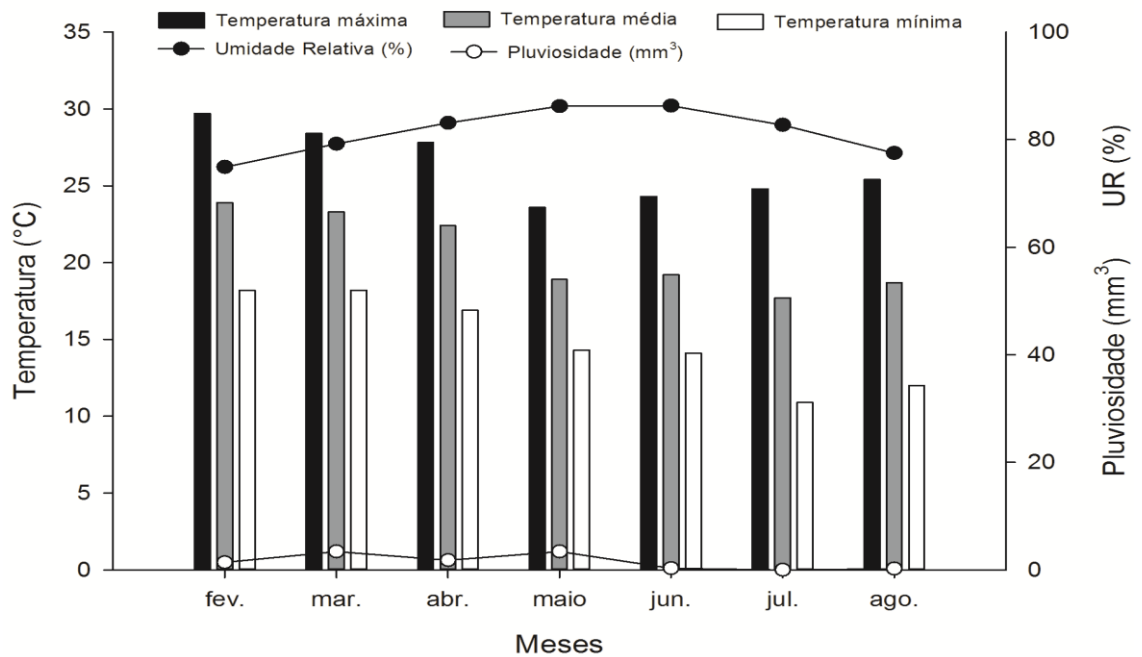


Figura 1. Temperatura média mensal: mínima, média e máxima (°C), umidade relativa do ar (UR%) e pluviosidade (mm³) no período de fevereiro a agosto de 2012 em Viçosa, Estado de Minas Gerais, sudeste do Brasil.

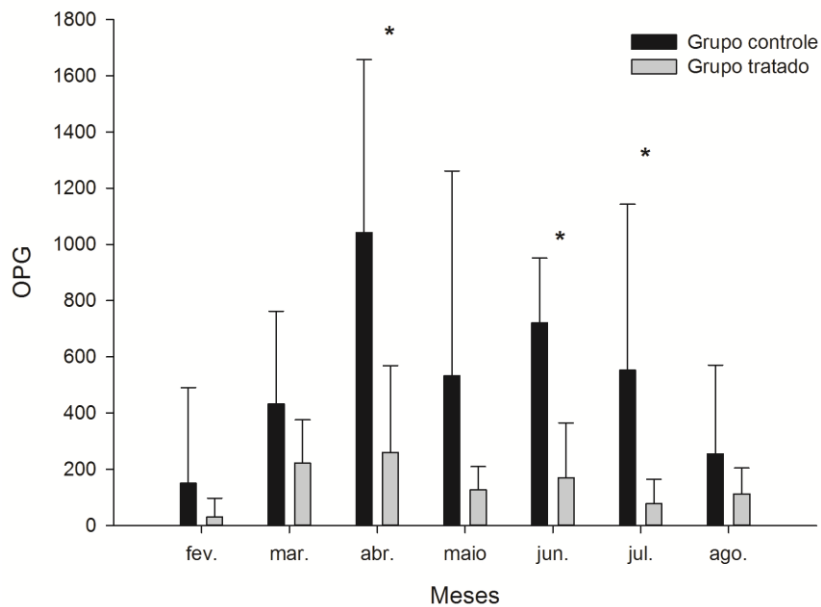


Figura 2. Médias mensais de ovos por grama de fezes (OPG) dos animais dos grupos controle e tratado com a associação dos fungos *Duddingtonia flagrans* e *Arthrobotrys robusta*. Fevereiro a agosto de 2012, Viçosa, Estado de Minas Gerais, sudeste do Brasil. * Diferença ($p < 0,05$) entre os grupos controle e tratado.

