

LARISSA CRISTINA ARAÚJO

**UTILIZAÇÃO DO PRODUTO RESIDUAL DA INDÚSTRIA DE COGUMELOS
PARA CONTROLE DE FITONEMATÓIDES**

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

Orientador: José Humberto de Queiróz

Coorientador: Maximiller Dal-Bianco Lamas Costa

**VIÇOSA – MINAS GERAIS
2022**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

A663
2022

Araújo, Larissa Cristina, 1997-

Utilização do produto residual da indústria de cogumelos para controle de fitonematoides / Larissa Cristina Araújo. – Viçosa, MG, 2022.

1 dissertação eletrônica (58 f.): il.

Orientador: José Humberto de Queiróz.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, 2022.

Referências bibliográficas: f. 47-58.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.721>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Nematóide-das-galhas - Controle biológico. 2. Fungos nematófagos. 3. Resíduos industriais. 4. Cogumelos - Indústria. I. Queiróz, José Humberto de, 1958-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada. III. Título.

CDD 22. ed. 592.57

Bibliotecário(a) responsável: Alice Regina Pinto Pires CRB-6/2523

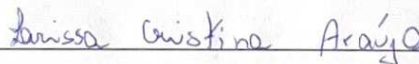
LARISSA CRISTINA ARAÚJO

UTILIZAÇÃO DO PRODUTO RESIDUAL DA INDÚSTRIA DE COGUMELOS
PARA CONTROLE DE FITONEMATOIDES

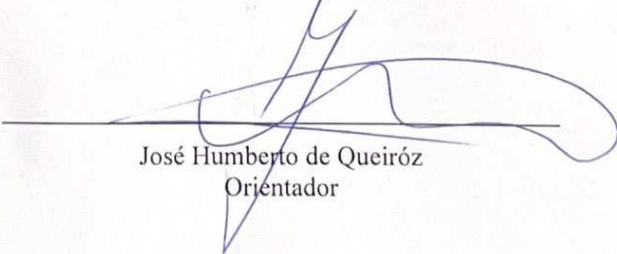
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 31 de agosto de 2022

Assentimento:



Larissa Cristina Araújo
Autora



José Humberto de Queiróz
Orientador

*Aos meus pais e meu irmão, por todo apoio e amor
Dedico.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à Deus, pela proteção e por me proporcionar tantas oportunidades incríveis. Sem Ele eu nada seria.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, pela infraestrutura e oportunidade de realização do Mestrado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento do projeto de pesquisa.

Aos meus pais Maria Aparecida e José Ivaldo, que incondicionalmente me deram todo amor e carinho durante esses anos. Vocês são o reflexo do que eu almejo ser!

Ao meu irmão Vitor, por todo companheirismo.

A todos os meus familiares, que sempre estiveram ao meu lado e acreditaram em meu potencial.

Ao meu orientador, José Humberto, pela oportunidade, ensinamentos e amizade.

Aos membros da banca, pelas contribuições no trabalho.

Ao Jean, por todo amor, carinho e companheirismo. Obrigada por tornar minha vida mais leve.

À Isa, Dri, Clara e Walter por toda força durante esses anos, sem vocês minha caminhada não estaria completa.

À republica SerAfim, que me ensinou o significado de união.

Aos meus amigos de Viçosa e João Monlevade, por todas as risadas e momentos insubstituíveis, vocês foram fundamentais para eu estar aqui hoje.

À Julia, pela amizade e auxílio nos experimentos.

Ao Núcleo de Análise de Biomoléculas da Universidade Federal de Viçosa pela análise por LC/MS.

Ao Grupo Urakami, pelos fornecimentos dos cogumelos comestíveis.

A todos que de alguma forma fizeram parte da minha formação pessoal e acadêmica.

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”.

Cora Coralina

RESUMO

ARAÚJO, Larissa Cristina, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2022. **Utilização do produto residual da indústria de cogumelos para controle de fitonematoides.** Orientador: José Humberto de Queiróz. Coorientador: Maximiller Dal-Bianco Lamas Costa.

Os fitonematoides causam enormes perdas econômicas na agricultura. Os danos causados por esses parasitas podem ser facilmente confundidos com outras causas, levando ao diagnóstico tardio da patologia e comprometimento de grande parte da plantação. A estratégia mais utilizada para controlar os fitonematoides é pelo uso de nematicidas. Entretanto, o uso dessas substâncias sintéticas pode causar prejuízos ao meio ambiente e à saúde humana. Nesse contexto, os fungos nematófagos surgem como uma alternativa promissora, sem impactos ambientais e inócuos aos seres humanos. O efeito nematicida desses fungos se dá pelo uso de suas hifas, esporos ou dispositivos especiais de ataque para parasitarem os fitonematoides, como também, ação enzimática e produção de metabólitos com efeitos nematicidas ou nematostáticos. Estudos recentes conduzidos pelo nosso grupo de trabalho mostraram que resíduos agroindustriais da produção de cogumelos apresentam um grande potencial nematostático. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade nematostática de resíduos oriundos da produção de cogumelos comestíveis sobre juvenis dos nematoides de maior relevância para a agricultura brasileira: *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne javanica*, e o nematoide modelo, *Panagellus redivivus*. Os compostos de cogumelos foram cedidos pelo Grupo Urakami, sendo esses: *Hypsizygus marmoreus*, *Lentinula edodes*, *Pleurotus ostreatus*, *Flammulina velutipes*, *Pleurotus spp.* e *Pleurotus eryngii*. Já os juvenis dos fitonematoides foram obtidos de raízes de sojas infectadas. Para avaliar atividade nematostática os juvenis foram testados com o extrato bruto de cada fungo avaliando-se sua taxa mortalidade, motilidade e degradação de cutícula. Para identificar os compostos com potencial nematicida, cada extrato bruto foi submetido a ultrafiltração, extração líquido-líquido à baixa temperatura e espectrometria de massas. Como resultado foi possível constatar que os resíduos dos fungos *Lentinula edodes* e *Pleurotus ostreatus* são eficientes em paralisar os juvenis de *M. incognita* e *M. javanica*, tanto para os extratos fervidos quanto para os extratos não fervidos, indicando que os compostos responsáveis pelo efeito nematostático são moléculas termorresistentes. Para o nematoide modelo, *P. redivivus*, esse efeito nematostático foi menor quando comparado aos fitonematoides. Não foi possível isolar os compostos com ação nematostática, sendo necessária aplicação de novas técnicas para a identificação dessas moléculas.

Palavras-chave: *Meloidogyne*. Atividade nematostática. Resíduos fúngicos.

ABSTRACT

ARAÚJO, Larissa Cristina, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2022. **Use of the residual product from mushroom industry to control phytonematodes.** Adviser: José Humberto de Queiróz. Co-adviser: Maximiller Dal-Bianco Lamas Costa.

Phytonematodes cause enormous economic losses in agriculture. The damage caused by these parasites can be easily confused with other causes, leading to late diagnosis of the pathology and compromising a large part of the plantation. The most used strategy to control phytonematodes is the use of nematicides. However, the use of these synthetic substances can cause harm to the environment and human health. In this context, nematophagous fungi emerge as a promising alternative, without environmental impacts and harmless to humans. The nematocidal effect of these fungi is due to the use of their hyphae, spores, or special attack devices to parasitize phytonematodes, as well as enzymatic action and production of metabolites. Recent studies conducted by our working group have shown that agro-industrial residues from mushroom production have great nematostatic potential. Thus, the objective of this work was to evaluate the nematostatic activity of residues from the production of edible mushrooms on juveniles of the most important nematodes for Brazilian agriculture: *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne javanica*, and the model nematode, *Panagellus redivivus*. The mushroom compounds were provided by the Urakami Group, as follows: *Hypsizygus marmoreus*, *Lentinula edodes*, *Pleurotus ostreatus*, *Flammulina velutipes*, *Pleurotus sp.*, and *Pleurotus eryngii*. The juveniles of the phytonematodes were obtained from infected soybean roots. To evaluate nematostatic activity, juveniles were tested with the crude extract of each fungus, evaluating its mortality rate, motility, and cuticle degradation. To identify compounds with nematicidal potential, each crude extract was subjected to ultrafiltration, liquid-liquid extraction at low temperature, and mass spectrometry. As a result, it was possible to verify that the residues of the fungi *Lentinula edodes* and *Pleurotus ostreatus* are efficient in paralyzing the juveniles of *M. incognita* and *M. javanica*, both for the boiled extracts and for the non-boiled extracts, indicating that the compounds responsible for the nematostatic effect are heat-resistant molecules. For the model nematode, *P. redivivus*, this nematostatic effect was lower when compared to phytonematodes. It wasn't possible to isolate the compounds with nematostatic action, requiring the application of new techniques to identify these molecules.

Keywords: *Meloidogyne*. Nematostatic activity. Fungal residues.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	10
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
	2.1 Nematoides	12
	2.2 Controle de fitonematoides.....	17
	2.3 Fungos Nematófagos.....	19
	2.4 Basidiomicetos.....	21
3	OBJETIVOS	24
	3.1 Objetivos gerais	24
	3.2 Objetivos específicos.....	24
4	METODOLOGIA	25
	4.1 Obtenção dos resíduos fúngicos	25
	4.2 Produção dos extratos brutos fúngicos.....	25
	4.3 Obtenção dos juvenis de <i>Meloidogyne</i>	25
	4.4 Obtenção e cultivo dos juvenis de vida livre	26
	4.5 Atividade nematostática dos extratos brutos	26
	4.6 Atividade nematostática em diferentes diluições dos extratos brutos	26
	4.7 Fracionamento dos extratos brutos.....	27
	4.7.1. Ultrafiltração.....	27
	4.7.2. Extração líquido-líquido em baixa temperatura	27
	4.7.3. Espectrometria de massas.....	27
	4.8 Análises estatísticas	28
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	29
	5.1 Atividade nematostática dos extratos brutos sobre juvenis de <i>Meloidogyne incognita</i>	29
	5.2 Atividade nematostática dos extratos brutos sobre juvenis de <i>Meloidogyne javanica</i>	33
	5.3 Atividade nematostática dos extratos brutos sobre juvenis de <i>Panagrellus redivivus</i>	36
	5.4 Atividade nematostática em diferentes diluições dos extratos brutos	38
	5.5 Fracionamento dos extratos brutos.....	40
	5.5.1 Ultrafiltração.....	40
	5.5.2 Extração líquido-líquido em baixa temperatura.....	42
	5.5.3 Espectrometria de massas	44
6	CONCLUSÃO	46
7	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	47

1

INTRODUÇÃO

Os nematoides parasitas de plantas, conhecidos também como fitonematoides, são responsáveis por grandes perdas econômicas na agricultura. Estima-se que os prejuízos anuais sejam em média de US\$100 a 150 bilhões em todo o mundo (LEIVA *et al.*, 2020). Um dos principais desafios que os agricultores enfrentam no controle desses parasitas é determinar sua presença no solo. Grande parte dos danos causados pelos nematoides se confundem com outras causas, como o estresse hídrico ou distúrbios fisiológicos. Assim, no momento em que a patologia é diagnosticada, grande parte da plantação já foi comprometida (ABD-ELGAWAD *et al.*, 2018).

Uma das formas de controlar esses patógenos é através do controle químico, com o uso de nematicidas. No entanto, o uso dessas substâncias traz consequências adversas e limita seu uso, devido aos riscos ambientais e à saúde humana. Além disso, os nematicidas apresentam altos custos e disponibilidade limitada em países em desenvolvimento. Dessa forma, novas alternativas para o controle desses parasitas têm ganhado força, destacando-se o controle biológico (AKHTAR *et al.*, 2000).

O controle biológico consiste na utilização de antagonistas naturais de nematoides para controlar esses parasitas. Esse é um método sem impacto ambiental e para a saúde humana, não deixando resíduos em solos e alimentos (SOARES, 2006).

Dentre os antagonistas de nematoides, os fungos nematófagos se destacam. Esses fungos apresentam diferentes estratégias para predação dos nematoides, como utilização de suas hifas ou esporos, ação enzimática, produção de metabólitos e utilização de dispositivos especiais de ataque (SOARES *et al.*, 2018).

Esses fungos possuem representantes em todos os filos do Reino *Fungi*. Dentre eles, os cogumelos comestíveis, representantes do filo *Basidiomycota*, têm ganhado destaque. Os cogumelos comestíveis são amplamente comercializados pelo mundo e são inócuos aos seres humanos. Além disso, o produto residual obtido no final de seu processo de produção é rico em várias substâncias químicas e micélio, apresentando grande potencial para ser utilizado como produto para controle biológico (FERREIRA *et al.*, 2019).

Portanto, é notória a necessidade de uma estratégia para o manejo de fitonematoides que seja benéfica para o ambiente e para a saúde humana. Assim, o objetivo desse trabalho é avaliar o potencial nematostático de extratos de basidiomicetos a fim de ser utilizado como um produto para controle desses parasitas.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Nematoides

Os nematoides são vermes cilíndricos que compõem um grupo diversificado de organismos invertebrados. O formato de seu corpo é definido como filiforme (fusiforme), embora possam existir variações em algumas espécies de fêmeas maduras, com formatos aberrantes. Esses organismos são abundantes e encontrados em diferentes habitats, como o solo e ambientes aquáticos, sejam eles de água doce ou marinha (OLIVEIRA *et al.*, 2018).

Dentre os representantes desse grupo estão presentes nematoides benéficos, que desempenham importante papel ecológico e são responsáveis pela reciclagem de nutrientes, carbono e compostos nitrogenados, como também, nematoides que parasitam plantas ou animais (BARKER, 1998; BLAKELY *et al.*, 2002).

Diversos fatores e mudanças ambientais podem afetar a sobrevivência dos nematoides, principalmente a falta de umidade em seu habitat. Dessa forma, o solo torna-se um ambiente de proteção contra a desidratação, para essas espécies. O mesmo ocorre com os parasitas de raízes de plantas ou animais, que usam o organismo do hospedeiro como proteção. Além disso, esses organismos possuem outras estratégias para se adaptarem a adversidades (MCSORLEY, 2003).

A quiescência é uma das adaptações que algumas espécies de nematoides fazem para manter sua sobrevivência, sendo esse um estado de redução temporária de desenvolvimento e crescimento diante de estresse ambiental. Em casos de extensos períodos de quiescência, a taxa metabólica pode atingir níveis extremamente baixos. Esta condição extrema é chamada de criptobiose, no qual o nível do metabolismo pode passar de 75-85% à 2-5% (RITZINGER *et al.*, 2010).

O ciclo de vida dos nematoides também está ligado às adaptações desses organismos para sobreviver a condições de estresse ambiental. O seu ciclo de vida geralmente é dividido em ovo, quatro estados juvenis (J1, J2, J3 e J4) e a fase adulta. Entre cada estágio do ciclo ocorre o processo de ecdises, no qual uma nova cutícula é formada para substituir a anterior. Em locais com condições desfavoráveis para seu crescimento e desenvolvimento, os nematoides conseguem prolongar o estágio de seu ciclo de vida a fim de alcançar sua

sobrevivência. Esse fenômeno é conhecido como diapausa, e possui maior incidência no estágio de ovo e estágio juvenil ainda dentro do ovo. Algumas espécies promovem a troca de cutícula ainda dentro do ovo, mantendo essa cutícula trocada aderida a nova, servindo como um mecanismo de proteção até a próxima troca. (RITZINGER *et al.*, 2010).

Os nematoides podem ser classificados em três grupos a partir das suas condições alimentares: os zooparasitas ou parasitas de animais, os de vida livre e os parasitas de plantas ou fitonematoides. Os zooparasitas é o grupo mais conhecido pelo público leigo, podendo se estabelecer em hospedeiros vertebrados ou invertebrados, acarretando danos diretos a esses animais, como no sistema digestório, respiratório, entre outros. Os nematoides de vida livre são pouco conhecidos, mas desempenham um papel extremamente importante na ciclagem de carbono e nutrientes e são fundamentais para a fertilidade do solo e produtividade agrícola. Por último, os fitonematoides, que são responsáveis por grandes prejuízos a agricultura. Esses organismos se alimentam de tecidos vegetais, especialmente as raízes de plantas, para sobreviver (FERRAZ *et al.*, 2016).

O sistema digestório dos nematoides é dividido em três partes. A primeira é composta pela cavidade bucal e esôfago. A segunda por grande parte do intestino. E a última pela parte final do intestino, o reto e o ânus. Na cavidade bucal dos fitonematoides encontra-se o estilete, órgão responsável por liberar secreções enzimáticas nas células vegetais. Devido à presença do estilete, os fitonematoides pré-digerem os nutrientes, reduzindo assim a atividade do intestino e apresentando reto e ânus pouco evidente. O mesmo não acontece com os nematoides de vida livre, onde a maior parte de sua digestão se dá no intestino, resultando em um reto e ânus mais pronunciados devido à sua intensa função (LEE, 2002; FERRAZ *et al.*, 2016).

