



NATHÁLIA NASCIMENTO GUIMARÃES

**EXTRATOS DO FUNGO *Pochonia chlamydosporia* NO CONTROLE DE
Meloidogyne javanica NO TOMATEIRO**

**LAVRAS – MG
2022**

NATHÁLIA NASCIMENTO GUIMARÃES

**EXTRATOS DO FUNGO *Pochonia chlamydosporia* NO CONTROLE DE
Meloidogyne javanica NO TOMATEIRO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 03 de fevereiro de 2022
Dr. Paulo Estevão de Souza DFP/ UFLA
Dr. Vicente Paulo Campos DFP/ UFLA
Dr. Bruna Leite Sufiate UFV

Prof. Dr. Paulo Estevão de Souza
Orientador

Prof. Dr. Filippe Elias de Freitas Soares
Coorientador

**LAVRAS – MG
2022**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Guimarães, Nathália Nascimento.

Extratos do Fungo *Pochonia chlamydosporia* no Controle de
Meloidogyne javanica no Tomateiro / Nathália Nascimento
Guimarães. - 2022.

53 p.

Orientador(a): Paulo Estevão de Souza.

Coorientador(a): Filippe Elias de Freitas Soares.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2022.

Bibliografia.

1. Nematoides de galhas. 2. Fungos nematófagos. 3. Controle
bioquímico. I. de Souza, Paulo Estevão. II. de Freitas Soares,
Filippe Elias. III. Título.

Dedico este trabalho de pesquisa aos meus pais, minha irmã Lara. Sua grande força foi a mola propulsora que permitiu o meu avanço, mesmo durante os momentos mais difíceis. Agradeço do fundo do meu coração.

Dedico

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Agradeço primeiro a Deus por ter me mantido na trilha certa durante este projeto de pesquisa com saúde e forças para chegar até o final.

Sou grata aos meus pais e minha irmã Lara pelo apoio que sempre me deram durante toda a minha vida.

À Universidade Federal de Lavras por me proporcionar a realização de um sonho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pela bolsa de estudo.

Ao Prof. Dr. Vicente Paulo Campos, pela ajuda e por ter oferecido o laboratório de Nematologia para meu projeto, Willian pela grande ajuda, orientação e compreensão, Prof. Dr. Filippe por ter orientado e ajudado em todo meu projeto de pesquisa, Prof. Dr. Leandro Grassi de Freitas por ter fornecido o isolado VCP1 de *Pochonia chlamydosporia*, Prof. Dr. Paulo Estevão por ter aceitado ser meu orientador e aos demais professores do Departamento de Fitopatologia - DFP/UFLA, pelos ensinamentos.

Aos colegas do laboratório de Nematologia, Paulo, Letícia, Mauricio, Jennifer e o Henry do laboratório de Bioquímica pelo auxílio nos experimentos, e ao meu amigo Tiago pelo apoio e incentivo.

Aos membros da banca Vicente Paulo Campos e Bruna Leite Sufiate, e aos suplentes Filippe Elias de Freitas Soares e Cícero José da Silva por aceitarem o convite e contribuírem com este trabalho.

MUITO OBRIGADA!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	15
2.1. Objetivo Geral	15
2.3. Objetivos Especificos	15
3. REFERENCIAL TEÓRICO	15
3.1. Aspectos Gerais da Cultura do Tomateiro.....	15
3.2. Nematoides na Cultura do Tomateiro.....	16
3.3. <i>Meloidogyne javanica</i> (Treub, 1885) Chitwood (1949).....	17
3.4. Fungos Nematófagos	18
3.5. <i>Pochonia chlamydosporia</i>	20
3.6. Proteases	21
3.7. Quitinases	23
4. MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1. Meio de cultivo para a preservação do fungo.....	24
4.2. Extração e multiplicação do inóculo de <i>Meloidogyne javanica</i>	25
4.3. Obtenção de juvenis de segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne javanica</i>	25
4.4. Produção e extração de extratos brutos enzimáticos dos isolados fúngicos.....	25
4.5. Dosagem de proteínas pelo método de Bradford.....	26
4.6. Atividade proteolítica	27
4.7. Atividade da quitinase	27
4.8. Desinfestação de Ovos e Juvenis de <i>M. javanica</i>	28
4.9. Eclosão de J2 na presença de quitinases e proteases	28
4.10. Mortalidade de J2 pelas proteases	29
4.11. Controle do nematoide de galhas.....	29
4.12. Delineamento Experimental	29