A recuperação de larvas infectantes (L3) de nematoides gastrintestinais no grupo tratado teve uma redução de (9,19%) nas coproculturas em comparação ao controle ($p<0,05$) ao término do experimento (Tabela 1), semelhante a resultados encontrados por Silva et al. (2013). Porém, diferem ($p<0,05$) nos meses de março e junho do número de L3 recuperadas (Figura 3). Os gêneros *Haemonchus* spp. (54,26%) e (53,33%), *Cooperia* spp. (39,36%) e (33,33%), *Oesophagostomum* spp. (6,38 %) e (13,33%) ocorreram nos grupos tratado e controle, respectivamente. Estes resultados estão de acordo com Dias et al. (2007), Assis et al. (2012), Luns (2013), trabalhando na região sudeste do Brasil (Tabela 1). Também foi verificada diferença ($p<0,05$) no número de larvas (L3) dos gêneros *Haemonchus* spp. e *Oesophagostomum* spp. entre os grupos tratado e controle quando avaliados ao final do experimento (Tabela 1).

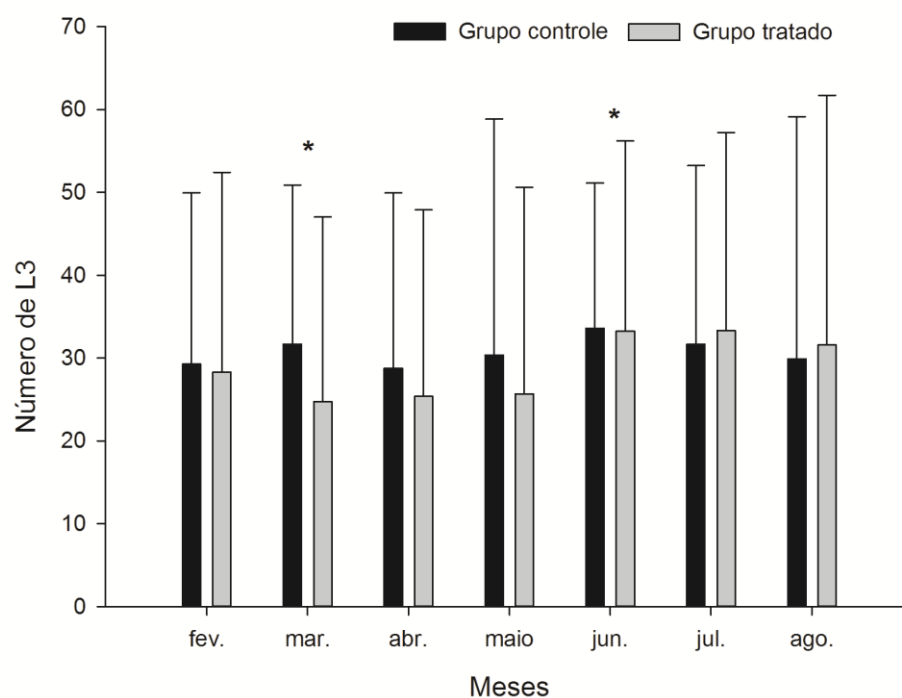


Figura 3. Média (\pm DP) de larvas infectantes (L3) recuperadas das coproculturas dos grupos controle e tratado os fungos nematófagos *Arthrobotrys robusta* e *Duddingtonia flagrans*. Fevereiro a agosto de 2012, Viçosa, Estado de Minas Gerais, sudeste do Brasil. * Diferença ($p<0,05$) entre os grupos controle e tratado.

Tabela 1. Média de larvas infectantes dos gêneros *Haemonchus* spp. (Haem.), *Cooperia* spp. (Coop.) e *Oesophagostomum* spp. (Oeso.) e (\pm DP) recuperadas das coproculturas dos grupos tratado com a associação dos fungos nematófagos *Arthrobotrys robusta* e *Duddingtonia flagrans* e controle. Fevereiro a agosto de 2012 em Viçosa, Estado de Minas Gerais, sudeste do Brasil.