Atualmente, as espécies de fitonematoides que mais causam danos econômicos a agricultura são os gêneros *Meloidogyne sp.*, conhecidos como nematoides das galhas, os *Heterodera sp.* e *Globodera sp.*, conhecidos como nematoides globulares ou de cisto e *Pratylenchus sp.*, conhecido como nematoides de lesão radicular. Esses nematoides são classificados como endoparasitas e apresentam comportamentos diferentes depois que se estabelecem no hospedeiro. Os gêneros *Meloidogyne sp.*, *Heterodera sp.* e *Globodera sp.* após iniciarem o parasitismo na planta tornam-se sedentários obrigatórios. Já o gênero *Pratylenchus spp.* apresentam-se em formas migradoras durante todo o período de seu ciclo de vida (JONES *et al.*, 2013).

No gênero *Meloidogyne sp.* as espécies *Meloidogyne incognita* e *Meloidogyne javanica* são as mais relevantes e que causam os maiores danos econômicos. Os juvenis desse gênero movimentam-se no solo em busca de um hospedeiro favorável. A percepção de onde a planta

hospedeira está localizada depende de uma série de fatores. Alguns compostos orgânicos e inorgânicos excretados pelas raízes e acumulados em suas superfícies são atrativos para esses fitonematoides. Outro fator atrativo é o dióxido de carbono, que é considerado uma das referências mais importantes para os nematoides das galhas para determinar a localização do hospedeiro (CORREIA *et al.*, 2017).

Após encontrar o hospedeiro e penetrar em suas raízes, esses organismos migram ao longo do córtex até encontrarem o local de alimentação permanente. Esse processo origina as células nutridoras ou gigantes, que são responsáveis por viabilizar o sustento daquele juvenil, oferecendo nutrientes até a sua fase adulta (DUBREUIL *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2008).

Na fase adulta, os machos não parasitam o hospedeiro e apresentam o formato de seu corpo em filiforme. As fêmeas, por outro lado, permanecem na planta e assumem forma aberrante, um formato de pera de coloração branca e iniciam a produção de seus ovos. A fêmea coloca seus ovos em uma matriz gelatinosa que é produzida e secretada na superfície da raiz e é responsável por proteger os ovos até sua eclosão (SIDDIQUE *et al.*, 2018).

O sítio de alimentação formado pelas células nutridoras passa a formar um tecido diferenciado, chamado de cenócito. Essas células vegetais sofrem o processo de hipertrofia, que é o aumento da célula, e hiperplasia, que é o aumento do número de células, originando as galhas. Assim, ocorre uma mobilização dos nutrientes que seriam utilizados pela planta, para manter o desenvolvimento e crescimento do nematoide (WILLIAMSON *et al.*, 2003; VANHOLME *et al.*, 2004).

O sistema defensor da planta hospedeira inicia sua resposta ao ataque dos nematoides em média 12 horas após a penetração. A planta começa a produzir espécies reativas de oxigênio (ERO), moléculas altamente instáveis e reativas. Para suprimir a defesa do hospedeiro, os nematoides produzem enzimas antioxidantes. Essas enzimas são responsáveis por protegerem os fitonematoides dos danos causados por essas espécies reativas e da desintoxicação das substâncias geradas (CORREIA *et al.*, 2017).

As galhas são uma resposta ao processo parasitário e geralmente aparecem dois a três dias após a penetração do juvenil. Há diversos tipos de galhas, apresentando diferenças em suas formas e tamanhos. Em determinados casos, as galhas são pequenas e pouco evidentes. Nessas situações, o diagnóstico pode se tornar bem mais complexo, necessitando de equipamentos adicionais para realizar sua visualização, mesmo na presença de parasitismo severo. Já em outros casos, as galhas apresentam-se de forma bem visível e de grande dimensão. De forma geral, os representantes do gênero *Meloidogyne sp.* apresentam galhas evidentes, o que facilita a identificação do processo parasitário dessas espécies (FERRAZ *et al.*, 2016).

A formação de galhas não é o único indício para identificação do processo de infecção por *Meloidogyne sp.* em plantas. Em algumas espécies, ocorrem danos ao sistema radicular do hospedeiro, fazendo com que as raízes fiquem muito finas, o que afeta diretamente a absorção de água e nutrientes. Outro sintoma que pode evidenciar o parasitismo por *Meloidogyne sp.* é o tamanho das plantas, que quando atacadas ficam bem menores que as plantas saudáveis (GUEDIRA *et al.*, 2004).

Os nematoides de cisto, *Heterodera sp.* e *Globodera sp.*, também são importantes representantes no grupo de fitonematoides. O seu ciclo de vida se assemelha bastante com o ciclo do gênero *Meloidogyne sp.*, promovendo a formação do sitio de alimentação. No entanto, o tecido nutridor recebe o nome de sincício (VARANDAS *et al.*, 2020).

Os juvenis de segundo estágio (J2) infectam a planta hospedeira pela ponta de sua raiz. Após a infecção, os juvenis migram em direção as camadas internas do córtex, perfurando as células à medida que passam. No momento que os juvenis atingem essas camadas internas, eles iniciam sua busca pela célula sincicial inicial e, uma vez encontrada, inserem seu estilete na célula e liberam secreções e proteínas efetoras para dar início a formação do sitio de alimentação. O sincício é uma célula multinucleada, formada pela dissolução das paredes celulares das células próximas a célula sincicial inicial e fusão de seus protoplastos (HAEGEMAN *et al.*, 2012).

Os nematoides de cisto não ocasionam o processo de hipertrofia ou hiperplasia, evitando a formação das galhas. Dessa maneira, as representantes fêmeas desses fitonematoides, na fase adulta, rompem as raízes e expõem o seu corpo para fora, que assume o formato esférico, de coloração branca ou amarelada, permanecendo presas somente pela região esofagiana. (OLIVEIRA *et al.*, 2008; VARANDAS *et al.*, 2020)

As fêmeas dos nematoides de cistos portam grande parte de seus ovos no útero, chegando a reter 80 a 90% deles. Cada fêmea pode carregar em média cerca de 200-600 ovos. Esse mecanismo é responsável por causar a sua morte, no qual sua coloração externa muda de branco para marrom e sua cutícula se torna mais rígida, originando o cisto. O cisto serve como uma estrutura de proteção para os ovos, evitando os danos causados por estresse ambiental. Eles podem fornecer anos de proteção, e os juvenis infectantes só abandonam essa estrutura no momento que as condições ambientais se encontram favoráveis e a partir da presença da planta hospedeira (FEIST *et al.*, 2020; WILLIAMSON *et al.*, 2003).

Os representantes machos se assemelham ao do gênero *Meloidogyne sp.* que são filiformes. Eles permanecem na raiz da planta somente até a fase adulta, após esse estágio, eles migram pelo solo e fertilizam as fêmeas. Há indícios que os machos são atraídos por feromônios

liberados pelas fêmeas. Além disso, uma mesma fêmea pode ser fecundada por machos diferentes, como o caso da espécie *Heterodera glycines*. Esse fenômeno é responsável por aumentar o grau de variabilidade genética em um mesmo cisto (TRANTAPHYLLOU *et al.*, 1990; OLIVEIRA *et al.*, 2008).

Os nematoides de cisto também causam sintomas na parte aérea das plantas, evidenciado pelo mau crescimento das mesmas. Os sistemas radiculares também podem apresentar danos, prejudicando a obtenção de nutrientes e água pela planta. Em algumas espécies pode ocorrer o murchamento em determinados períodos do dia, principalmente nas horas mais quentes (FERRAZ *et al.*, 2016).

Por fim, o grupo de nematoides de lesões radiculares, onde se encontram os nematoides do gênero *Pratylenchus sp.* Esses organismos são migratórios em todo seu estágio de vida móvel (J2 a J4 e adultos). Seu ciclo de vida dura em média de 3 a 8 semanas, dependendo da espécie e das condições ambientais. Após seu desenvolvimento para a fase J1, que ocorre dentro do ovo, ele se desenvolve para J2 e eclode. Suas fêmeas depositam os ovos na própria raiz infectada ou no solo (JONES *et al.*, 2013; ALI *et al.*, 2017).

Várias espécies de *Pratylenchus sp.* desenvolveram respostas às mudanças nas condições ambientais que podem ocorrer em seu habitat. Uma delas é a anidrobiose, um estado caracterizado pela redução de seu metabolismo, alimentação e movimentação. Esse estado é consequência do estresse causado por baixa umidade. Além disso, sob condições de seca, esses nematoides se enrolam para reduzir sua superfície de contato corpo-solo (RIBEIRO *et al.*, 2020).

Os representantes juvenis e adultos de *Pratylenchus sp.* infectam repetidamente as raízes de seu hospedeiro. Eles penetram pela epiderme do tecido vegetal e viajam ao longo do córtex, movendo-se de célula em célula. Após o processo parasitário, as células entram em colapso e apresentam largas cavidades. Assim, as raízes infectadas apresentam lesões, áreas necróticas, morte celular e podridão radicular por ataque secundário de fungos e bactérias presentes no solo. Além disso, as raízes assumem a coloração escurecida devido às lesões necróticas presentes (GOULART, 2008; MOENS *et al.*, 2009).

O dano apresentado pelas raízes é um importante indicador do parasitismo de *Pratylenchus sp.* Áreas escuras e sistemas radiculares reduzidos são sinais da presença desses organismos. Esse dano ocorre devido à alimentação, movimentação e liberação de efetores, enzimas e toxinas. Além disso, esses fitonematoides também podem apresentar sintomas semelhantes aos nematoides de galha e cisto na parte aérea, como crescimento inferior a plantas saudáveis e murchamento nas horas mais quentes do dia (GOULART, 2008; FERRAZ *et al.*, 2016).

É necessário ressaltar que nenhum dos sintomas listados acima é exclusivo das infecções por nematoides. A maioria desses sintomas pode estar relacionada a outras causas, não necessariamente ao parasitismo desses organismos. Portanto, para identificar corretamente as infestações de nematoides, é necessário realizar análises de solo para realmente confirmar que as evidências encontradas são causadas por essas espécies. Dessa maneira, devido a essa dificuldade em diagnosticar a doença, os ataques por nematoides são percebidos quando há um alto nível de parasitismo, resultando em grandes perdas na produção e prejuízos econômicos no setor agrícola (FERRAZ *et al.*, 2016).

2.2 Controle de fitonematoides

Os fitonematoides são pragas responsáveis por grandes prejuízos econômicos ao setor agrícola. Segundo a Sociedade Brasileira de Nematologia (SBN), o agronegócio no Brasil sofre anualmente prejuízos econômicos em torno de R\$35 bilhões, só na produção da soja as perdas são em torno de R\$ 16,2 bilhões de reais (FLEMING *et al.*,2016; SBN, 2015).

Atualmente, quase todas as espécies de planta sofrem parasitismo por pelo menos uma espécie de fitonematoide. Em alguns casos, elas são hospedeiras de mais de uma espécie desses fitoparasitas. Dentre as formas mais comuns para controlar esses patógenos temos o uso de nematicidas. Entretanto, devido a sua alta toxicidade, a utilização desse controle químico acarreta grandes danos ao meio ambiente, sendo prejudiciais as espécies benéficas presentes no solo, à vida selvagem e à vida humana (FERRAZ *et al.*,2008).

O dissulfeto de carbono foi o primeiro agente químico registrado com propriedades nematicidas. O início de sua utilização é datado de 1881, período conhecido como o estabelecimento do uso de controle químico para o controle de fitonematoides. Outro produto químico com propriedade nematicida foi o brometo de metila. Começou a ser utilizado no início da década de 1940 e já foi o nematicida mais utilizado nos Estados Unidos. Atualmente, seu uso foi extinto pelo Protocolo de Montreal em países desenvolvidos, pois foi classificado como substância destruidora da camada de ozônio Classe I (EBONE *et al.*, 2019).

Estima-se que 50% do consumo de defensivos agrícolas comercializados na América Latina seja do Brasil. Essas substâncias causam danos a saúde dos consumidores de produtos agrícolas ou que foram contaminados diretamente, como trabalhadores de produções agrícolas. Dentre os danos causados pela intoxicação por esses defensores, estão cânceres, malformações congênitas e distúrbios endócrinos e neurológicos. Segundo um estudo feito pelo Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) da Anvisa, um terço dos alimentos

disponibilizados aos brasileiros é contaminados por essas substâncias químicas. (SILVA *et al.*, 2018; SANTANA *et al.*, 2013).

Outra forma de controle dos fitonematoides é através da utilização de variedades resistentes. Esse método ganhou destaque e tornou-se altamente aconselhável para o controle desses parasitas. Entretanto, ainda existem poucas variedades resistentes, e as que existem, apresentam baixo espectro para as espécies de fitonematoides, sendo mais direcionadas para os nematoides mais comuns de culturas específicas. Assim, a busca por métodos alternativos tem ganhado força. Dentre esses métodos, o controle biológico empregando fungos nematófagos têm apresentado resultados satisfatórios (OLIVERA *et al.*, 2008; FERRAZ *et al.*, 2008).

A definição de controle biológico é descrita como a utilização de antagonistas naturais para reduzir e controlar agentes causadores de grandes perdas produtivas e econômicas. Entretanto, sua ação não fica limitada apenas no hospedeiro final, mas sim em vetores, estágios larvais e hospedeiro intermediário. Além disso, os antagonistas devem apresentar especificidade de ação, alta capacidade reprodutiva e suportar as condições ambientais do habitat (MOTA *et al.*, 2003).

O controle biológico apresenta diversas vantagens. A primeira é em relação a ser uma prática que não gera danos ao meio ambiente, sem deixar resíduos no solo e nos produtos colhidos. Outra vantagem é que essa técnica não colabora com o surgimento de espécies resistentes de nematoides. Por fim, é uma forma eficiente, de baixo custo e de fácil aplicação para o controle desses fitoparasitas (SOARES, 2006).

Estima-se que em 2018, em esfera mundial, o uso de práticas de controle biológico tenha crescido 17% em relação ao período anterior, com receita de US\$ 3,8 bilhões. As expectativas é que o setor biológico cresça ainda mais, atingindo em 2025 a marca de US\$11 bilhões. Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, o setor de produtos biológicos tem obtido resultados significativos nos últimos anos. O Brasil se encontra entre os quatro países com maiores registros de produtos de melhores desempenhos. Em 2018, o setor cresceu mais de 70% no Brasil, sendo o mais significativo de sua história (MAPA, 2019).

Diversos tipos de organismos são predadores de fitonematoides, como bactérias, ácaros, nematoides predadores, fungos, entre outros. Dentre esses, os fungos são os mais proeminentes. Eles atuam de diversas maneiras, sendo classificados como parasitas de ovos, endoparasitas, predadores, produtores de toxina e produtores de dispositivos especiais de ataque. Assim, a utilização de fungos nematófagos surge como uma alternativa importante para o controle de fitonematoides (OLIVEIRA, 2011; SOARES *et al.*, 2018).

2.3 Fungos Nematófagos

Os fungos nematófagos são encontrados em todas as regiões do mundo. Esses organismos atacam os nematoides e alimentam-se desses parasitas em todos os seus estágios de vida, utilizando-os como sua fonte de nutriente (SOARES, 2006).

O fungo *Arthrobotrys oligospora* foi a primeira espécie de fungo nematófago a ser descrita, em 1852 por Fresenius. No Brasil, Alcântara & Azevedo (1981) foram pioneiros no isolamento de fungos a partir de nematoides e utilizarem esses microrganismos como um método de controle biológico. Atualmente, cerca de 700 espécies de fungos nematófagos foram descritas (DEGENKOLB *et al.*, 2016; LOPEZ-LLORCA *et al.*, 2008).

Os fungos nematófagos podem ser parasitas facultativos, e quando estão em locais com a presença de seu hospedeiro, modificam seu comportamento saprofítico para parasitário. Em sua forma parasitária, esses fungos apresentam estruturas de infecção, que são utilizadas para classifica-los conforme sua prática de predação. Essa classificação é dividida em: predadores, oportunistas ou ovicidas, endoparasitas e produtores de toxinas. Em estudos mais recentes foi adicionado mais um grupo: os produtores de dispositivos especiais de ataque (SOARES *et al.*, 2020; LIU *et al.*, 2009).

Essa possibilidade de modificar seu comportamento e utilizar os nematoides como fonte de nutrientes lhes oferece uma vantagem nutricional. Entretanto, os representantes do grupo dos fungos nematófagos endoparasitas não apresentam essa possibilidade e são em sua maior parte parasitas obrigatórios, dependendo da presença dos nematoides (NORDBRING-HERTZ *et al.*, 2001).

As espécies de fungos classificadas como predadores possuem um extenso sistema de hifas que se modificam em estruturas especializadas, conhecidas como armadilhas, para capturar nematoides (PADILHA, 1996). Essas armadilhas são produzidas espontaneamente ou por estímulo externo, como a presença do nematoide no ambiente ou por estresse fisiológico. Após a interação com os nematoides, o processo de diferenciação das hifas em armadilhas começa em até 24 horas, e quanto maior for a motilidade da espécie, mais estímulo é fornecido ao fungo para produção de armadilhas (MOTA *et al.*, 2003).

Após a captura, independentemente do tipo de armadilha utilizada pelo fungo, as hifas penetram a cutícula e formam um bulbo infeccioso. As hifas crescem do bulbo e invadem o corpo do nematoide, passando a utilizá-lo como sua fonte de nutriente. Alguns fungos liberam substâncias hidrolíticas para contribuir com a imobilização do nematoide e auxiliar em seu processo de captura (PADILHA, 1996; SODER, *et al.*, 2005).