4.13. Análise estatística	30
5. RESULTADOS	30
6. DISCUSSÃO	34
7. CONCLUSÃO.....	36
8. REFERÊNCIAS	37
9. ANEXOS	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores médios das variáveis: massa fresca da raiz, galhas e ovos nas raízes de tomateiros 50 dias após a inoculação de 2.000 ovos de <i>Meloidogyne javanica</i>	34
Tabela 2. Valores médios das variáveis: massa fresca da raiz, galhas e ovos nas raízes de tomateiros da repetição do experimento in vitro com 50 dias após a inoculação de 2.000 ovos de <i>Meloidogyne javanica</i>	52

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Ovo de *Dioctophyma renale* destruído (seta preta) após contato prévio com ambas as classes de enzimas (quitinases e proteases) produzidas por *Pochonia chlamydosporia*. Ovo intacto de *Dioctophyma renale* (seta branca). Microscópio óptico, objetiva de 10 ×. Bars: 168 µm. Fonte: Soares et al., 2014.23
- Figura 2.** Fotomicrografias de *Meloidogyne incognita* ovos corados com Calcofluor White M2R e tratado com 0,2 U VCPI por 18 h, registrado em campo brilhante (a), luz violeta (b), ovos tratado com a mesma quantidade de calor para desnaturação de VCPI em campo claro (c) e violeta luz (d). Pequenas setas apontam para um imaturo ovo; setas grandes apontam para um ovo maduro. Bar, 20 µm. Fonte: Segers et al., 1994.23
- Figura 3.** (A – D) Ovos de *Platynosomum fastosum* tratados com ambas as enzimas (proteases e quitinases) derivadas dos fungos *Pochonia chlamydosporia* (VC4) e *Duddingtonia flagrans* (AC001). (A) Ovo intacto de *Platynosomum fastosum*; (B) Casca de ovo rompida de *Platynosomum fastosum*; (C e D) Ovos destruídos por ação enzimática. Fonte: Braga et al., 2014b.24
- Figura 4.** Atividade específica proteolítica dos extratos brutos dos macerados de cultura de *Pochonia chlamydosporia*: MLS (macerado líquido sem quitina, 0,58 U/mg), MSS (macerado sólido sem quitina, 1,23 U/mg), MSQ (macerado sólido com quitina, 0,71 U/mg) e MLQ (macerado líquido com quitina, 0,29U/mg). U= micrograma de tirosina por minuto de reação, nas condições de ensaio.31
- Figura 5.** Atividade específica de quitinases dos extratos brutos dos macerados de cultura de *Pochonia chlamydosporia*: MLS (macerado líquido sem quitina, 0,12 U/mL), MSS (macerado sólido sem quitina, 0,06 U/mL), MSQ (macerado sólido com quitina, 0,10 U/mL) e MLQ (macerado líquido com quitina, 0,01U/mL). U= micromol de N-acetilglicosamina por minuto de reação, nas condições de ensaio.31
- Figura 6.** Atividade específica da protease VCPI dos extratos brutos dos meios de cultura de *Pochonia chlamydosporia*: MLS (macerado líquido sem quitina, $49 \cdot 10^{-3}$ µg/min), MSS (macerado sólido sem quitina, $45 \cdot 10^{-3}$ µg/min), MSQ (macerado sólido com quitina, $35 \cdot 10^{-3}$ µg/min) e MLQ (macerado líquido com quitina, $36 \cdot 10^{-3}$ µg/min).32