	Grupo tratado				Grupo controle			
	Haem.	Coop.	Oeso.	Total	Haem.	Coop.	Oeso.	Total
Fevereiro	41	41	3	29	38	42	7	39
Março	28	38	8	25	38	45	13	32
Abril	36	30	11	26	42	32	13	29
Mai	36	31	11	26	57	23	11	30
Junho	37	53	9	33	33	53	15	34
Julho	33	58	9	33	31	54	10	32
Agosto	51	37	6	31	48	30	12	30
Médias	37a	41c	8d	29A	41b	40c	12e	32B
D.P.	7	11	3	3	9	12	2	3

Médias seguidas de uma mesma letra por linha não diferem ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey. Médias comparadas dos grupos tratado e controle dos mesmos gêneros de fungos (letras minúsculas) e médias totais (letras maiúsculas).

O número de larvas infectantes (L3), recuperadas por quilograma de matéria seca (kg/ MS) de amostras de pastagem coletadas até 20 cm dos bolos fecais diferiu ($p < 0,05$) nos valores médios totais e do gênero *Haemonchus* spp. de L3 entre os grupos tratado e controle (Tabela 2.A). Esses resultados foram semelhantes com o trabalho realizado por Luns (2013). Porém, as coletadas de 20 a 40 cm dos bolos fecais apresentaram diferenças (Tabela 2.B). O número total de larvas recuperadas por kg/ MS na distância de 0 a 20 cm dos bolos fecais no grupo tratado foi 36,21 % menor ($p < 0,05$), que o do grupo controle, demonstrando que os fungos atuaram na redução de larvas infectantes. Larvas nos grupos tratado e controle, respectivamente, dos gêneros de nematóides *Haemonchus* spp. (48,24%) e (44,95%), *Cooperia* spp. (38,97%) e (43,33%), *Oesophagostomum* spp. (12,19%) e (11,72%) foram também encontradas. A quantidade de L3 desses gêneros de nematóides nos piquetes dos grupos A e B foi semelhante ($p > 0,05$). Dessa forma, os fungos não atuaram de forma seletiva sobre as larvas desses gêneros, conforme verificado na região sudeste do Brasil (ASSIS et al., 2012).

Tabela 2. Média de larvas infectantes (\pm DP) dos gêneros *Haemonchus* (Haem.) spp., *Cooperia* (Coop.) spp. e *Oesophagostomum* (Oeso.) spp. por quilograma (kg) de matéria seca (MS) de pastagem obtidas de 0-20 cm (A) e 20-40 cm (B) de distância dos bolos fecais, manejadas com os bezerros tratados com a associação dos fungos nematófagos *Arthrobotrys robusta* e *Duddingtonia. flagrans* (grupo tratado) e sem fungos (grupo controle). Fevereiro a agosto de 2012 em Viçosa, Estado de Minas Gerais, sudeste do Brasil.

A

Pastagem obtida de 0-20 cm dos bolos fecais	Grupo controle				Grupo tratado			
	Haem.	Coop.	Oeso.	Total	Haem.	Coop.	Oeso.	Total
Fevereiro	17	11	0	9	37	25	25	29
Março	150	117	50	106	129	139	31	100
Abril	47	50	10	36	107	89	54	83
Maiο	72	38	7	39	56	50	6	37
Junho	38	100	13	50	129	70	15	71
Julho	5	7	1	4	35	73	3	37
Agosto	22	28	0	17	52	73	19	48
Médias	52a	53c	12d	37A	81b	78c	21d	58B
D.P.	49	43	18	35	42	35	17	27

Médias seguidas de, pelo menos, uma mesma letra por linha não diferem em nível de 5% de significância pelo teste de Tukey. As médias comparadas são dos grupos tratado e controle por gêneros (letras minúsculas) e médias totais (letras maiúsculas).

B

Pastagem obtida de 20-40 cm dos bolos fecais	Grupo tratado				Grupo controle			
	Haem.	Coop.	Oeso.	Total	Haem.	Coop.	Oeso.	Total
Fevereiro	11	0	17	9	33	22	0	18
Março	117	67	34	73	88	77	15	60
Abril	70	44	31	48	67	50	25	47
Maiο	31	13	0	15	50	42	0	31
Junho	23	14	0	12	7	40	0	16
Julho	6	4	2	4	15	33	4	17
Agosto	15	11	0	9	47	39	16	34
Médias	41a	23b	11c	25A	44a	45b	9c	33A
D.P.	40	24	15	26	28	17	10	17

Médias seguidas de, pelo menos, uma mesma letra por linha não diferem em nível de 5% de significância pelo teste de Tukey. As médias comparadas são dos grupos tratado e controle por gêneros (letras minúsculas) e médias totais (letras maiúsculas).