As armadilhas podem ser classificadas em seis tipos: hifas adesivas não diferenciadas, redes adesivas tridimensionais, redes adesivas bidimensionais, nódulos adesivos, anéis constritores e anéis não constritores. Os anéis constritores apresentam uma estrutura composta por três células, e no momento em que o nematoide penetra no anel, as células se dilatam e promovem seu estrangulamento. Essa resposta é rápida (0,1s) e irreversível, fazendo com que a armadilha feche quase completamente. Já os anéis não constritores apresentam mecanismo diferente, essa estrutura é composta por substâncias adesiva, e no momento em que o nematoide penetra o anel, a substância adere ao seu corpo impedindo que se liberte (BRAGA *et al.*,2013; RUBNER, 1996).

Os representantes da segunda classe são os fungos ovicidas ou oportunistas. Essas espécies destacam-se pela facilidade de se estabelecerem no solo devido suas práticas saprofiticas, não necessitando da presença do hospedeiro no ambiente em que se encontra, e de suas habilidades em se alimentar de ovos, maduros (contendo juvenis) e imaturos, e cistos (DALLEMOLE-GIARETTA *et al.*,2012).

O seu mecanismo de ação consiste em seu crescimento em direção ao ovo, para que ocorra a penetração das hifas na casca do ovo através de poros que estão presentes na camada vitelínica. Esse processo é responsável por causar alterações na permeabilidade da casca. As hifas aumentam seu tamanho para passar pela camada vitelínica e passar pelas camadas adjacentes: quitínica e lipídica. Como resultado, a camada vitelínica fica dividida, e as camadas quitínica e lipídica ficam vacuoladas e dispersas, respectivamente. Assim, esses organismos colonizam o conteúdo do ovo e também das larvas em desenvolvimento dentro dele (MOTA *et al.*, 2003).

A terceira classe é composta pelos representantes dos fungos endoparasitas. A grande parte dos representantes desse grupo são parasitas obrigatórios e com uma gama restrita de hospedeiros. Sua ação infecciosa pode ocorrer com a ingestão do esporo, conídios e conidióforos ou sua adesão na cutícula do nematoide. As hifas então se desenvolvem, penetrando no corpo do parasita e absorvendo seu conteúdo. No entanto, essas espécies não produzem micélios fúngicos extensos. (PADILHA, 1996; BRAGA *et al.*,2013).

Suas condições de parasita obrigatório levam a dificuldades em seu uso como controle biológico, como produção em larga escala e incapacidade de crescer no solo e em novos ambientes. Em contraste, os fungos endoparasitas são mais eficientes em atrair nematoides quando comparados com espécies saprófitas (NORDBRING-HERTZ *et al.*,2001).

A quarta classe é representada pelos fungos produtores de toxinas. Essas espécies são responsáveis por produzirem toxinas e liberá-las antes da penetração de suas hifas no

nematoide. Estas substâncias podem ter um efeito nematostático (imobilização do nematoide) e um efeito nematicida (morte do nematoide). A produção dessas toxinas está relacionada tanto para o ataque desse microrganismo, quanto para sua defesa. Certas espécies de fungos produzem essas toxinas para se defenderem de invertebrados fungívoros. Alguns fungos são capazes de produzir substâncias com capacidade nematicida, mesmo sem interagir com nematoides. Esse grupo tem representantes no filo dos basidiomicetos, como por exemplo o *Pleurotus sp.* (SOARES *et al.*, 2018; LOPEZ-LLORCA *et al.*, 2008; SOARES, 2006).

O último grupo é representado pelos fungos produtores de dispositivos especiais de ataque. Este grupo de fungos possui dispositivos afiados que podem causar danos uma vez em contato com a cutícula do nematoide. Seu mecanismo de ação consiste no crescimento das hifas em direção a cutícula do nematoide, pressionando-as através de força mecânica. Em seguida, um pino de penetração é formado e penetra a cutícula do nematoide, permitindo a colonização completa de seu corpo. Por fim, essas hifas fúngicas projetam-se do corpo do nematoide infectado (SOARES *et al.*, 2018).

É importante ressaltar que em muitas espécies, o dispositivo de ataque não é suficiente para a colonização dos nematoides, mas é utilizado em conjunto com outros mecanismos, como a liberação de toxinas para a colonização completa e efetiva do nematoide (SOARES *et al.*, 2018).

Assim, é notório o papel dos fungos nematófagos no controle de diversas espécies de nematoides. A partir dessa grande variedade de fungos e seus diferentes mecanismo de ação, é necessário realizar uma avaliação completa do parasita que deseja conter para uma eficiente aplicação desses fungos como controle biológico.

2.4 Basidiomicetos

Os fungos nematófagos possuem representantes na maioria dos filios do Reino *Fungi*, como: *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Chytridiomycota* e *Zygomycota*. Em todos esses filios existem espécies com atividade nematicida e com potencial para utilização como controle biológico (LOPEZ-LLORCA *et al.*, 2008).

Os basidiomicetos apresentam habilidades saprófitas, sendo decompositores naturais de lignocelulose. Portanto, esses fungos são conhecidos como fungos de raiz de madeira, devido seu habitat natural ser principalmente madeira em decomposição (MACIEL *et al.*, 2010). Desde 1941, sabe-se da capacidade desses fungos de se alimentarem de nematoides, apresentando atividade nematicida contra esses parasitas (DRECHSLER, 1941).

Dentre as diversas espécies de fungos com propriedades nematocidas presentes no filo *Basidiomycota*, os produtores de cogumelos comestíveis têm sido de maior interesse para pesquisas de controle biológico, sendo esses inócuos aos seres humanos. Seus benefícios são um campo ativo de pesquisa e possuem propriedades variadas, como atividade antibacteriana, antifúngica e antiviral, além de propriedades antitumorais ou imunostimulantes (FUKUSHIMA-SAKUNO, 2020).

Os cogumelos comestíveis apresentam grande importância econômica. Cerca de oito milhões de toneladas de cogumelos são consumidos anualmente, principalmente em países asiáticos. Em média, para 1 kg de cogumelo é gerado 5 kg de produto residual. Essa grande quantidade de resíduo é um problema para a indústria de cogumelos, e sua reutilização se torna extremamente necessária (FERREIRA *et al.*, 2019).

Os produtos residuais da indústria de cogumelos são ricos em substâncias orgânicas e inorgânicas, como nitrogênio, potássio, fósforo, micélio de cogumelo, bem como um grande número de enzimas, como celulase, hemicelulase e protease. Assim, a utilização desses resíduos como um produto para controle biológico tem obtido grande destaque e resultados satisfatórios. A grande vantagem em utilizar esses resíduos é que eles não dependem de fatores abióticos como o fungo. (FERREIRA *et al.*, 2019).

Grande parte dos cogumelos comestíveis cultivados estão presentes em cinco gêneros: *Lentinula* (22%), *Pleurotus* (19%), *Auricularia* (17%), *Agaricus* (15%) e *Flammulina* (11%) (FUKUSHIMA-SAKUNO, 2020).

O gênero *Pleurotus* pertence ao filo *Basidiomycota*, ordem *Agaricales* e à família *Pleurotaceae*. Esse gênero engloba espécies de cogumelos comestíveis que são comercializados em diversos locais em todo mundo. Apresenta habilidade saprófita e seu crescimento acontece em madeira em decomposição (SOARES *et al.*, 2018).

Foi demonstrado em estudos que espécies do gênero *Pleurotus*, como *Pleurotus ostreatus* secretam minúsculas gotículas contendo toxinas que são capazes de paralisar o nematoide por cerca de 30 segundos. Em seguida, a presa é penetrada pelas hifas do fungo e digerida em 24 h. Três compostos nematocidas também foram isolados de uma cultura de *Pleurotus eryngii* var. *ferulae* L14, uma subespécie associada a *Ferlua communis* subsp. *communis*. O primeiro composto foi Cheimonophyllon E, um sólido amorfo incolor. O segundo, um sólido amorfo amarelado, 5 α ,8 α -epidioxiergosta-6,22-dien-3- β -ol e por fim um sólido amorfo incolor, 5-hidroxi metil-furanocarbaldeído (DEGENKOLB *et al.*, 2016).

A espécie *Flammulina velutipes* também apresenta atividades nematocida através de metabólitos. Foi obtido uma redução de 70% após 72 horas de larvas *Panagrellus sp.* pelo uso

do extrato bruto do fungo. O extrato fervido também causou uma redução significativa nas larvas, evidenciando que a ação nematicida desses fungos ocorre pela ação de metabólitos (FERREIRA *et al.*,2019).

Os fungos *Lentinula edodes* e *Hypsizygus marmoreus* possuem poucas pesquisas sobre os efeitos de seus metabólitos sobre nematoides. Entretanto, diversos estudos apresentam evidências de sua atividade nematicida, como a presença de proteases de degradação de cutícula por *Hypsizygus marmoreus* (SOARES *et al.*,2019) e *Lentinula edodes* com características antiparasitária, antiviral e antimicrobianos (FUKUSHIMA-SAKUNO, 2020).

Nesse contexto, extratos aquosos de resíduos agroindustriais fermentados pelos fungos das espécies *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus eryngii*, *Pleurotus spp.*, *Lentinula edodes*, *Flammulina velutipes* e *Hypsizygus marmoreus* foram utilizados para avaliar aplicação desses resíduos como uma alternativa de controle de fitonematoides.

3

OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

- Avaliar a atividade nematostática de extratos de resíduos agroindustriais oriundos da produção de cogumelos comestíveis sobre juvenis dos seguintes nematoides: *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne javanica* e *Panagrellus redivivus* e identificar os compostos responsáveis por essa ação.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito nematostático dos extratos brutos e dos extratos brutos previamente fervidos sobre os juvenis de *Meloidogyne incognita* e *Meloidogyne javanica* e *Panagrellus redivivus*;
- Avaliar o efeito nematostático de diferentes concentrações dos extratos fúngicos sobre os juvenis de *Panagrellus redivivus*;
- Fracionar os extratos brutos através de ultrafiltração e extração líquido-líquido em baixa temperatura;
- Identificar os compostos com atividade nematostática por LC-MS.

4

METODOLOGIA

4.1 Obtenção dos resíduos fúngicos

Os resíduos agroindustriais fermentados por fungos foram cedidos pelo Grupo Urakami, Mogi das Cruzes, São Paulo – Brasil. Foram utilizados cinco tipos de resíduos de cogumelos comestíveis: Bunapi (*Hypsizygus marmoreus*), Shitake (*Lentinula edodes*), Shimeji (*Pleurotus ostreatus*), Enoki (*Flammulina velutipes*), Shimeji Premium (*Pleurotus spp.*) e Eryngii (*Pleurotus eryngii*), sendo todos eles representantes do filo *Basidiomycota*.

4.2 Produção dos extratos brutos fúngicos

A produção dos extratos brutos aquosos foi realizada a partir dos resíduos agroindustriais de cogumelos. Para isso, foram misturados 5g dos resíduos fúngicos com 50 mL de água destilada em frascos de tipo Erlenmeyer 250 mL. Essas misturas foram incubadas a 28°C durante 24 horas com agitação a 180 rpm, filtradas através de gazes e depois centrifugadas a 10.000 x g durante 30 minutos (SOARES *et al.*, 2019).

4.3 Obtenção dos juvenis de *Meloidogyne*

Para obtenção dos juvenis foram utilizadas raízes de soja infectadas por *Meloidogyne incognita* e *Meloidogyne javanica*. Os representantes do gênero *Meloidogyne* foram extraídos através da adaptação da técnica do Funil de Baermann (BAERMANN, 1917). Para isso, as amostras das raízes que apresentaram galhas visíveis foram cortadas com tesoura em pedaços de aproximadamente 3 cm e colocadas em peneiras revestidas com papel e com volume de água suficiente para cobrir as raízes. Após 48 horas, período necessário para liberação dos juvenis na água, o material foi peneirado utilizando peneiras granulométricas de 100, 400 e 500 Mesh, sendo as sujeiras retidas na primeira peneira e os juvenis retidos na segunda e terceira, respectivamente.

4.4 Obtenção e cultivo dos juvenis de vida livre

Os nematoides de vida livre da espécie *Panagrellus redivivus* foram adquiridos no Laboratório de Parasitologia, do Departamento de Veterinária, da Universidade Federal de Viçosa, Brasil. Sua preservação foi realizada em placas de Petri contendo meio de cultura a base de aveia úmida, na ausência de luz.

4.5 Atividade nematostática dos extratos brutos

Os extratos brutos dos resíduos fúngicos foram avaliados quanto sua atividade nematostática sobre juvenis. Para isso, foram formados três grupos para cada amostra de extrato: um grupo controle com água destilada, um grupo tratado com o extrato bruto e um grupo tratado com extrato bruto previamente fervido. Foram feitas 8 repetições para cada grupo. O teste foi realizado em placas de 96 poços. Foram aplicados cerca de 30 juvenis J2 (110 µL da suspensão com o nematoide) de *M. incognita*, *M. javanica* ou *P. redivivus* em cada poço, em seguida foi aplicado 190 µL de cada tratamento. A placa foi incubada na ausência de luz a 28 °C pelo período de 24, 48 e 72 horas. Após esses intervalos de tempo, cada poço foi avaliado por meio de microscopia óptica. Os parâmetros avaliados foram: mortalidade, motilidade e degradação de cutícula dos juvenis (SOARES *et al.*, 2015). Para identificar se os juvenis estavam mortos ou paralisados foi adicionado NaOH 1N. Através dessa metodologia, o NaOH induz o retorno da movimentação dos nematoides que estiverem apenas paralisados (CHEN *et al.*, 2000).

Posteriormente, o percentual de paralisação da média de larvas foi calculado de acordo com a seguinte equação:

$$\%Paralisação = \frac{(Média de Larvas do controle - Médias de Larvas do tratamento) \times 100}{Média de Larvas do controle}$$

4.6 Atividade nematostática em diferentes diluições dos extratos brutos

A atividade nematostática dos extratos brutos em diferentes diluições foi avaliada. Para isso, os extratos de *L. edodes* e *P. ostreatus* foram diluídos nas seguintes concentrações 0; 20; 40; 60; 80; e 100% (v/v). Para cada amostra de diluição a ser analisada foram formados três grupos: um grupo controle com água destilada, um grupo tratado com o extrato bruto e um grupo tratado com extrato bruto previamente fervido. As análises foram realizadas nos tempos

de 24, 48 e 72 horas. Cada conjunto teve 8 replicatas conforme descrito no Tópico 4.5 deste trabalho.

4.7 Fracionamento dos extratos brutos

Esta etapa foi realizada com o objetivo de identificar os possíveis compostos com atividade nematostática. Para isso, os extratos brutos foram fracionados e suas frações foram analisadas quanto à sua atividade nematostática. Os métodos empregados foram, respectivamente: ultrafiltração, extração líquido-líquido em baixa temperatura e espectrometria de massas.

4.7.1. Ultrafiltração

Os extratos foram submetidos ao processo de ultrafiltração com a finalidade de separar as amostras em duas frações diferentes, a partir de seus pesos moleculares. Para isso foi utilizado uma célula de ultrafiltração da Amicon, (modelo 8400) com uma membrana de exclusão de 10 kDa. O teste de atividade nematostática foi realizado em ambas as frações: F1 contendo compostos com massas < 10 kDa e F2 contendo compostos com massas > 10 kDa.

4.7.2. Extração líquido-líquido em baixa temperatura

As frações que apresentaram os melhores resultados no teste de atividade nematostática na etapa anterior (item 4.7.1 deste trabalho) foram submetidos a extração líquido-líquido à baixa temperatura. Para isso, foram colocadas cerca de 10 mL dos extratos (fase aquosa) e 20 mL de acetonitrila (fase orgânica) em tubos do tipo Falcon. As amostras foram homogeneizadas e deixadas em repouso no refrigerador a -20 °C por 24 horas para congelamento da fase aquosa (SILVÉRIO *et al.*, 2012). Após o intervalo de tempo, as fases aquosas e orgânicas foram recolhidas e colocadas em estufa a 100 °C para evaporação da acetonitrila presente nas amostras. O teste de atividade nematostática foi realizado em todas as frações coletadas.

4.7.3. Espectrometria de massas

A fração que apresentou o melhor resultado no teste de atividade nematostática na etapa anterior (item 4.7.2 deste trabalho) foi analisada por espectrometria de massas para identificar os compostos responsáveis pelo efeito. A fração foi injetada no sistema LC/MS-MS pertencente ao NuBioMol do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCB) da UFV. Utilizou-se a coluna cromatográfica (Agilent Eclipse Plus, 2.1x50 mm) com fluxo de 0,5 mL/min, acoplada a um espectrômetro de massa do tipo triplo quadrupolo QqQ (Agilent), operado no modo positivo. Os valores de m/z para as moléculas observadas bem como suas fragmentações foram utilizadas

para pesquisas no banco de dados de espectros MassBank (www.massbank.jp) para identificar compostos presentes nos extratos.