Figura 7. Porcentagem de mortalidade de J2 de <i>Meloidogyne javanica</i> em contato com os extratos brutos enzimáticos de macerado sólido e líquido com e sem quitina de <i>Pochonia chlamydosporia</i> em solução aquosa (2%).	32
Figura 8. Análise de Regressão da mortalidade de J2 de <i>Meloidogyne javanica</i> em contato com diferentes concentrações com extrato bruto enzimático de macerado sólido de <i>Pochonia chlamydosporia</i> com quitina em solução aquosa.	33
Figura 9. Análise de Regressão do percentual de J2 de <i>Meloidogyne javanica</i> eclodidos em contato com diferentes concentrações de extratos brutos enzimáticos de macerado sólido de <i>Pochonia chlamydosporia</i> com quitina em solução aquosa.....	34
Figura 10. Experimento in vivo de <i>Meloidogyne javanica</i> em contato com diferentes concentrações dos extratos brutos enzimáticos de meio sólido de <i>Pochonia chlamydosporia</i> com quitina (0, 0,5, 1, 4%) via aplicação líquida (2 mL) no solo de mudas de tomateiro (29 dias) em bandejas.....	50
Figura 11. Experimento in vivo 01 de <i>Meloidogyne javanica</i> com interação a diferentes concentrações de extrato bruto enzimático de macerado sólido de <i>Pochonia chlamydosporia</i> com quitina (0, 0,5, 1, 4%) em tomateiro.	50
Figura 12. Experimento in vivo 02 de <i>Meloidogyne javanica</i> com interação a diferentes concentrações de extrato bruto enzimático de meio sólido de <i>Pochonia chlamydosporia</i> com quitina (0, 0,5, 1, 4%) em tomateiro.....	51
Figura 13. Repetição do experimento: Porcentagem de mortalidade de J2 de <i>Meloidogyne javanica</i> em contato com os extratos brutos enzimáticos de macerado sólido e líquido com e sem quitina de <i>Pochonia chlamydosporia</i> em solução aquosa (2%).....	51
Figura 14. Análise de Regressão da repetição do experimento in vitro da mortalidade de J2 de <i>Meloidogyne javanica</i> em contato com diferentes concentrações com extrato bruto enzimático de macerado sólido de <i>Pochonia chlamydosporia</i> com quitina em solução aquosa.	52
Figura 15. Análise de Regressão do percentual da repetição do experimento in vitro J2 de <i>Meloidogyne javanica</i> eclodidos em contato com diferentes concentrações de extratos brutos enzimáticos de macerado sólido de <i>Pochonia chlamydosporia</i> com quitina em solução aquosa.	52

RESUMO

Os fitonematoides são responsáveis por perdas na produção de tomate destacando-se entre eles a espécie *Meloidogyne javanica*. Uma das estratégias encontrada ao controle destes fitopatogenos constitui o uso de fungos parasitas de ovos como *Pochonia chlamydosporia*. Como este parasitismo ocorre no ponto de vista bioquímico ainda precisa de explicação científica. Enzimas fúngicas tem sido bem estudadas no controle de fitonematoides, mas ainda encontram-se lacunas no conhecimento sobre estas enzimas *in vivo* tanto no laboratório como em casa-de-vegetação e no campo. Neste trabalho foram avaliados a ação de proteases e quitinases de *P. chlamydosporia* no controle de *M. javanica* do tomateiro. Os macerados secos (MS) sem quitina (MSS, 2%) e com quitina (MSQ, 2%) de *P. chlamydosporia* reduziram significativamente ($P \leq 0,05$) o número de juvenis de segundo estágio (J2) de *M. javanica* em 91,83 e 55,73%, e na concentração de 0,5% o MSQ reduziu significativamente ($P \leq 0,05$) J2 de *M. javanica* em 100%, e inibiu a eclosão de J2 em 9,67% *in vitro* e no teste *in vivo* reduziu o número de galhas/g de *M. javanica* em 43, entretanto, o peso da massa fresca das raízes dos tratamentos MSQ (0,5, 1, 4%) foram iguais estatisticamente ao controle (MSQ 0%). Estes efeitos são atribuídos a atividade enzimática de proteases e quitinases, sendo os macerados MSS e MSQ apresentaram 23 e 0,71 U/mg de atividade específica de protease, quitinases 0,06 e 0,10 U/mL e protease VCP1 $45 \cdot 10^{-3}$ e $35 \cdot 10^{-3}$ $\mu\text{g}/\text{min}$. Portanto, o MSQ a 0,5% foi o mais eficiente em reduzir a infectividade da população de *M. javanica*, de modo que apresenta o potencial de ser utilizado como uma alternativa de controle deste nematoide.

Palavra-chave: Nematoides de galhas, fungos nematófagos, controle bioquímico, enzimas.

ABSTRACT

The phytonematodes are responsible for standing out in tomato production, including the species *Meloidogyne javanica*. One of the strategies found to control these phytopathogens is the use of egg parasite fungi such as *Pochonia chlamydosporia*. How this parasitism occurs from a biochemical point of view still needs scientific explanation. Fungal enzymes are being tested and not being tested in nematode control, but there are still gaps in the knowledge about these enzymes *in vivo* both in the laboratory and in the greenhouse and in the field. In this work, the action of proteases and chitinases from *P. chlamydosporia* on the control of *M. javanica* on tomato were added. Dry macerates (MS) without chitin (MSS, 2%) and with chitin (MSQ, 2%) of *P. chlamydosporia* significantly reduced ($P \leq 0.05$) the number of second instar juveniles (J2) of *M. javanica* *in vitro* and in the *in vivo* test reduced the number of root knot/g of *M. javanica* in 43 the weight of the fresh mass of the roots of the treatments MSQ (0.5, 1, 4%) were statistically equal to the control (MSQ 0%). These are attributed to the enzymatic activity of proteases and chitins, being the macerates MSS and MSQ showed 23 and 0.71 U/mg of specific protease activity, chitinases 0.06 and 0.10 U/mL and protease VCP1 45.10^{-3} and 35.10^{-3} $\mu\text{g}/\text{min}$. Therefore, the 0.5% MSQ was the most efficient in reducing the infectivity of the *M. javanica* population, so it has the potential to be used as an alternative to control this nematode.