Temperaturas ideais para o desenvolvimento de nematóides gastrintestinais estão na faixa de 20° e 30°C (O'CONNOR et al., 2006). A temperatura média variou próxima

a esses valores no período experimental. Mesmo em épocas secas, a umidade do bolo fecal permite o desenvolvimento das larvas infectantes de nematóides gastrintestinais de bovinos e baixos índices de precipitação são suficientes para permitir a migração dessas larvas para a pastagem (LIMA et al., 1985). A presença de larvas nas pastagens foi verificada durante todo o período experimental devido às condições climáticas (Figura 1). Reduções significativas de larvas L3 nas pastagens foram observadas fornecendo fungos nematófagos, isoladamente, a bovinos (JOBIM et al. 2008; ASSIS et al. 2012). Porém, o mesmo resultado não foi verificado utilizando os isolados AC001 e I31 associados, visto que, não houve diferença ($p>0,05$) no número total de L3 recuperadas por quilograma de matéria seca de pastagem entre os grupos tratado e controle ao final do experimento, em conformidade com Luns (2013).

4. CONCLUSÃO

O tratamento de bezerros mestiços Holandês-Zebu no sudeste do Brasil com massa micelial dos isolados fúngicos *A. robusta* (I31) e *D. flagrans* (AC001) associados em péletes de alginato de sódio por vinte e seis semanas reduziu ($p<0,05$) o OPG e o número de larvas infectantes recuperadas das coproculturas. Contudo, isto não foi verificado para a recuperação de L3 por quilograma de matéria seca das pastagens. Assim, os fungos *D. flagrans* e *A. robusta* não controlaram os helmintos parasitos de bovinos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARANTE, A. F. T.; PADOVANI, C. R.; BARBOSA, M. A. Contaminação de pastagens por larvas de nematoides gastrintestinais parasitos de bovinos e ovinos em Botucatu-SP. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 5, n. 2, p. 65-73, 1996.

ARAÚJO, J. V.; STEPHANO, M. A.; SAMPAIO, W. M. Effects of temperature, mineral salt and passage through the gastrointestinal tract of calves on sodium alginate formulation of *Arthrobotrys robusta* - a nematode-trapping fungus. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 9, n. 1, p. 55-60, 2000.

ARAÚJO, J. V.; MOTA, M. A.; CAMPOS, A. K. Controle biológico de helmintos parasitos de animais por fungos nematófagos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Seropédica-RJ, v. 13, p. 165-170, 2004.

ARAÚJO, J. V. et al. Efeito antagônico de fungos predadores dos gêneros *Monacrosporium*, *Arthrobotrys* e *Duddingtonia* sobre larvas infectantes de *Cooperia* sp. e *Oesophagostomum* sp. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 3, p. 373-380, 2006.

ARIAS, M. S. et al. Trematodes enhance the development of the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys (Duddingtonia) flagrans*. **Fungal Biology**, v. 117, p. 540-544, 2013.

ASSIS, R. C. L.; LUNS, F. D.; ARAÚJO, J. V.; BRAGA, F. R. Biological control of trichostrongyles in beef cattle by the fungus *Duddingtonia flagrans* in alginate pellets formulation under natural grazing conditions in Brazil. **Experimental Parasitology**, v. 122, p. 373-377, 2012.

COLES, G. C. Cattle nematodes resistant to anthelmintics: why so few cases? **Veterinary Research**, v. 33, p. 481-489. 2002.

DIAS, A. S. et al. Application of a formulation of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* in the control of cattle gastrointestinal nematodioses. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v. 28, p. 1000-1007, 2007.

DIMANDER, S. O. et al. Evaluation of gastrointestinal nematode parasite control strategies for first-season grazing cattle in Sweden. **Veterinary Parasitology**, v. 111, p. 192-209, 2003.

FITZ-ARANDA, J. A. et al. *Duddingtonia flagrans* chlamydospores in nutritional pellets: effect of storage time and conditions on the trapping ability against *Haemonchus contortus* larvae. **Journal of Helminthology**, v. 16, p. 1-6, 2013.

FLOATE, K.D. Endectocide use in cattle and fecal residues: environmental effects in Canada. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 70, p. 1-10, 2006.