4.8 Análises estatísticas

Os dados obtidos nos ensaios foram interpretados estatisticamente pela análise de variância, em níveis de significância de 5% de probabilidade. A eficiência da taxa de imobilização dos nematoides em relação ao controle foi avaliada pelo teste de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$. Todas as análises foram realizadas usando o software Minitab 17 (Minitab Statistical Software) e as figuras feitas no GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc.).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Atividade nematostática dos extratos brutos sobre juvenis de *Meloidogyne incognita*

As Figuras 1 e 2 mostram a atividade nematostática obtida sobre os juvenis de *M. incognita* utilizando os extratos brutos dos resíduos agroindustriais. Os experimentos foram realizados usando os extratos fervidos e extratos que não foram fervidos previamente, a fim de avaliar diferenças nas atividades nematostáticas e a possibilidade da presença de moléculas termorresistentes. A Figura 1 mostra os resultados obtidos utilizando o extrato não fervido.

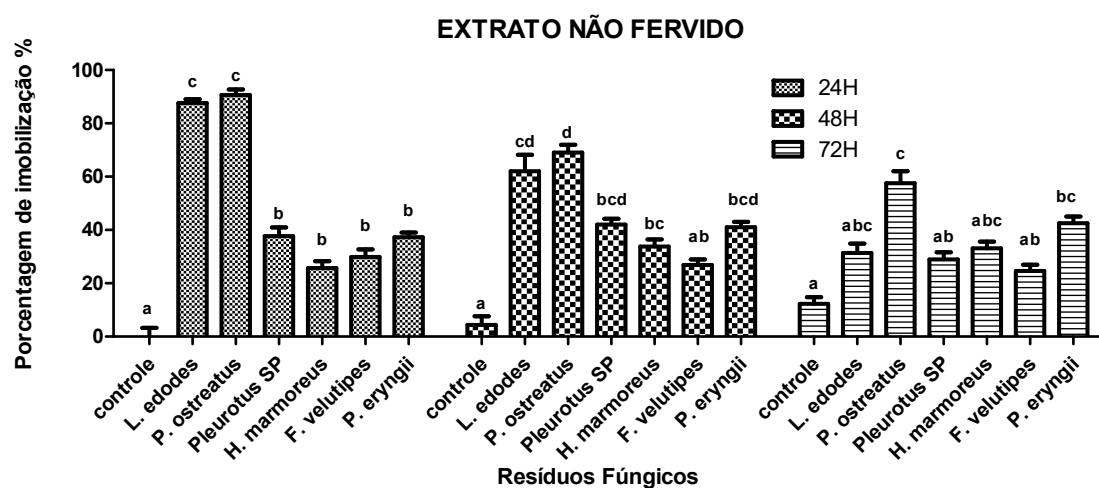


Figura 1. Atividade nematostática dos extratos não fervidos dos resíduos de *Lentinula edodes*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus spp.*, *Hypsizygus marmoreus*, *Flammulina velutipes* e *Pleurotus eryngii* sobre os juvenis de *Meloidogyne incognita* nos períodos de 24, 48 e 72 horas. As médias seguidas por letras iguais nas colunas não diferiram entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Após o período de 24 horas, todos os extratos brutos dos resíduos fúngicos apresentarem efeito nematostático significativo quando comparado ao grupo controle. Com 48 horas, apenas o resíduo de *F. velutipes* não apresentou diferença significativa ao grupo controle. E após 72 horas, apenas os resíduos de *P. ostreatus* e *P. eryngii* apresentaram diferença significativa ao grupo controle. Entretanto, é possível notar que os resíduos de *L. edodes* e *P. ostreatus* foram mais eficientes em paralisar os juvenis de *M. incognita*.

Os dados obtidos de *L. edodes* evidenciam que sua maior eficácia foi no período de 24 horas, no qual 87,59% dos juvenis de *M. incognita* foram paralisados. No período de 48 horas ainda é possível observar o efeito nematostático dos resíduos, no qual a porcentagem de juvenis

paralisados é de 62,04%. Apesar da diminuição porcentual em 48 horas, a paralisação dos juvenis permanece significativa, com o efeito nematostático em mais de 50% das espécies. Em 72 horas, o percentual diminuiu em um nível significativo, passando para 31,39%. Após as 72 horas foi adicionado NaOH 1N, retomando a motilidade dos juvenis, evidenciando como característica dos resíduos de *L. edodes* sua propriedade nematostática.

Os resíduos de *P. ostreatus* também apresentaram dados significativos em relação a atividade nematostática. Após 24 horas foi possível observar um efeito de 90,65% sobre os juvenis de *M. incognita*. Em 48 horas, esse efeito foi de 69,06% sobre os juvenis dessa espécie. Já em 72 horas, o efeito nematostático ainda permaneceu significativo, sendo de 57,55% sobre os juvenis. Após 72 horas também foi adicionado NaOH 1N, retomando a motilidade dos juvenis, evidenciando como característica dos resíduos de *P. ostreatus* sua propriedade nematostática.

O mesmo experimento foi realizado sobre os juvenis de *M. incognita*, mas utilizando os extratos previamente fervidos, como mostra a Figura 2.

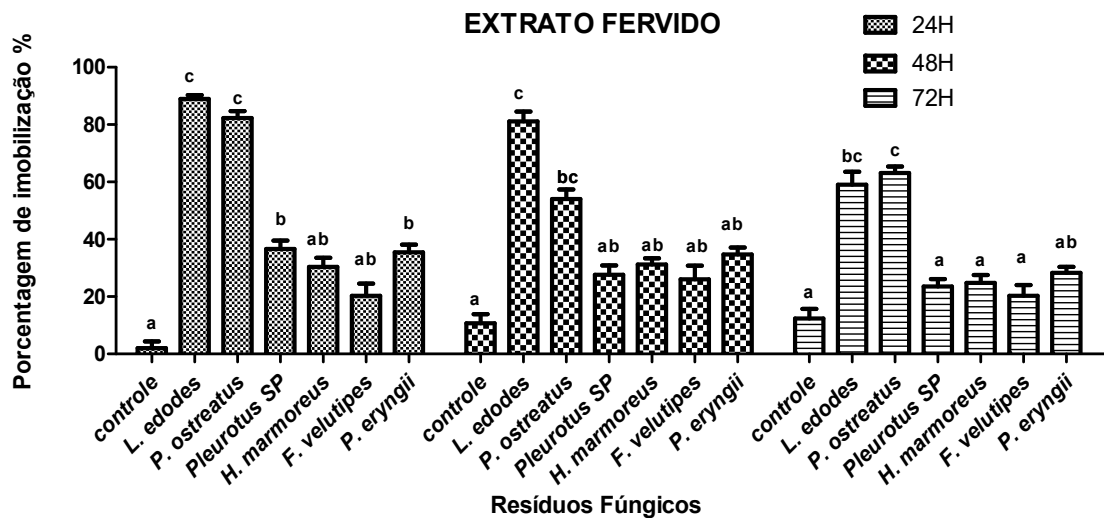


Figura 2. Atividade nematostática dos extratos fervidos dos resíduos de *Lentinula edodes*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus spp.*, *Hypsizygus marmoreus*, *Flammulina velutipes* e *Pleurotus eryngii* sobre os juvenis de *Meloidogyne incognita* nos períodos de 24, 48 e 72 horas. As médias seguidas por letras iguais nas colunas não diferiram entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Após o período de 24 horas, apenas os extratos brutos dos resíduos fúngicos de *H. marmoreus* e *F. velutipes* não apresentarem efeito nematostático significativo quando comparado ao grupo controle. Após 48 e 72 horas, apenas os resíduos de *L. edodes* e *P. ostreatus* apresentaram diferença significativa ao grupo controle. Dessa maneira, os resíduos fúngicos de *P. ostreatus* e *L. edodes* continuaram apresentando resultados mais significativos.

Os resíduos de *L. edodes* exibiram após 24 horas um efeito nematostático de 88,98% sobre os juvenis de *M. incognita*, muito próximo ao efeito apresentando pelos resíduos que não foram fervidos. Em 48 horas, temos a paralisia de 81,10% dos juvenis. E após 72 horas, ainda é possível observar um efeito nematostático significativo, sendo de 59,06%. Os resíduos de *P. ostreatus* também apresentaram resultados relevantes em 24 horas levando à paralisia de 82,26% dos juvenis de *M. incognita*. Em 48 horas, 54,03% dos juvenis dessa espécie permaneceram paralisados. Ao final, em 72 horas, resultados significativos foram alcançados com a paralisia de 63,13% dos juvenis. Após as 72 horas também foi adicionado NaOH 1N para confirmar a atividade nematostática.

Os extratos dos resíduos fúngicos de *H. marmoreus*, *F. velutipes*, *P. eryngii* e *Pleurotus sp.* apresentaram resultados significativos em ambas condições, nos experimentos com os extratos fervidos e nos experimentos com os extratos não fervidos previamente. Entretanto, a redução na motilidade dos juvenis por essas espécies foi inferior a 40% nos períodos de 24, 48 e 72h, resultados menos expressivos quando comparados aos extratos dos resíduos de *L. edodes* e *P. ostreatus*.

Pode-se observar uma ação eficaz dos resíduos fúngicos da produção de cogumelos comestíveis, *L. edodes* e *P. ostreatus*, em paralisar os juvenis de *M. incognita* por determinados períodos de tempo. Resultados próximos entre extrato bruto e o extrato bruto previamente fervido, tanto para os resíduos de *L. edodes* quanto para os resíduos de *P. ostreatus*, indicam que o efeito nematostático está associado a moléculas termorresistentes.

Outros estudos relataram a eficácia desses fungos no controle de nematoides. Segundo Wille *et al.* (2019), extrato aquoso de *P. ostreatus* alcançou 100% de mortalidade em larvas de *M. incognita* após o período de 24 horas.

Esses fungos também apresentaram ação nematicida e nematostática em outras espécies de nematoides. Comans-pérez *et al.* (2021) apresentaram resultados em que os micélios de *P. ostreatus* e *L. edodes* causaram uma mortalidade de 88% e 93,93%, respectivamente, em larvas (L3) de *Haemonchus contortus*. Extratos hidroalcoólicos produzidos a partir do micélio de *P. ostreatus* apresentaram taxa de mortalidade de 81,6% após 72 horas sobre as larvas L3. Valdez-Uriostegui *et al.* (2021) tiveram resultados semelhantes utilizando extrato hidroalcoólico de micélio de *P. ostreatus* contra ovos e larvas de *H. contortus*, no qual a eficácia anti-helmíntica foi de 93% a 12,8 mg/mL para ovos e 96,8% a 240 mg/mL para os juvenis dessa espécie.

Cruz-arévalo *et al.* (2020) avaliaram o efeito de extratos hidroalcoólicos da cepa ECS-1255 de *Pleurotus eryngii* sobre os ovos e larvas (L3) de *H. contortus* e obtiveram uma taxa de mortalidade de 18,83% a 20 µg/mL. O gênero *Pleurotus* é conhecido por suas diversas

características, como capacidade de colonizar e degradar uma grande variedade de resíduos lignocelulósicos, propriedades medicinais, gastronômicas e atividade nematicida e nematostática contra fitonematoides (GENIER *et al.*, 2015). Até 2013, 23 espécies do gênero apresentavam propriedades anti-helmínticas (CRUZ-ARÉVALO *et al.*, 2020).

Como pode ser observado nas Figuras 1 e 2, a atividade nematostática diminuiu ao longo das 72 horas para o extrato fervido e o extrato não fervido. Esse comportamento não era inicialmente esperado, no qual ao longo das 72 horas a taxa de paralisação dos juvenis deveria aumentar, tendo um efeito máximo em 72 horas.

Essa queda no efeito nematostático pode ser explicada pela degradação dos compostos com ação nematostática pelos nematoides, onde em 24 horas ele provoca a paralisação desses juvenis, mas com o tempo o metabolismo do fitonematoide consegue degradar esses compostos, reduzindo seu impacto sobre eles. Nesse contexto, os extratos dos resíduos fúngicos apresentaram apenas atividade nematostática e não uma atividade nematicida.

Essa ausência de atividade nematicida nos extratos dos resíduos fúngicos pode estar relacionada à composição do substrato de cultivo dos cogumelos. Segundo Dong *et al.* (2006), o meio de cultura possui uma grande influência sobre a produção de toxinas pelos cogumelos, uma vez que os filtrados de diferentes meios líquidos apresentaram variações nas toxicidades, propondo que a produção de diferentes compostos nematicidas e/ou nematostáticos e em diferentes quantidades depende das condições nutricionais dos meios de cultura.

As condições de cultivo também podem afetar diretamente a produção de compostos com ação nematicidas e nematostáticas. Ocampo-gutiérrez *et al.* (2021) observaram que cepas de *Arthrobotrys* produziram mais compostos nematicidas quando cultivadas em condições estáticas do que sobre agitação. Esse fenômeno pode ocorrer devido ao estresse hidrodinâmico causado pela limitação na fonte de oxigênio para essas espécies por condições de crescimento estático.

Em relação aos cogumelos produzidos pelo Grupo Urakami, a seleção dos substratos e das técnicas de cultivo variam para as diferentes espécies. Entretanto, materiais volumosos e fibrosos, como farelos de soja e milho e bagaço de cana-de-açúcar são frequentemente utilizados. Como exemplo, o substrato de *P. eryngii* tem como base serragem com farelo de trigo e de soja, e deve ser conservado em estufas com até 15°C (KIMURA *et al.*, 2010).

Na literatura, as propriedades nematostáticas e nematicidas de cogumelos comestíveis têm sido estudadas principalmente utilizando corpos de frutificação e micélio, mas poucos estudos têm focado nos resíduos gerados durante a produção desses cogumelos. Esse material pode conter biomoléculas que são produzidas durante o crescimento do fungo e possuem

propriedades nematocidas e/ou nematostáticas. O uso desses resíduos agroindustriais pode afetar a motilidade dos juvenis de fitonematóides e sua capacidade de penetrar nas raízes de plantas, sendo eficientes para produção de anti-helmínticos naturais e de baixo custo (PINEDA-ALEGRÍA *et al.*, 2017).

5.2 Atividade nematostática dos extratos brutos sobre juvenis de *Meloidogyne javanica*

Conforme mostrado nas Figuras 3 e 4, a atividade nematostática também foi observada em juvenis de *Meloidogyne javanica*. Os experimentos foram realizados da mesma forma, utilizando os extratos previamente fervidos e extratos não fervidos.

A Figura 3 mostra os dados obtidos a partir dos extratos não fervidos.

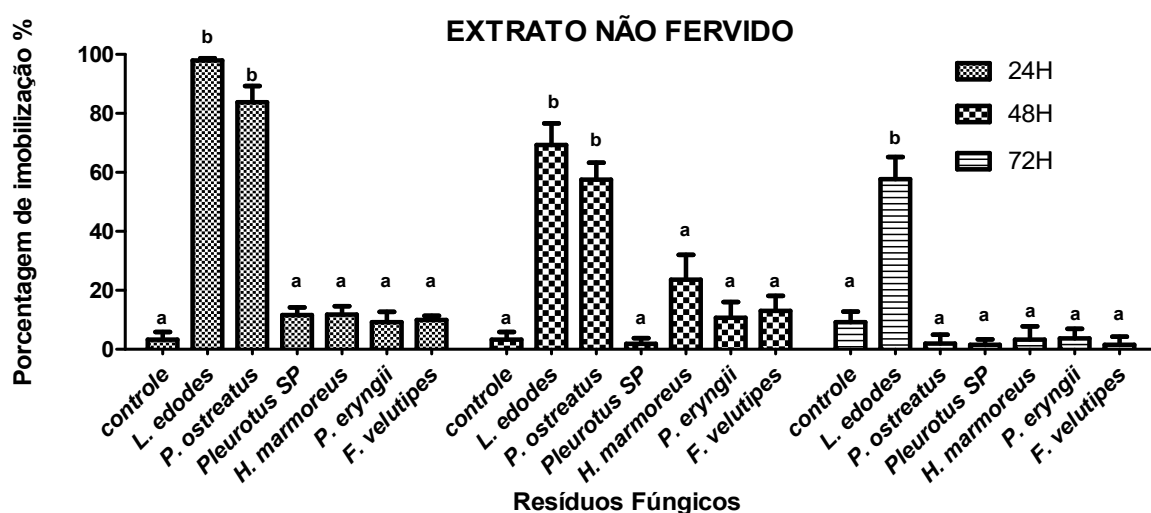


Figura 3. Atividade nematostática dos extratos não fervidos dos resíduos de *Lentinula edodes*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus spp.*, *Hypsizygos marmoreus*, *Flammulina velutipes* e *Pleurotus eryngii* sobre os juvenis de *Meloidogyne javanica* nos períodos de 24, 48 e 72 horas. As médias seguidas por letras iguais nas colunas não diferiram entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Os resultados obtidos sobre os juvenis de *M. javanica* foram semelhantes aos resultados de *M. incognita*. Tanto o fungo *L. edodes* quanto o *P. ostreatus* exerceram efeito nematostático significativo sobre as espécies de *M. javanica* nos períodos de 24, 48 e 72h.

O fungo *L. edodes* apresentou após 24 horas um efeito nematostático de 97,93% sobre os juvenis de *M. javanica*. Sendo nesse período de tempo, seu melhor desempenho em promover a paralisação desses juvenis. Após 48 horas esse porcentual diminuiu para 69,29%. Em 72 horas, houve uma redução no porcentual para 57,68%, mas que continuou sendo significativa, paralisando mais que 50% dos juvenis dessa espécie. Após as 72 horas também foi adicionado NaOH 1N, para confirmar a atividade nematostática, retomando a motilidade dos juvenis.