Keywords: Root-knot nematodes, nematophagous fungi, biochemical control, enzymes.

1. INTRODUÇÃO

O tomate (*Solanum lycopersicum*) é uma hortaliça da família das Solanáceas que está entre as mais consumidas no mundo (FAO, 2020). Isso se deve ao fato do tomate ser de fácil cultivo, sabor agradável, fonte de vitaminas e sais minerais, além de conter ácido fólico, frutose e o antioxidante licopeno que são importantes para a saúde humana (GONDIM, 2016).

De acordo com os dados da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO, 2020), no ano de 2019 a produção mundial de tomates foi de aproximadamente, 178 milhões toneladas por ano. O maior produtor mundial foi a China com 62,7 milhões de toneladas, representando 35% da produção, seguida pela Índia com 10,5% e pela Turquia com 7% do volume global. Na décima posição encontra-se o Brasil com 2,2% (3,9 milhões de toneladas) da produção mundial.

Nesse contexto, os nematoides são responsáveis por problemas em tomateiros em diversas áreas de plantio. Os principais nematoides que causam perdas ao tomateiro no Brasil pertencem ao gênero *Meloidogyne*, conhecidos popularmente como nematoides de galhas, destacando-se as espécies: *Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood e *M. incognita* (Kofoid & White) que causam maiores prejuízos econômicos em regiões quentes, com solos arenosos e baixos teores de matéria orgânica (PINHEIRO et al., 2014a).

Um dos inimigos dos nematoides são os fungos nematófagos, os quais apresentam maior capacidade de adaptação em relação aos protozoários, bactérias, vírus, ácaros, besouros e demais fungos. Os fungos nematófagos são importantes agentes no controle biológico devido a modificação do seu comportamento saprofítico para carnívoro em condições nutricionais desfavoráveis (BRAGA & ARAÚJO, 2014a; DEGENKOLB & VILCINSKAS, 2016). Os gêneros nematófagos mais utilizados no controle biológico são: *Arthrobotrys*, *Dactylellina*, *Drechmeria*, *Duddingtonia*, *Hirsutella*, *Fusarium*, *Nematophthora*, *Pochonia* e *Purpureocillium* (GAJENDIRAN & VIJAYARANGAN, 2020). As pesquisas ultra-estruturais, histoquímicas e bioquímicas têm demonstrado que a penetração da cutícula do nematoide pelos fungos, envolve a combinação da atividade mecânica e de enzimas hidrolíticas, incluindo proteases e quitinases (JANSSON & NORDBRINGHERTZ, 1988, WANG et al.; 2006). Liang et al. (2010) demonstraram que as proteases Ver112 (*Lecanicillium psalliotae*) e PL646 (*P. lilacinus*) apresentaram alto índice de atividade hidrolítica contra proteínas da cutícula de *Caenorhabditis elegans* nas faixas de temperatura de 4–70 ° C e pH entre 7,0–10,0, com maior

atividade enzimática observada a 70°C em pH 10. Segundo Gouveia et al. (2017) a protease serino do fungo *Monacrosporium thaumasium* reduziu 30% dos juvenis de *M. javanica* por um período de 24 h. Nguyen et al. (2007) verificaram que quitinase bruta B-3 (*Lecanicillium antillanum*) danifica 78% dos ovos de *M. incognita*. Braga et al. (2014a) confirmaram que as quitinases dos fungos nematófagos *Duddingtonia flagrans* e *Pochonia chlamydosporia* têm propriedades anti-helmínticas contra as larvas de *Strongyloides westeri*, um parasita do intestino delgado de cavalos.