FORBES, A. B. Sub-clinical parasitism in spring-born, beef suckler calves: epidemiology and impact on growth performance during the first grazing season. **Veterinary Parasitology**, v. 104, p. 339-344, 2002.

GORDON, H. M.; WHITLOCK, H. V. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. **Journal of the Council for Scientific Industrial Research**, v. 12, 1, p. 50-52, 1939.

JOBIM, M. B.; SANTURIO, J. M.; DE LA RUEI, M. L. *Duddingtonia flagrans*: controle biológico de nematodeos de bovinos a campo. **Ciência Rural**, v. 38, n. 8, p. 2256-2263, 2008.

KAPLAN, R. M. Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. **Trends in Parasitology**, v. 20, p. 477-481, 2004.

KEITH, R. K. The differentiation on the infective larvae of some common nematode parasites of cattle. **Australian Journal of Zoology**, v. 1, n. 2, p. 223-235, 1953.

LIMA, W. S.; GUIMARÃES, M. P.; LEITE, A. C. R. Custo benefício de diferentes dosificações anti-helmínticas em relação ao ganho de peso de bezerros de corte. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 20, n. 11, p. 1333-1355, 1985.

LIMA, W. S. Dinâmica das populações de nematoides parasitos gastrintestinais em bovinos de corte, alguns aspectos da relação parasito-hospedeiro e do comportamento dos estádios de vida livre na região do Vale do Rio Doce, MG, Brasil. 1989. 178f. Tese (Doutorado) - Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 1989.

LUNS, F. D. Avaliação da interação entre os isolados fungicos *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium* e *Arthrobotrys robusta* no controle biológico de nematóides gastrintestinais de bovinos leiteiros a campo. 2013. 39f. Dissertação (Mestrado) Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2013.

MEJÍA, M. E., et al. Multispecies and multiple anthelmintic resistance on cattle nematodes in a farm in Argentina: the beginning of high resistance? **Veterinary Research**, v. 34, p. 461-467, 2003.

MELLO, M. H. A. et al. Resistência lateral às macrolactonas em nematodas de bovinos. **Archives of Veterinary Science**, v. 11, n. 1, p. 8-12, 2006.

MENDOZA-DE-GIVES, P., et al. Predatory behaviour of trapping fungi gainst of srf mutants of *Caenorhabditis elegans* and different plant and animal parasitic nematodes. **Parasitology**, v. 119, p. 95-104, 1999.

MENDOZA-DE-GIVES P., TORRES-ACOSTA F. Biotechnological use of fungi in the control of ruminant parasitic nematodes. In: Arias MS, Paz-Silva A. (eds) Fungi: types, environmental impact and role in disease. **Nova Editorial**, New York, p. 389-408. 2012.

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

O’CONNOR, L. J.; WALKDEN-BROWN, S. W.; KAHN, L. P. Ecology of the free living stages of major trichostrongylid parasites of sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 142, p. 1-15, 2006.

PAZ-SILVA, A., et al. Ability of the fungus *Duddingtonia flagrans* to adapt to the cyathostomin egg-ou-tput by spreading chlamydozoospores. Equine Diseases Study Group (Epidemiology, Parasitology and Zoonoses). **Veterinary Parasitology**, v. 179(1-3), p. 277-282, 2011.

SILVA, M. E. et al. Control of infective larvae of gastrointestinal nematodes in heifers using different isolates of nematophagous fungi. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, p. 78-83, 2013.

SILVA, M. E. et al. Evaluation of the effectiveness of *Duddingtonia flagrans* and *Monacrosporium thaumasium* in the biological control of gastrointestinal nematodes in female bovines bred in the semiarid region. **Veterinary Research Communications**. 37, 1-10, 2014.

PERRI, A. F. et al. Gastrointestinal parasites presence during the peripartum decreases total milk production in grazing dairy Holstein cows. **Veterinary Parasitology**, v. 178, p. 311-318, 2011.

TAVELA, A. O.; ARAÚJO, J. V.; BRAGA, F. R. Coadministration of sodium alginate pellets containing the fungi *Duddingtonia flagrans* and *Monacrosporium thaumasium* on cyathostomin infective larvae after passing through the gastrointestinal tract of horses. **Research in Veterinary Science**, v. 94, p. 568-572, 2013.

WALKER, H. L.; CONNICK, W. J. Sodium alginate for production and formulation of mycoherbicides. **Weed Science**, v. 31, p. 333-338, 1983.