O fungo *P. ostreatus* também mostrou eficácia relevante na paralisação dos juvenis de *M. javanica*. Após 24 horas, ocorreu uma paralisação de 83,78% dos juvenis dessa espécie. Em 48 horas essa paralisação foi de 57,53%, ainda eficiente em paralisar mais que 50% dos fitonematoides. Em 72 horas esse percentual caiu drasticamente para 1,93%, o que não foi significativamente diferente do grupo controle.

Os dados obtidos usando os extratos fervidos são mostrados na Figura 4.

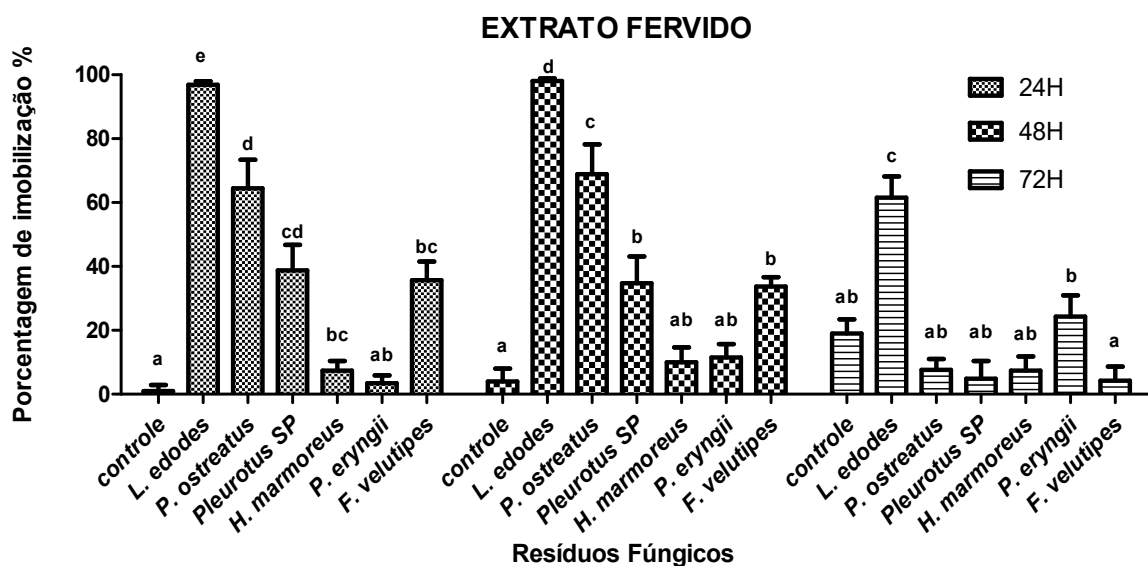


Figura 4. Atividade nematostática dos extratos fervidos dos resíduos de *Lentinula edodes*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus spp.*, *Hypsizygus marmoreus*, *Flammulina velutipes* e *Pleurotus eryngii* sobre os juvenis de *Meloidogyne javanica* nos períodos de 24, 48 e 72 horas. As médias seguidas por letras iguais nas colunas não diferiram entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Após o período de 24 horas, apenas o extrato bruto do resíduo fúngico de *P. eryngii* não apresentou efeito nematostático significativo quando comparado ao grupo controle. Após 48 horas, apenas os resíduos de *H. marmoreus* e *P. eryngii* não apresentaram diferença significativa ao grupo controle. E com 72 horas, apenas os resíduos de *L. edodes* e *P. eryngii* apresentaram diferença significativa ao grupo controle. Dessa maneira, o mesmo comportamento foi observado em relação aos resultados anteriores, sendo os fungos *L. edodes* e *P. ostreatus* a apresentarem resultados mais significativos.

Em 24 horas o fungo *L. edodes* paralisou 96,83% dos juvenis de *M. javanica*. Essa eficácia manteve-se constante ao longo de 48 horas, com uma paralisação em 98,02% dos juvenis dessa espécie. Esse efeito foi diferente do apresentado pelos extratos não fervidos, sendo bem maior e eficaz no período de 48 horas. Em 72 horas a paralisação dos fitonematoides continuou em níveis significativos, com o percentual de 61,51% dos juvenis de *M. javanica*.

Após as 72 horas também foi adicionado NaOH 1N para confirmar a atividade nematostática, retomando a motilidade dos juvenis

Observou-se resultados semelhantes após os períodos de 24 e 48 horas para os resíduos de *P. ostreatus*. A porcentagem de paralisação dos juvenis em 24 horas foi de 64,40% e em 48 horas de 68,80%. Já após 72 horas, esse valor declina consideravelmente, passando para 7,60%. Esse comportamento no período de 72 horas se assemelha com os extratos não fervidos, no qual também mostrou uma diminuição substancial no efeito nematostático dos resíduos fúngicos sobre os juvenis de *M. javanica*.

Os extratos dos resíduos fúngicos de *H. marmoreus*, *F. velutipes*, *P. eryngii* e *Pleurotus sp.* causaram efeitos semelhantes quando aplicados sobre os juvenis de *M. incognita*. Essas espécies reduziram a motilidade em percentuais inferiores a 40% após os períodos de 24, 48 e 72h, uma eficácia menos expressiva na paralisação de juvenis de *M. incognita* quando comparados a *P. ostreatus* e *L. edodes*. Resultados próximos entre extrato bruto e o extrato bruto fervido corroboram com a premissa que o efeito nematostático está associado a moléculas termorresistentes.

Outros estudos mostraram a eficiência de *P. ostreatus* e *L. edodes* em juvenis de *M. javanica*. Heydari *et al.* (2006) utilizaram filtrados de *P. ostreatus* cultivados em extrato de malte sobre juvenis de *M. javanica* que paralisaram 78% dos juvenis em 4 horas e 100% deles após 24 horas. Cinco espécies diferentes de *Pleurotus* (*P. ostreatus*, *P. sajor-caju*, *P. cornucopiae*, *P. florida* e *P. eryngii*) também foram avaliadas sobre juvenis de *M. javanica* em estudos *in vitro*. Nas culturas de ágar, todas as espécies testadas produziram minúsculas gotículas de toxina e os nematoides expostos a essas gotículas recuaram imediatamente e foram colonizados por fungos 24-48 horas depois. Esses efeitos foram mais pronunciados para *P. ostreatus*.

Hahn *et al.* (2019) também apresentaram resultados satisfatórios de motilidade e mortalidade de extratos filtrados de *L. edodes* sobre juvenis de *M. javanica*, em que a taxa de mortalidade sobre os juvenis dessa espécie foi de 95,7% após o período de 48 horas. A motilidade e a mortalidade de extratos filtrados de *P. eryngii* sobre os juvenis de *M. javanica* também foram avaliadas por Hahn *et al.*, (2019), no qual apresentou um percentual de 32% de imobilização dos juvenis dessa espécie.

Alvear-Díaz (2018) avaliou os extratos etanólico e aquoso de *P. ostreatus* sobre juvenis de *Meloidogyne spp.* e após 60 minutos obteve 99,1% de mortalidade a partir do extrato etanólico e 1,40% para o extrato aquoso. Já Sufiate *et al.* (2017) observaram que o extrato de *P.*

eryngii reduziu em 53% o número de ovos intactos de *M. javanica* quando comparados ao grupo controle.

É possível observar a ausência de um efeito nematocida ao longo das 72 horas, como visto nas Figuras 1 e 2 nos experimentos com os juvenis de *M. incognita*. Esse comportamento também é justificado pelas diferenças nutricionais do substrato da produção dos cogumelos, como também sua forma de cultivo. Assim, fica notório a importância de se testar vários parâmetros para se avaliar a capacidade dos fungos de produzir toxinas (DONG *et al.*, 2006).

Portanto, existe um vasto campo de investigação sobre as propriedades nematocidas e nematostática dos cogumelos. Como exemplo, a onfalotina A, um nematocida isolado do cogumelo *Omphalotus olearius*, ele é considerado mais potente que o nematocida ivermectina comercialmente disponível, apresentando uma DL50 de 0,75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sobre os nematoides do gênero *Meloidogyne* (MAYER *et al.*, 1997; DONG *et al.*, 2006).

5.3 Atividade nematostática dos extratos brutos sobre juvenis de *Panagrellus redivivus*.

As Figuras 5 e 6 mostram a atividade nematostática obtida utilizando os resíduos da produção de cogumelos comestíveis sobre os juvenis de *Panagrellus redivivus*, nematoide modelo em experimentos de atividade nematostática. A Figura 5 mostra os dados usando o extrato não fervido.

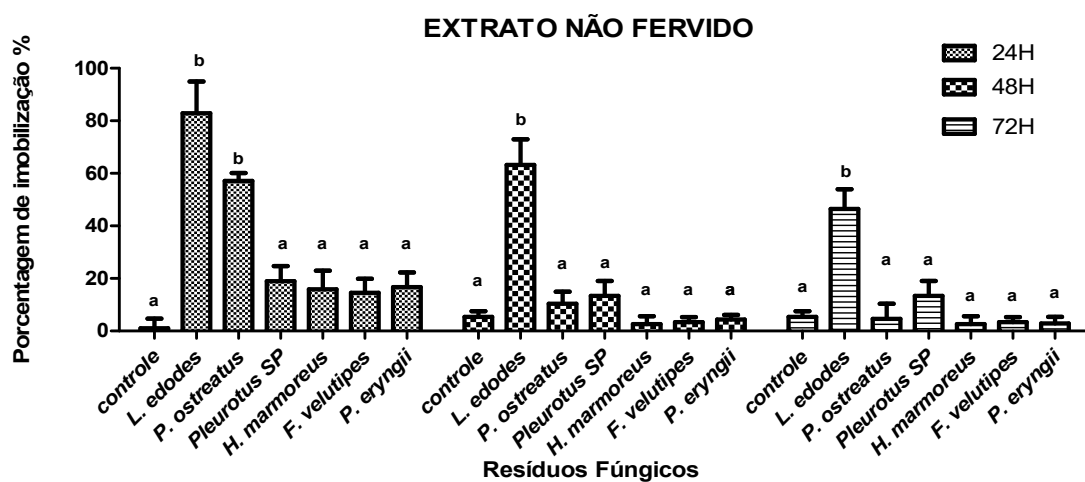


Figura 5. Atividade nematostática dos extratos não fervidos dos resíduos de *Lentinula edodes*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus spp.*, *Hypsizygos marmoreus*, *Flammulina velutipes* e *Pleurotus eryngii* sobre os juvenis de *Panagrellus redivivus* pelos períodos de 24, 48 e 72 horas. As médias seguidas por letras iguais nas colunas não diferiram entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Após o período de 24 horas, *L. edodes* promoveu a imobilização de 82,90% dos juvenis de *P. redivivus*, sendo esse seu período de maior eficiência. Após 48 horas, foi observado uma imobilização de 63,20% dos juvenis dessa espécie. E em 72 horas, a paralisação dos juvenis de *P. redivivus* pelos resíduos de *L. edodes* teve declínio, chegando em 46,47% de imobilização.

O fungo *P. ostreatus* apresentou efeito significativo na paralisação dos juvenis de *P. redivivus* apenas após o período de 24 horas, sendo esse de 57,09%. Já os resíduos dos fungos *H. marmoreus*, *F. velutipes*, *P. eryngii* e *Pleurotus sp.* não apresentaram diferença significativa do grupo controle.

A Figura 6 mostra os resultados obtidos no teste de atividade nematostática usando os extratos fervidos sobre os juvenis de *P. redivivus*.

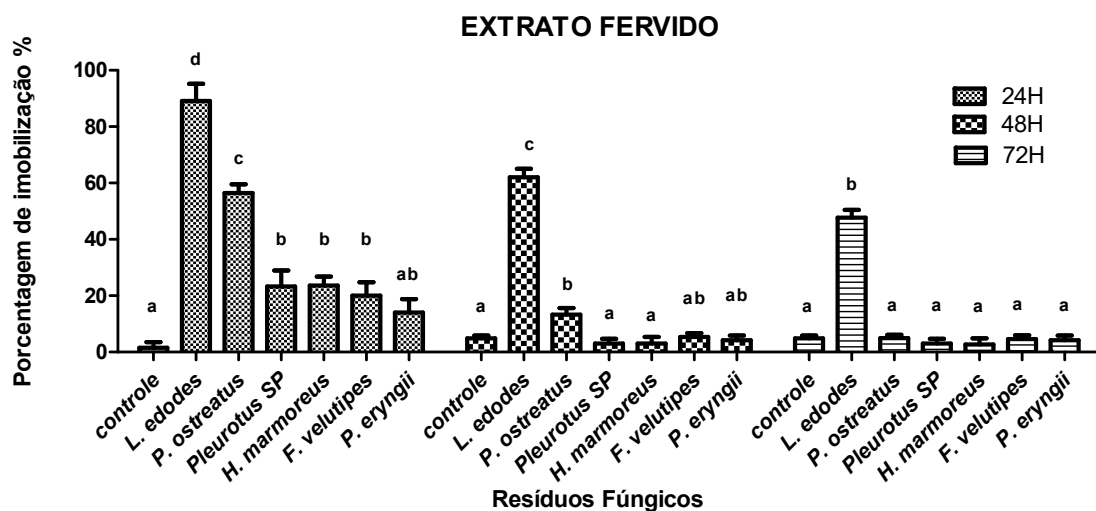


Figura 6. Atividade nematostática dos extratos fervidos dos resíduos de *Lentinula edodes*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus spp.*, *Hypsizygos marmoreus*, *Flammulina velutipes* e *Pleurotus eryngii* sobre os juvenis de *Panagrellus redivivus* nos períodos de 24, 48 e 72 horas. As médias seguidas por letras iguais nas colunas não diferiram entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Após 24 horas, o extrato de *L. edodes* paralisou 89,09% dos juvenis de *P. redivivus*. Depois de 48 horas, o efeito nematostático foi de 62,03%. E após 72 horas, a taxa de paralisação dos juvenis dessa espécie foi de 47,74%. O extrato de *P. ostreatus* apresentou efeito nematostático apenas após as primeiras 24 horas, com 56,44%. Os demais fungos apresentaram efeito nematostático inferior a 25% ou nenhuma diferença significativa em relação ao grupo controle nos períodos de 24, 48 e 72 horas.

Os resultados próximos entre extrato bruto e o extrato bruto previamente fervido tanto para os resíduos de *L. edodes* quanto para os resíduos de *P. ostreatus* corroboram com a premissa que a ação nematostática está relacionado a moléculas termorresistentes.

Outros estudos avaliaram o efeito desses fungos sobre os juvenis de *P. redivivus*. Soares *et al.* (2019) testaram o extrato aquoso de *H. marmoreus* em *P. redivivus* e em larvas infectantes de bovinos (L3) e verificaram, em relação ao grupo controle, um percentual de redução significativo de 52% e 26%, respectivamente, após o período de 24 horas. Além disso, o primeiro composto com propriedade nematicida isolado de *P. ostreatus* foi o ácido trans-2-

decenóico, que foi responsável pela imobilização de 95% de uma população de teste do nematoide *Panagrellus redivivus* em 1 hora (KWOK *et al.*,1992).

É possível observar que os juvenis de *P. redivivus* são menos sensíveis aos extratos quando comparados com os das espécies de *M. incognita* (Figuras 1 e 2) e *M. javanica* (Figuras 3 e 4), principalmente para o extrato do resíduo de *P. ostreatus*, sugerindo que esses extratos possuem menor ação sobre os nematoides de vida livre. Esse efeito pode estar associado a diferenças na composição da cutícula desses nematoides, que podem diferir de espécie para espécie. Comportamento semelhante foi descrito por Rocha *et al.* (2017) onde extratos de sementes de *Canavalia ensiformis* promoveram a morte de 90% de juvenis de *M. incognita* e apenas 5% dos nematoides de vida livre.

Os nematoides de vida livre são espécies modelo amplamente utilizadas nos estudos de atividade nematicida e nematostática. Esses organismos não requerem um hospedeiro para se alimentar ou reproduzir, o que facilita o cultivo contínuo dessas espécies. Além disso, eles são menos sensíveis a compostos tóxicos, como visto ao comparar os resultados de *M. incognita* e *M. javanica*. Dessa forma, os nematoides de vida livre são muito úteis na seleção inicial de compostos com potenciais nematicidas e nematostático, servindo como um parâmetro para os estudos com nematoides parasitas de plantas ou animais (NIGON *et al.*, 2018, CASTAÑEDA-RAMÍREZ *et al.*, 2020).

5.4 Atividade nematostática em diferentes diluições dos extratos brutos

Diferentes diluições dos extratos dos resíduos agroindustriais de *L. edodes* e *P. ostreatus* foram utilizados para avaliar a atividade nematostática sobre nematoides de *Panagrellus redivivus*.

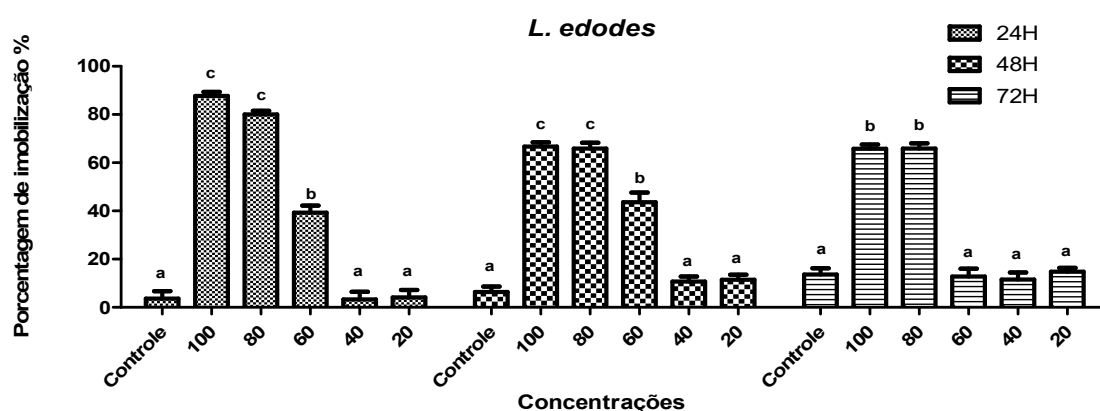


Figura 7. Atividade nematostática dos extratos fervidos dos resíduos de *Lentinula edodes* em diferentes concentrações sobre os juvenis de *Panagrellus redivivus*. As médias seguidas por letras iguais nas colunas não diferiram entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Esses resíduos foram escolhidos por apresentarem um efeito nematostático mais potente sobre nematoides em comparação com os outros resíduos fúngicos. O teste foi realizado com as concentrações de 100, 80, 60, 40 e 20% (v/v). Foram utilizados somente os extratos fervidos. Os resultados obtidos estão representados nas Figuras 7 e 8, para *L. edodes* e *P. ostreatus*, respectivamente.

A Figura 7 apresenta os dados dos tratamentos com os extratos de *L. edodes* em diferentes concentrações. Após 24 horas, as concentrações de 100% e a de 80% apresentaram um percentual de imobilização de 87,72% e 80%, respectivamente. Estatisticamente, não houve diferença significativa entre elas. A concentração de 60% ocasionou um percentual de imobilização de 39,32%. Após 48 horas, a concentração de 100% imobilizou 66,67% dos juvenis de *P. redivivus* e a de 80% imobilizou 65,88%, não apresentando diferença significativa entre elas. Já a concentração de 60% imobilizou 43,59% dos juvenis. Após 72 horas, a concentração de 100% imobilizou 65,79% dos juvenis e a de 80% permaneceu com 65,88%. A concentração de 60% teve um declínio do seu percentual, passando a imobilizar 12,82% dos juvenis, sem diferença significativa do grupo controle. As taxas de imobilização das concentrações de 40% e 20% não apresentaram diferença significativa do grupo controle pelos períodos de 24, 48 e 72 horas.

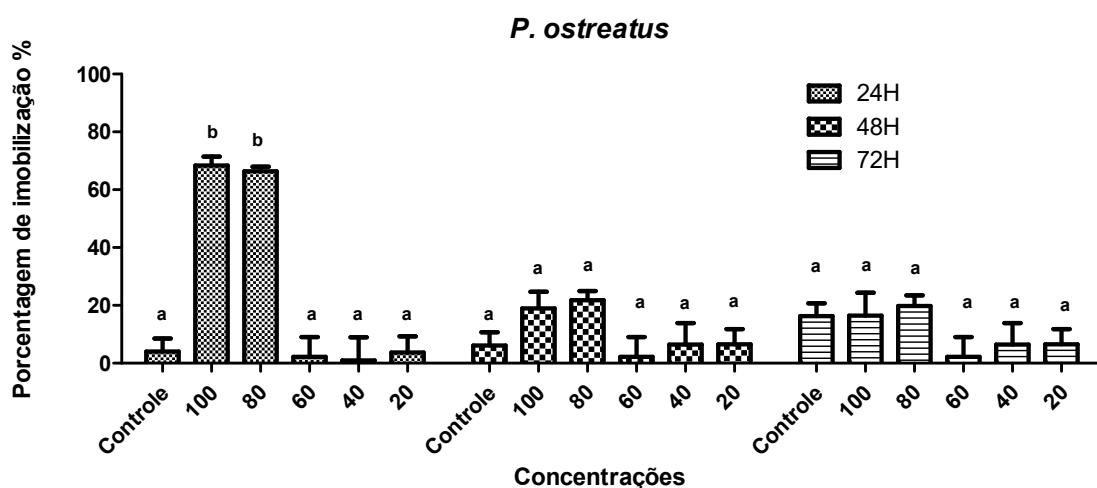


Figura 8. Atividade nematostática dos extratos fervidos dos resíduos de *Pleurotus ostreatus* em diferentes concentrações sobre os juvenis de *Panagrellus redivivus*. As médias seguidas por letras iguais nas colunas não diferiram entre si pelo teste de Tukey a 5%.

A Figura 8 mostra os resultados obtidos utilizando o extrato de *P. ostreatus*. Após 24 horas, a concentração de 100% imobilizou 68,35% dos juvenis de *Panagrellus redivivus* e a concentração de 80% imobilizou 66,34% dos juvenis dessa espécie. Estatisticamente, não houve diferença significativa entre as diluições. A partir de 48 horas, nenhuma concentração

teve efeito significativo sobre os juvenis de *P. redivivus*. As concentrações de 60, 40 e 20% não apresentaram diferença significativa em relação ao grupo controle pelos períodos de 24, 48 e 72 horas.

A partir dos resultados, pode-se observar que as concentrações de 100 e 80% dos resíduos de *L. edodes* são eficazes em promover a paralisia dos juvenis de *Panagrellus redivivus* de forma semelhante nos períodos de 24, 48 e 72h. Já para os resíduos de *P. ostreatus*, a concentração de 100% e 80% teve uma eficácia significativa apenas nas primeiras 24 horas.

Esses resultados indicam que os extratos dos resíduos fúngicos, *L. edodes* e *P. ostreatus*, têm menor efeito sobre os nematoides de vida livre *P. redivivus* em concentrações abaixo de 80%. Estudos futuros devem ser realizados para determinar se concentrações abaixo de 80% são eficazes contra espécies de fitonematoides, pois isso aumentaria a especificidade dos efeitos desses resíduos sobre essas espécies, que são o alvo do problema.

5.5 Fracionamento dos extratos brutos

Os experimentos dos tópicos 5.5.1, 5.5.2 e 5.5.3 foram realizados a fim de identificar os compostos presentes nos extratos fúngicos com potencial ação nematostática. Como os resultados de atividade nematostática com o extrato fervido não apresentaram diferença quando comparados com o extrato não fervido e da possibilidade das moléculas com efeito nematostático serem termorresistentes, os experimentos foram realizados somente com o extrato fervido.

5.5.1 Ultrafiltração

Os dados da atividade nematostática utilizando os extratos fúngicos após a ultrafiltração estão representados na Figura 9.

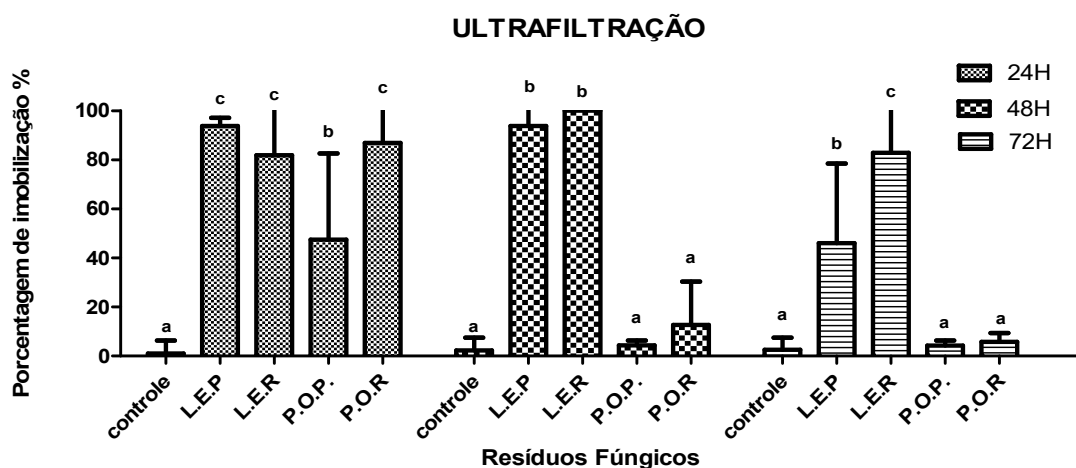


Figura 9. Atividade nematostática das frações permeadas e retidas dos extratos de *Lentinula edodes* e *Pleurotus ostreatus* sobre os juvenis de *Meloidogyne javanica* nos períodos de 24, 48 e 72 horas. As médias seguidas por letras iguais nas colunas

não diferiram entre si pelo teste de Tukey a 5%. L.E.P = *Lentinula edodes* permeado; L.E.R = *Lentinula edodes* retido; P.O.P = *Pleurotus ostreatus* permeado; P.O.R = *Pleurotus ostreatus* retido.

Os resíduos fúngicos de *L. edodes* e *P. ostreatus* foram escolhidos para dar continuidade aos experimentos por apresentarem uma ação nematostática melhor quando comparados com os outros resíduos fúngicos, como foi mostrado nos resultados de atividade nematostática sobre os juvenis de *M. incognita* e *M. javanica* (tópicos 5.1 e 5.2 presentes neste trabalho). O teste de atividade nematostática foi realizado tanto para as amostras que foram permeáveis à membrana de ultrafiltração, como também, as amostras que foram retidas pela membrana. O experimento foi realizado nos períodos de 24, 48 e 72 horas sobre os juvenis de *M. javanica*.

Após o período de 24 horas, a fração permeada pela membrana do extrato de *L. edodes* apresentou um efeito nematostático de 93,76% e a fração retida pela membrana um efeito de 81,87% sobre os juvenis de *M. javanica*, entretanto, estatisticamente eles não apresentaram diferença significativa. Depois de 48 horas, o efeito nematostático da fração permeada do extrato de *L. edodes* permaneceu com 93,81% e a fração retida com percentual de 100%, mas também não apresentaram diferença estatística. Após 72 horas, a fração permeada sofre um declínio em seu percentual, passando para 46,03% e a fração retida passa para 82,80%.

Já os resíduos fúngicos de *P. ostreatus* apresentaram comportamento diferente. Após o período de 24 horas, o percentual de imobilização dos juvenis de *M. javanica* foi de 47,49% para a fração permeada do extrato e de 86,90% para a fração retida. Após os períodos de 48 e 72 horas, em ambos os extratos, houve um declínio significativo no percentual de imobilização, não sendo significativamente diferentes do grupo controle.

Pelos resultados apresentados é possível identificar que nos resíduos fúngicos de *L. edodes* existem moléculas com efeito nematostático maiores que 10 kDa e menores que 10 kDa, não sendo possível identificar uma fração predominante com a presença de moléculas com ação nematostática. Já para o fungo *P. ostreatus*, é possível observar que o efeito nematostático foi somente no período de 24 horas e com maior eficácia no extrato retido, que obteve 86,90% de paralisação sobre os juvenis.

A fração permeada pela membrana pode conter metabólitos secundários, pois apresentam compostos com tamanho igual ou menores a 10 kDa. Os metabólitos secundários são compostos orgânicos com baixo peso molecular e não essenciais para o crescimento dos organismos. Essas moléculas exibem atividade antibacteriana, antifúngica e nematicida. Para os fungos, sua produção é uma forma de defesa e proteção em relação a competição com outros microrganismo no ambiente (KELLER *et al.*, 2005).

A composição do meio de cultivo e as condições de crescimento influenciam diretamente a síntese dos metabólitos secundários. Esses compostos são codificados por genes dispensáveis e nem todos os isolados de uma mesma espécie possui a capacidade de produzir o mesmo metabólito (MARTÍN *et al.*, 2005).

O fungo *Pochonia chlamydosporia* é um exemplo de organismo que sintetiza metabólitos secundários. Ele produz a aurovertina, um metabólito que pertence a classe dos policetídeos e se destaca devido ao seu efeito nematicida em fitonematoídeos de *M. incognita* (WANG *et al.*, 2015). Um grupo de metabólitos com atividade anti-helmíntica contra *H. contortus* denominados oligosporon, oligosporol A e 4'5'dihidro-oligosporon foram identificador em *A. oligospora* e *A. conoides*. Como também, outro grupo de anti-helmínticos chamado roserpins 1-5 foi obtido de *Clonostachys candelabrum* (OCAMPO-GUTIÉRREZ *et al.*, 2021).

5.5.2 Extração líquido-líquido em baixa temperatura

Os experimentos de extração líquido-líquido em baixa temperatura foram realizados utilizando as frações permeadas e retidas dos fungos *L. edodes* e *P. ostreatus* da etapa anterior (tópico 5.5.1). O teste de atividade nematicida foi realizado utilizando os juvenis de *M. javanica*. Os resultados são representados nas Figuras 10 e 11. Esta etapa foi realizada com intuito de separar as moléculas com base em sua polaridade, mostrando sua tendência a permanecer na fase aquosa ou orgânica.

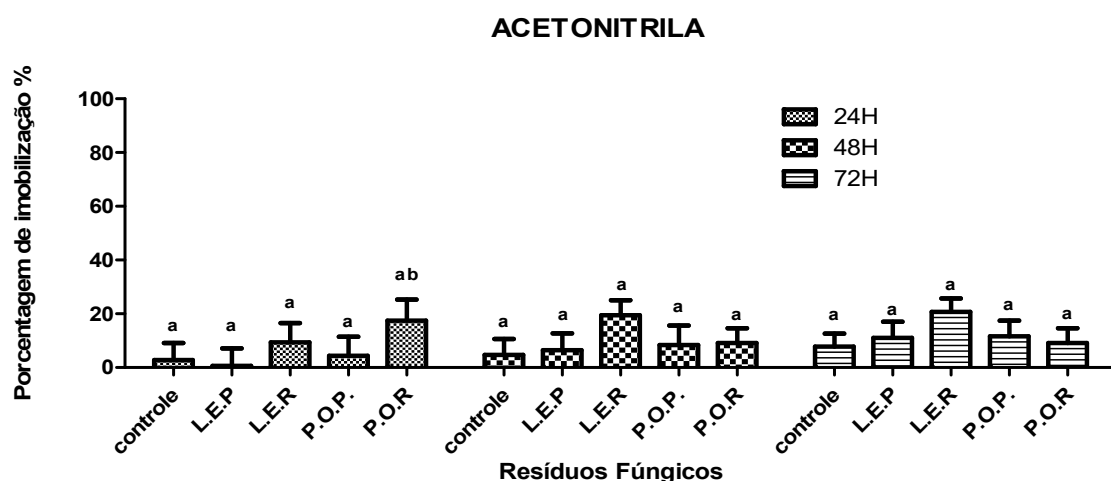


Figura 10. Atividade nematostática da fração orgânica (acetone) dos extratos de *Lentinula edodes* e *Pleurotus ostreatus* sobre os juvenis de *Meloidogyne javanica* nos períodos de 24, 48 e 72 horas. As médias seguidas por letras iguais nas colunas não diferiram entre si pelo teste de Tukey a 5%. L.E.P = *Lentinula edodes* permeado; L.E.R = *Lentinula edodes* retido; P.O.P = *Pleurotus ostreatus* permeado; P.O.R = *Pleurotus ostreatus* retido.

A Figura 10 apresenta os resultados obtidos usando a fração de acetonitrila (selecionada como solvente para a fase orgânica) para avaliar a atividade nematostática sobre os juvenis de *M. javanica*. É possível observar que nenhum extrato, tanto de *L. edodes* quanto *P. ostreatus*, teve efeito nematostático significativo. Esse comportamento permaneceu durante todo o período de 72 horas, indicando que as moléculas com efeito nematostático não possuem afinidade com a fase orgânica.

A Figura 11 apresenta os resultados obtidos usando as frações aquosas.

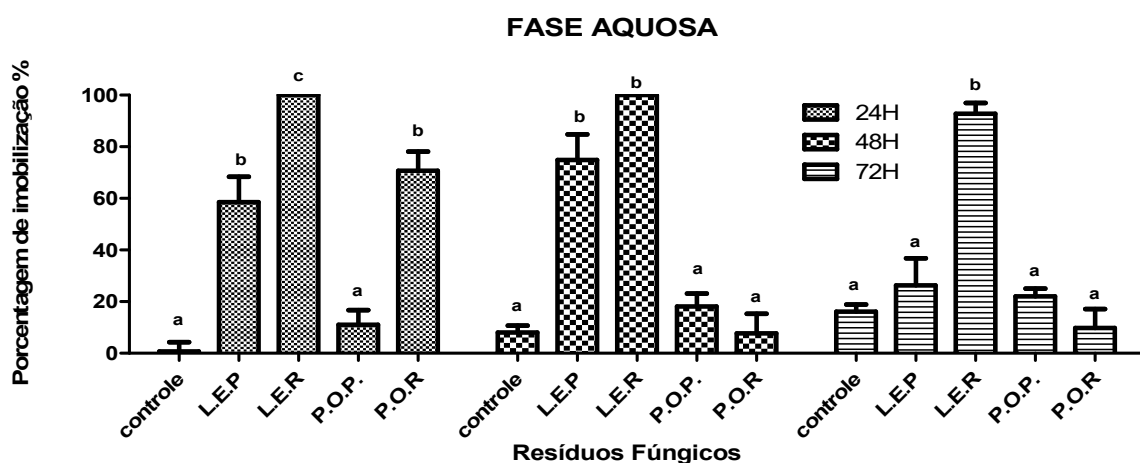


Figura 11. Atividade nematostática da fração aquosa dos extratos de *Lentinula edodes* e *Pleurotus ostreatus* sobre os juvenis de *Meloidogyne javanica* nos períodos de 24, 48 e 72 horas. As médias seguidas por letras iguais nas colunas não diferiram entre si pelo teste de Tukey a 5%. L.E.P = *Lentinula edodes* permeado; L.E.R = *Lentinula edodes* retido; P.O.P = *Pleurotus ostreatus* permeado; P.O.R = *Pleurotus ostreatus* retido.

Após 24 horas, a fase aquosa da fração permeada do extrato de *L. edodes* paralisou 58,57% dos juvenis de *M. javanica* e a fase aquosa da fração retida do extrato paralisou de 100% dos juvenis. Em 48 horas, a fase aquosa da fração permeada aumentou seu efeito, paralisando 74,90% dos juvenis e a fase aquosa da fração retida permaneceu imobilizando 100% dos juvenis. Depois de 72 horas, a fase aquosa da fração permeada diminuiu seu efeito nematostático para 26,29%, passando a não apresentar diferença significativa com o grupo controle. Já fase aquosa da fração retida manteve seu efeito nematostático em 92,80%.

Os extratos dos resíduos do fungo *P. ostretus* apresentaram comportamento semelhante aos experimentos de ultrafiltração (tópico 5.5.2). Em 24 horas, a fase aquosa da fração permeada do extrato teve uma ação nematostática de 11,03% e a fase aquosa da fração retida de 70,73%. Depois de 48 horas, essa ação foi 18,15% para a fase aquosa da fração permeada e de 7,72% para a fase aquosa da fração retida, ambos sem diferença significativa do grupo controle. Por fim, às 72 horas, para a fase aquosa da fração permeada foi de 22,06% e de 9,76% para a fase aquosa da fração retida, também sem diferença significativa do grupo controle.

É possível observar que as moléculas com efeito nematostático são polares, permanecendo presentes nos extratos aquosos para ambos os resíduos fúngicos, *L. edodes* e *P. ostreatus*. O fungo *L. edodes* continuou apresentando ação nematostática tanto na fração permeada aquosa do extrato quanto na fração retida, porém, foi mais eficaz na fração retida. Já o fungo *P. ostreatus* apresentou atividade nematostática somente na fase aquosa da fração retida pelo período de 24 horas.

Os bionematicidas são produtos de natureza biológica, são biodegradáveis e requerem menos etapas de pré-tratamento antes da aplicação no solo (BARBOSA *et al.*, 2006). No caso bionematicidas formados por compostos polares, como os extratos aquosos dos resíduos de *L. edodes* e *P. ostreatus*, essa facilidade é ainda maior. Esses compostos são solúveis em água, o que torna sua aplicação aos agricultores mais fácil, como também são inócuos ao meio ambiente e aos seres humanos, evitando a contaminação do solo e águas.

Estima-se que anualmente ocorram cerca de 385 milhões de incidentes por envenenamento não fatal por nematicidas, com cerca de 11.000 mortes (RASOOL *et al.*, 2022). Assim, o uso de agentes químicos no controle de fitonematoides tem despertado a atenção devido ao seu impacto negativo no meio ambiente, sendo responsáveis pela contaminação de solos e água. Esses compostos químicos são encontrados em lagos e rios que estejam próximos a campos agrícolas. A contaminação das águas decorre do escoamento do campo agrícola, onde os pesticidas solúveis são levados pelas moléculas de água, infiltrando-se nas camadas do solo e, eventualmente, atingindo as águas superficiais e subterrâneas (SYAFRUDIN *et al.*, 2021).

O acúmulo dessas substâncias na água pode ser amplificado na cadeia alimentar, pois níveis tróficos mais elevados também apresentam as substâncias presentes nos organismos que serviram de alimento, tornando-se uma ameaça aos seres humanos. Esse efeito é conhecido como bioacumulação (SHARMA *et al.*, 2019). Portanto, é evidente a importância de alternativas para o controle desses parasitas, como o uso de bionematicida.

5.5.3 Espectrometria de massas

A fração aquosa retida do extrato de *L. edodes* foi analisada por LC/MS-MS e essa continha várias massas de baixo e alto peso molecular, indicando que a amostra não estava pura, como é mostrado na Figura 12. Os fragmentos dessas massas não apresentaram similaridade com nenhum dos compostos da biblioteca quando comparados aos espectros do banco de dados. As fragmentações ocorreram de forma satisfatória, não sendo esse o motivo para não identificação dos compostos.

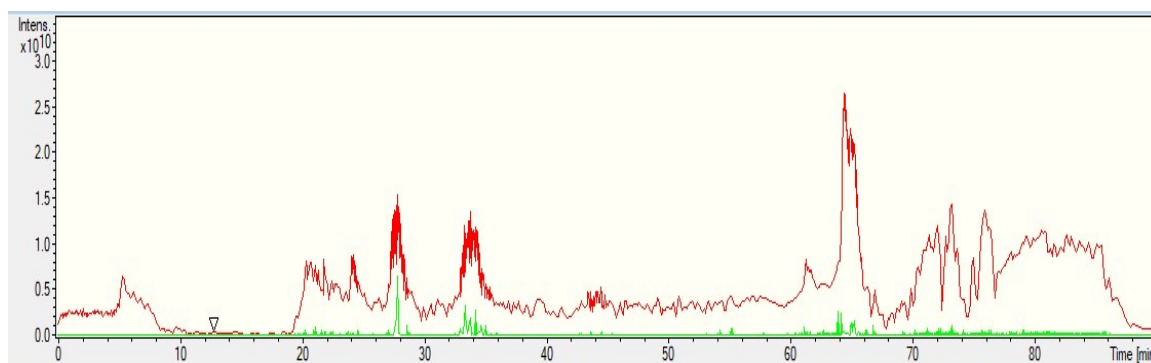


Figura 12. Espectro obtido a partir da análise de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC/MS-MS) da fração aquosa retida do extrato de *Lentinula edodes*.

Cruz-arévalo *et al.* (2020) obtiveram resultados satisfatórios para identificação da composição química de extratos de *Pleurotus eryngii* por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GS-MS). Extratos hidroalcolólicos de uma cepa de *P. eryngii* foram submetidos a uma coluna cromatográfica de fase normal e a fração com maior eficácia foi analisada por GM-MS. A análise mostrou que a fração era composta de trealose CAS: 6138-23-4, polióis (L-íditol CAS: 488-45-9, galactitol CAS: 608-66-2, D-manitol CAS: 69-65-8, D-glucitol CAS: 50-70-4 e mioinositol CAS: 87-89-8), ácido adípico CAS: 124-04-9, ácido esteárico CAS: 57-11-4, esqualeno CAS: 111-02-4 e β -sitosterol CAS: 83-46-5.

Portanto, pode ser útil aplicar outras técnicas para identificar compostos com efeito nematostático. A maior purificação dos extratos e o uso de equipamentos com maior acurácia, como espectrômetros de massas com analisadores de tempo de voo (Q-TOF), podem melhorar a eficiência do processo de identificação de compostos, e também, a utilização de outros métodos, como o GS/MS-MS.

6

CONCLUSÃO

A partir desse estudo, foi possível avaliar que os extratos e frações dos resíduos fúngicos de *L. edodes* e *P. ostreatus*, oriundos da produção de cogumelos comestíveis, foram eficazes em paralisar os juvenis de *M. incognita* e *M. javanica*, principalmente após as primeiras 24 horas. Esse efeito foi observado para os extratos fervidos e para os extratos não fervidos, indicando que os compostos responsáveis pelo efeito nematostático são moléculas termorresistentes. Os resíduos dos fungos *H. marmoreus*, *F. velutipes*, *P. eryngii* e *Pleurotus sp.* apresentaram uma redução na motilidade inferior a 40% após os períodos de 24, 48 e 72h, não sendo eficazes na paralisação de juvenis de *M. incognita* e *M. javanica*. Para o nematoide modelo, *P. redivivus*, esse efeito nematostático foi menor quando comparado aos fitonematoides. Não foi possível identificar os compostos com ação nematostática, sendo necessário aplicação de novas técnicas para a identificação dessas moléculas, como uma maior purificação dos extratos e uso de métodos espectrométricos de maior acurácia.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ABD-ELGAWAD, M. M. M.; ASKARY, T. H. Fungal and bacterial nematicides in integrated nematode management strategies. **Egyptian Journal Of Biological Pest Control**, [S.L.], v. 28, n. 1, p. 1-24, 24 set. 2018. Springer Science and Business Media LLC

AKHTAR, M.; MALIK, A. Roles of organic soil amendments and soil organisms in the biological control of plant-parasitic nematodes: a review. **Bioresource Technology**, [S.L.], v. 74, n. 1, p. 35-47, ago. 2000. Elsevier BV.

ALCÂNTARA, V. S. B; AZEVEDO, J. L. de. Isolamento e seleção de fungos predadores de nematoide. **Revista de Agricultura**, Paracicaba, v. 56, p. 132-146, 1981

ALI, M. A.; AZEEM, F.; ABBAS, A.; JOYIA, F. A.; LI, H.; DABABAT, A. A. Transgenic Strategies for Enhancement of Nematode Resistance in Plants. **Frontiers In Plant Science**, [S.L.], v. 8, p. 1-13, 9 maio 2017. Frontiers Media SA.

ALVEAR-DÍAZ, L. V. *Evaluación de la actividad nematocida del hongo Pleurotus ostreatus in vitro en diferentes concentraciones sobre dos especies de nematodos*, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, 2018.

BAERMANN, G. Eine einfache Methode Zur Auffindung von Ankvlostomum (nematoden) Larven in Erdproben. **Tijdschr. Ned.-Indie**, v.57, 1917. p.131-137.

BARBOSA, F. R.; DA SILVA, C. S. B.; CARVALHO, GK de L. Uso de inseticidas alternativos no controle de pragas agrícolas. **Embrapa Semiárido-Documentos (INFOTECA-E)**, 2006.

BARKER, K. R. Introduction and Synopsis of Advancements in Nematology. **Plant And Nematode Interactions**, [S.L.], p. 1-20. 1998. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America.

BLAKELY, J. K.; A. N., Deborah; SPONGBERG, Alison L. Soil invertebrate and microbial communities, and decomposition as indicators of polycyclic aromatic hydrocarbon contamination. **Applied Soil Ecology**, [S.L.], v. 21, n. 1, p. 71-88, jul. 2002. Elsevier BV.

BRAGA, F. R.; de ARAÚJO, J. V. Nematophagous fungi for biological control of gastrointestinal nematodes in domestic animals. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [S.L.], v. 98, n. 1, p. 71-82, 22 nov. 2013. Springer Science and Business Media LLC.

CASTAÑEDA-RAMÍREZ, G. S.; TORRES-ACOSTA, J. F. J.; SÁNCHEZ, J. E.; MENDOZA-DE-GIVES, P.; GONZÁLEZ-CORTÁZAR, M.; ZAMILPA, A.; AL-ANI, L. K. T.; SANDOVAL-CASTRO, C.; SOARES, F. E. F.; AGUILAR-MARCELINO, L.. The Possible Biotechnological Use of Edible Mushroom Bioproducts for Controlling Plant and Animal Parasitic Nematodes. **Biomed Research International**, [S.L.], v. 2020, p. 1-12, 24 jun. 2020.

CHEN, S.Y.; DICKSON, D.W. A technique for determining live second-stage juveniles of *Heterodera glycines*. **Journal of Nematology**, [S.L.], v. 32, p.117-121, 2000.

COMANS-PÉREZ, R. J.; SÁNCHEZ, J.; AL-ANI, L. K. T.; GONZÁLEZ-CORTÁZAR, M.; CASTAÑEDA-RAMÍREZ, G. S.; GIVES, P. M.; SÁNCHEZ-GARCÍA, A. D.; MILLÁN-OROZCO, J.; AGUILAR-MARCELINO, L. Biological control of sheep nematode *Haemonchus contortus* using edible mushrooms. **Biological Control**, [S.L.], v. 152, p. 104420, jan. 2021. Elsevier BV.

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

CORREIA, É. C. S. D. S., NEVES, M. I. R. D. S., DA SILVA, L. S., DOS SANTOS, D. S., & NETO, F. J. D. Estratégias e desafios no manejo de nematoides formadores de galhas

(*Meloidogyne spp.*) em cultivos de olerícolas: uma revisão. **Revista Mirante**, [S.L], v. 10, n. 5, p. 19-33, 2017.

CRUZ-ARÉVALO, J.; SÁNCHEZ, J. E.; GONZÁLEZ-CORTÁZAR, M.; ZAMILPA, A.; ANDRADE-GALLEGOS, R. H.; MENDOZA-DE-GIVES, P.; AGUILAR-MARCELINO, L. Chemical Composition of an Anthelmintic Fraction of *Pleurotus eryngii* against Eggs and Infective Larvae (L3) of *Haemonchus contortus*. **Biomed Research International**, [S.L.], v. 2020, p. 1-8, 6 ago. 2020.

DALLEMOLE-GIARETTA, R.; FREITAS, L. G.; LOPES, E. A.; PEREIRA, O. L.; ZOOCA, R. J.F.; FERRAZ, S. Screening of *Pochonia chlamydosporia* Brazilian isolates as biocontrol agents of *Meloidogyne javanica*. **Crop Protection**, [S.L.], v. 42, p. 102-107, dez. 2012. Elsevier BV.

DEGENKOLB, T.; VILCINSKAS, A. Metabolites from nematophagous fungi and nematicidal natural products from fungi as alternatives for biological control. Part II: metabolites from nematophagous basidiomycetes and non-nematophagous fungi. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [S.L.], v. 100, n. 9, p. 3813-3824, 4 jan. 2016. Springer Science and Business Media LLC

DRECHSLER, C. Some hyphomycetes parasitic on free-living terricolous nematodes. **Phytopathology**, v. 31, n. 9, p. 773-802, 1941.

DONG, J. Y.; LI, X. P.; LI, L.; LI, G. H.; LIU, Y. J.; ZHANG, K. Q. Preliminary results on nematicidal activity from culture filtrates of Basidiomycetes against the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* (Aphelenchoididae). **Annals of Microbiology**, v. 56, n. 2, p. 163-166, 2006.

DUBREUIL, G.; MAGLIANO, M.; DELEURY, E.; ABAD, P.; ROSSO, M. N. Transcriptome analysis of root-knot nematode functions induced in the early stages of parasitism. **New Phytologist**, [S.L.], v. 176, n. 2, p. 426-436, out. 2007. Wiley.

EBONE, L. A.; KOVALESKI, M.; DEUNER, C. C. Nematicides: history, mode, and mechanism action. **Plant Science Today**, [S.L.], v. 6, n. 2, p. 91-97, 31 mar. 2019. Horizon E-Publishing Group.

FEIST, E.; KEARN, J.; GAIHRE, Y.; O'CONNOR, V.T; HOLDEN-DYE, L. The distinct profiles of the inhibitory effects of fluensulfone, abamectin, aldicarb and fluopyram on *Globodera pallida* hatching. **Pesticide Biochemistry And Physiology**, [S.L.], v. 165, p. 104541, maio 2020. Elsevier BV.

FERRAZ, L. C. C. B.; BROWN, D. J. F. Nematologia de plantas: fundamentos e importância. **Manaus: Norma Editora**, v. 1, p. 251, 2016.

FERRAZ, S.; de FREITAS, L. G. O controle de fitonematoides por plantas antagonistas e produtos naturais. **Departamento de Fitopatologia-UFV**, p. 1-17, 2008.

FERREIRA, J. M.; CARREIRA, D. N.; BRAGA, F. R.; SOARES, FREITAS, F. E. First report of the nematicidal activity of *Flammulina velutipes*, its spent mushroom compost and metabolites. **3 Biotech**, [S.L.], v. 9, n. 11, p. 1-6, 22 out. 2019. Springer Science and Business Media LLC.

FLEMING, T. R.; MCGOWAN, N. E.; MAULE, A. G.; FLEMING, C. C. Prevalence and diversity of plant parasitic nematodes in Northern Ireland grassland and cereals, and the influence of soils and rainfall. **Plant Pathology**, [S.L.], v. 65, n. 9, p. 1539-1550, 31 mar. 2016. Wiley.

FUKUSHIMA-SAKUNO, E. Bioactive small secondary metabolites from the mushrooms *Lentinula edodes* and *Flammulina velutipes*. **The Journal Of Antibiotics**, [S.L.], v. 73, n. 10, p. 687-696, 30 jul. 2020. Springer Science and Business Media LLC.

GÓMEZ, J. D.; VITAL, C. E.; OLIVEIRA, M. G. A.; RAMOS, H. J. O. Broad range flavonoid profiling by LC/MS of soybean genotypes contrasting for resistance to *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: noctuidae). **Plos One**, [S.L.], v. 13, n. 10, p. 1-24, 3 out. 2018. Public Library of Science (PLoS)

GOULART, A. M. C. Aspectos gerais sobre nematoides das lesões radiculares (gênero *Pratylenchus*). **Embrapa Cerrados-Documentos (INFOTECA-E)**, 2008.

GUEDIRA, A.; RAMMAH, A.; TRIQUI, Z.; CHLYAH, H.; CHLYAH, B.; HAÏCOUR, R. Évaluation de la résistance à deux nématodes: *radopholus similis* et *meloidogyne* spp. chez quatre génotypes de bananiers au maroc. **Comptes Rendus Biologies**, [S.L.], v. 327, n. 8, p. 745-751, ago. 2004. Elsevier BV.

HAEGEMAN, A.; MANTELIN, S.; JONES, J. T.; GHEYSEN, G. Functional roles of effectors of plant-parasitic nematodes. **Gene**, [S.L.], v. 492, n. 1, p. 19-31, jan. 2012. Elsevier BV.

HAHN, M. H.; MIO, L. L. M.; KUHN, O. J.; DUARTE, H. S. S. Nematophagous mushrooms can be an alternative to control *Meloidogyne javanica*. **Biological Control**, [S.L.], v. 138, p. 104024, nov. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104024>.

HEYDARI, R.; POURJAM, E.; GOLTAPPEH, E. Mohammadi. Antagonistic effect of some species of *Pleurotus* on the root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* in vitro. **Plant Pathology Journal**, v. 5, n. 2, p. 173-177, 2006.

GENIER, H. L. A.; SOARES, F. E. F.; QUEIROZ, J. H.; ANGELICA, S. G.; ARAÚJO, J. V. ; BRAGA, F. R. ; PINHEIRO, I. R.; KASUYA, M. C. M. Activity of the fungus *Pleurotus ostreatus* and of its proteases on *Panagrellus* sp. larvae. **African Journal Of Biotechnology**, [S.L.], v. 14, n. 17, p. 1496-1503, 29 abr. 2015. Academic Journals.

JENKINS, W. R. B. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. **Plant disease reporter**, v. 48, n. 9, 1964.

JONES, J. T.; HAEGEMAN, A.; DANCHIN, E. G. J.; GAUR, H. S.; HELDER, J.; JONES, M. G. K.; KIKUCHI, T.; MANZANILLA-LÓPEZ, R.; PALOMARES-RIUS, J. E.; WESEMAEL, W. M. L. Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, [S.L.], v. 14, n. 9, p. 946-961, 1 jul. 2013. Wiley.

KELLER, N. P.; TURNER, G.; BENNETT, J. W. Fungal secondary metabolism from biochemistry to genomics. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, p. 937-947, 2005.

KIMURA, Karin *et al.* **Variedades de cogumelos são novidades do mercado:** pouco conhecidas no Brasil, espécies diferentes ganham espaço na produção nacional. 2010. Disponível em: <https://www.nippo.com.br/campo/especiais/especial557.php#:~:text=No%20s%C3%ADtio%20Urakami%2C%20o%20cultivo,verticalizada%20e%20disposta%20em%20prateleiras>. Acesso em: 31 jun. 2022.

KWOK, O. C. H.; PLATTNER, R.; WEISLEDER, D.; WICKLOW, D. T. A nematocidal toxin from *Pleurotus ostreatus* NRRL 3526. **Journal Of Chemical Ecology**, [S.L.], v. 18, n. 2, p. 127-136, fev. 1992. Springer Science and Business Media LLC.

LEE, D.L. (Ed.). **The biology of nematodes**. CRC Press, 2002.

LEIVA, N. P. F.; SANTANA-GOMES, S. M.; ZABINI, A. V.; VELÁZQUEZ, L. M. G.; DIAS-ARIEIRA, C. R. Soil chemical properties and their relationship with phytonematode populations inside and outside patches of soybean fields. **Rhizosphere**, v. 15, p. 100231, 2020.

LISEC, J.; SCHAUER, N.; KOPKA, J.; WILLMITZER, L.; FERNIE, A. R. Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. **Nature Protocols**, [s.l.], v. 1, n. 1, p. 387-396, jun. 2006. Springer Science and Business Media LLC.

LIU, X.; XIANG, M.; CHE, Y.. The living strategy of nematophagous fungi. **Mycoscience**, [S.L.], v. 50, n. 1, p. 20-25, jan. 2009. Elsevier BV.

LOPEZ-LLORCA, L. V.; MACÍÁ-VICENTE, J. G.; JANSSON, H.-B.. Mode of Action and Interactions of Nematophagous Fungi. **Integrated Management And Biocontrol Of Vegetable And Grain Crops Nematodes**, [S.L.], p. 51-76, 2008. Springer Netherlands

MACIEL, M. J. M.; SILVA, A. C.; RIBEIRO, H. C.T. Industrial and biotechnological applications of ligninolytic enzymes of the basidiomycota: a review. **Electronic Journal Of Biotechnology**, [S.L.], v. 13, n. 6, p. 0-13, 15 nov. 2010.

MACHADO, A. C.; SILVA, S. A.; FERRAZ, L. C. B. **Métodos em nematologia agrícola**. Piracicaba: Sociedade Brasileira de Nematologia, 2019. 212 p.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Mercado de biodefensivos cresce mais de 70% no Brasil em um ano. 2019. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/feffmercado-de-biodefensivos-cresce-em-mais-de-50-no-brasil>>. Acessado em: 7 set. 2020.

MARTÍN, J. F.; CASQUEIRO, J.; LIRAS, P.. Secretion systems for secondary metabolites: how producer cells send out messages of intercellular communication. **Current Opinion In Microbiology**, [S.L.], v. 8, n. 3, p. 282-293, jun. 2005. Elsevier BV.

MAYER, A.; ANKE, H.; STERNER, O. Omphalotin, A New Cyclic Peptide with Potent Nematicidal Activity from *Omphalotus Olearius* I. Fermentation and Biological Activity. **Natural Product Letters**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 25-32, abr. 1997. Informa UK Limited.

MCSORLEY, R. Adaptations of nematodes to environmental extremes. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 86, n. 2, p. 138-142, 2003.

MOENS, M.; PERRY, R. N. Migratory Plant Endoparasitic Nematodes: a group rich in contrasts and divergence. **Annual Review Of Phytopathology**, [S.L.], v. 47, n. 1, p. 313-332, set. 2009. Annual Reviews.

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

NIGON, V. M.; FÉLIX, M. A. History of research on *C. elegans* and other free-living nematodes as model organisms. **WormBook: The Online Review of C. elegans Biology**, 2018.

NORDBRING-HERTZ, B.; JANSSON, H.; TUNLID, A. Nematophagous fungi. **e LS**, 2001.

OCAMPO-GUTIÉRREZ, A. Y.; HERNÁNDEZ-VELÁZQUEZ, V. M.; AGUILAR-MARCELINO, L.; CARDOSO-TAKETA, A.; ZAMILPA, A.; LÓPEZ-ARELLANO, M. E.;

GONZÁLEZ-CORTÁZAR, M.; HERNÁNDEZ-ROMANO, J.; REYES-ESTEBANEZ, M.; GIVES, P. M. Morphological and molecular characterization, predatory behaviour and effect of organic extracts of four nematophagous fungi from Mexico. **Fungal Ecology**, [S.L.], v. 49, p. 101004, fev. 2021. Elsevier BV.

OLIVEIRA, C. M. G.; KUBO, R. K. Nematoides parasitos de plantas ornamentais. **Reunião Itinerante de Fitossanidade do Instituto Biológico**, v. 14, p. 27-33, 2008.

OLIVEIRA, C. M. G.; ROSA, J. M. O.; GIORIA, R.; BRAGA, K. R. B. Nematoides. **Hortalças-Fruto**, [S.L.], p. 315-338, 2018. EDUEM

OLIVEIRA, M. K. R. S.; CHAVES, A.; VIEIRA, D. A. N.; SILVA, E.J.; RODRIGUES, W. D. L. Controle biológico de fitonematóides do gênero *Pratylenchus* através de inoculante natural em cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias - Brazilian Journal Of Agricultural Sciences**, [S.L.], v. 6, n. 2, p. 203-207, 7 jun. 2011. Revista Brasileira de Ciencias Agrarias.

PADILHA, T. Atividade de fungos nematófagos nos estágios pré-parasitários de nematódeos trichostrongilídeos. **Ciência Rural**, v. 26, n. 2, p. 333-341, 1996.

PINEDA-ALEGRÍA, J. A.; SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, J. E.; GONZÁLEZ-CORTAZAR, M.; ZAMILPA, A.; LÓPEZ-ARELLANO, M. E.; CUEVAS-PADILLA, E. J.; MENDOZA-DE-GIVES, P.; AGUILAR-MARCELINO, L. The Edible Mushroom *Pleurotus djamor* Produces Metabolites with Lethal Activity Against the Parasitic Nematode *Haemonchus contortus*. **Journal Of Medicinal Food**, [S.L.], v. 20, n. 12, p. 1184-1192, dez. 2017. Mary Ann Liebert Inc.

RASOOL, S.; RASOOL, T.; GANI, K. M. A review of interactions of pesticides within various interfaces of intrinsic and organic residue amended soil environment. **Chemical Engineering Journal Advances**, [S.L.], v. 11, p. 100301, ago. 2022. Elsevier BV.

RIBEIRO, L. M.; CAMPOS, H. D.; NEVES, D. L.; DIAS-ARIEIRA, C. R. Survival of *Pratylenchus brachyurus* under dry soil conditions. **Heliyon**, [S.L.], v. 6, n. 9, p. 1-6, set. 2020. Elsevier BV.

RITZINGER, C. H. S. P.; FANCELLI, M.; RITZINGER, R. Nematoides: bioindicadores de sustentabilidade e mudanças edafoclimáticas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, [S.L.], v. 32, n. 4, p. 1289-1296, dez. 2010. FapUNIFESP (SciELO).

ROCHA, T. L.; SOLL, C. B.; BOUGHTON, B. A.; SILVA, T. S.; OLDACH, K.; FIRMINO, A. A.P.; CALLAHAN, D. L.; SHEEDY, J.; SILVEIRA, E. R.; CARNEIRO, R. M.D.G. Prospection and identification of nematotoxic compounds from *Canavalia ensiformis* seeds effective in the control of the root knot nematode *Meloidogyne incognita*. **Biotechnology Research And Innovation**, [S.L.], v. 1, n. 1, p. 87-100, jan. 2017. Elsevier BV.

RUBNER, A. Revision of predacious Hyphomycetes in the *Dactylella* – *Monacrosporium* complex. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 39, p. 1-134, 1996.

SANTANA, V. S.; MOURA, M. C. P.; NOGUEIRA, F. F. Mortalidade por intoxicação ocupacional relacionada a agrotóxicos, 2000-2009, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, [S.L.], v. 47, n. 3, p. 598-606, jun. 2013. FapUNIFESP (SciELO).

SBN - Sociedade Brasileira de Nematologia, 2017. Disponível em. <http://nematologia.com.br/>

SHARMA, A.; KUMAR, V.; SHAHZAD, B.; TANVEER, M.; SIDHU, G. P. S.; HANDA, N.; KOHLI, S. K.; YADAV, P.; BALI, A. S.; PARIHAR, R. D. Worldwide pesticide usage and its impacts on ecosystem. **Sn Applied Sciences**, [S.L.], v. 1, n. 11, p. 1-16, 21 out. 2019. Springer Science and Business Media LLC.

SIDDIQUE, S.; GRUNDLER, F. M. Parasitic nematodes manipulate plant development to establish feeding sites. **Current Opinion In Microbiology**, [S.L.], v. 46, p. 102-108, dez. 2018. Elsevier BV.

SILVA, G; L.; SILVA, I. L. G.; GARCIA, L. R. S. Análise da letalidade por intoxicação relacionada aos agrotóxicos no Brasil. **Biosaúde**, v. 20, n. 1, p. 1-10, 2018.

SILVÉRIO, F. O.; SILVA, J. G. S.; AGUIAR, M. C. S.; CACIQUE, A. P.; PINHO, G. P. Análise de agrotóxicos em água usando extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura por cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, [S.L.], v. 35, n. 10, p. 2052-2056, 2012. FapUNIFESP (SciELO).

SOARES, F. E. F.; GÔLO, P. S.; FERNANDES, É. K. K. Nematophagous and entomopathogenic fungi: new insights into the beneficial fungus-plant interaction. **Molecular Aspects Of Plant Beneficial Microbes In Agriculture**, [S.L.], p. 295-304, 2020. Elsevier.

SOARES, F. E. F.; NAKAJIMA, V. M.; SUFIATE, B. L.; SATIRO, L. A. S.; GOMES, E. H.; FRÓES, F. V.; QUEIROZ, J. H. Proteolytic and nematicidal potential of the compost colonized by *Hypsizygus marmoreus*. **Experimental parasitology**, 197, 16-19, 2019.

SOARES, F. E. F.; QUEIROZ, J. H.; ARAUJO, J. V.; RODRIGUES, M. G. R.; TAVELA, A. O.; AGUIAR, A. R.; LACERDA, T.; FERRAZ, C. M.; RANGEL, M. C. V.; SENNA, T. Action of proteases of the nematophagous fungi *Pochonia chlamydosporia* on *Ascaris suum* eggs of collared peccary (*Pecari tajacu*). **African Journal Of Microbiology Research**, [S.L.], v. 9, n. 31, p. 1883-1886, 5 ago. 2015. Academic Journals.

SOARES, F. E. F.; SUFIATE, B. L.; DE QUEIROZ, J. H. Nematophagous fungi: Far beyond the endoparasite, predator and ovicidal groups. **Agriculture and Natural Resources**, v. 52, n. 1, p. 1-8, 2018.

SOARES, P. L. M. **Estudo do controle biológico de fitonematóides com fungos nematófagos**. 252 f. Tese (Doutorado) – Agronomia, Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2006.

SODER, K.J.; HOLDEN, L.A. Use of Nematode-Trapping Fungi as a Biological Control in Grazing Livestock. **The Professional Animal Scientist**, [S.L.], v. 21, n. 1, p. 30-37, fev. 2005. American Registry of Professional Animal Scientists.

SUFIATE, B. L.; SOARES, F. E. F.; MOREIRA, S. S.; GOUVEIA, A. S.; MONTEIRO, T. S. A.; FREITAS, L. G.; QUEIROZ, J. H. Nematicidal action of *Pleurotus eryngii*

metabolites. **Biocatalysis And Agricultural Biotechnology**, [S.L.], v. 12, p. 216-219, out. 2017. Elsevier BV.

SYAFRUDIN, M.; KRISTANTI, R. A.; YUNIARTO, A.; HADIBARATA, T.; RHEE, J.; AL-ONAZI, W. A.; ALGARNI, T. S.; ALMARRI, A. H.; AL-MOHAIMEED, A. M. Pesticides in Drinking Water—A Review. **International Journal Of Environmental Research And Public Health**, [S.L.], v. 18, n. 2, p. 468, 8 jan. 2021. MDPI AG.

TRIANAPHYLLOU, A.C.; ESBENSHADE, P.R. Demonstração de múltiplos acasalamentos em *Heterodera glycines* com marcadores bioquímicos. **Journal of Nematology**, v. 22, n. 4, pág. 452, 1990.

VANHOLME, B.; MEUTTER, J. D.; TYTGAT, T.; MONTAGU, M. V.; COOMANS, A.; GHEYSEN, G. Secretions of plant-parasitic nematodes: a molecular update. **Gene**, [S.L.], v. 332, p. 13-27, maio 2004. Elsevier BV.

VARANDAS, R., EGAS, C., CONCEIÇÃO, I.L. Potato cyst nematodes: New solutions to an old problem., **Crop Protectio**. 2020.

WANG, Y.; LI, .; LI, D.; WANG, B.; ZHANG, K.; NIU, X. Yellow Pigment Aurovertins Mediate Interactions between the Pathogenic Fungus *Pochonia chlamydosporia* and Its Nematode Host. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [S.L.], v. 63, n. 29, p. 6577-6587, 17 jul. 2015. American Chemical Society (ACS).

WILLE, C. N.; GOMES, C. B.; MINOTTO, E.; NASCIMENTO, J. Potential of aqueous extracts of basidiomycetes to control root-knot nematodes on lettuce. **Horticultura Brasileira**, [S.L.], v. 37, n. 1, p. 54-59, mar. 2019. FapUNIFESP (SciELO).

WILLIAMSON, V. M.; GLEASON, C. A. Plant–nematode interactions. **Current Opinion In Plant Biology**, [S.L.], v. 6, n. 4, p. 327-333, ago. 2003. Elsevier BV.

XIE, C.; YAN, S.; ZHANG, Z.; GONG, W.; ZHU, Z.; ZHOU, Y.; YAN, L.; HU, Z.; AI, L.; PENG, Y. Mapping the metabolic signatures of fermentation broth, mycelium, fruiting body

and spores powder from *Ganoderma lucidum* by untargeted metabolomics. *Lwt*, [S.L.], v. 129, p. 1-9, jul. 2020. Elsevier BV