O uso das proteases e quitinases de fungos nematófagos cumpre as exigências quanto a alimentação saudável quando são utilizados no controle de pragas em campo, além de reduzir os riscos ambientais dos agrotóxicos, tornando-se uma nova estratégia de controle bioquímico de doenças (LAMOVSĚK et al., 2013). Dentro dessa estratégia, há a alternativa de se utilizar os microrganismos que atuam no controle de pragas e patógenos nas plantas (JORGE & SOUZA, 2017). Os fungos predadores de nematoides que apresentam grande potencial no controle bioquímico de nematoides são: *Purpureocillium lilacinum* e *Pochonia chlamydosporia* (SHARON et al., 2001), e suas enzimas podem ser utilizadas no campo como biopesticidas (URWIN et al., 2001; SARVEN et al., 2019). No experimento de Bonants et al. (1995), a protease serino de *Purpureocillium lilacinus* demonstrou ser termoestável, em temperatura ótima de 60°C e atividade nematicida após 3 dias de incubação com 70% de deformação dos ovos de *M. hapla*.

Os possíveis impactos econômicos da utilização de biopesticidas na agricultura, serão no conhecimento científico e nas aplicações para o controle de nematoides. Existem diversas pesquisas internacionais e nacionais que mostram o uso bem-sucedido de enzimas fúngicas no controle de nematoides. Na pesquisa de Khan et al. (2004), a protease e a quitinase de *P. lilacinus* reduziram a eclosão de J2 de *M. javanica* em 69 e 88% após incubação de 3 e 6 dias. A protease purificada de *Lecanicillium psalliotae* (Ver112) degradou 81% da cutícula de *Panagrellus redivivus* após 12h (YANG et al., 2005). O fungo *P. chlamydosporia* restringiu a eclosão de J2 de *Dioctophyma renale* em 27,8% (proteases), 29,4% (quitinases) e 43,4% (proteases + quitinases) (SOARES et al., 2014). Enzimas fúngicas tem ganhado mais destaque em estudos relacionados a sua utilização no controle de fitonematoides, no entanto ainda encontram-se algumas lacunas no conhecimento sobre estas enzimas em pesquisas desenvolvidas in vivo no laboratório, casa-de-vegetação e no campo. Assim, este projeto visa

transpor essas lacunas do conhecimento científico, gerando uma aplicação real como um futuro biopesticida na agricultura brasileira.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a ação das proteases e quitinases de *Pochonia chlamydosporia* no controle de *Meloidogyne javanica* em tomateiro.

2.3. Objetivos Especificos

- Avaliar a eficiência no controle de *M. javanica* por parte das enzimas;
- Identificar a concentração letal que causa a morte de 50% dos nematoides (CL50) pelo extrato bruto enzimático;
- Analisar o efeito do extrato enzimático de *P. chlamydosporia*;
- Comprovar a atividade enzimática dos extratos do fungo *P. chlamydosporia*.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. Aspectos Gerais da Cultura do Tomateiro

O tomateiro (*Solanum lycopersicum*) é originário da região andina, hoje englobada por parte do Chile, Bolívia, Equador, Colômbia e Peru, sendo que o tempo e o local de domesticação do tomate são desconhecidos (BAI et al., 2007).

Os espanhóis levaram o tomate para a Europa, e este era cultivado inicialmente como planta ornamental e considerado por muitos como planta venenosa. Na Itália, por volta de 1560, que o tomate foi utilizado pela primeira vez para consumo humano (BECKER et al., 2016). A introdução do tomate no Brasil deve-se a imigrantes europeus (portugueses e italianos) no final do século XIX (ALVARENGA, 2004).

O tomateiro se adapta a várias regiões do mundo, e isso relacionado à sua tolerância a diferentes condições edafoclimáticas como diferentes tipos de solo e temperaturas variando entre 5° e 36°C, sendo o mínimo 16 °C e ótimo entre 24° e 35°C (GOTAME et al., 2018). Essa dicotiledônea pertence à família das Solanáceas, ordem *Tubiflorae*, gênero *Solanum*, herbácea, de caule redondo, piloso e macio. As folhas são alternadas, compostas de 11 a 32 cm de

comprimento, hermafrodita, sendo considerada uma planta autógama. As flores dão em cachos com as pétalas lanceoladas e largas. Os cachos de flores podem ser simples (não ramificados) e composto (ramificado). Os frutos são carnosos com 2 ou mais lóculos e as sementes são uniformes, pequenas, com pelos bem curtos (GOULD, 1992).

O início da colheita do tomate é realizado aos 45-55 dias após a florescência ou 90-120 dias depois da sementeira (TAMBI, 2018). O sistema radicular do tomateiro é pivotante, sendo composto por uma raiz principal, raízes secundárias e adventícias, com a maior parte das raízes se concentrando na faixa de solo de até 20 cm de profundidade (CECCARELLI et al., 2021).

O tomateiro é uma planta semi-perene. Entretanto, cultiva-o como anual onde as condições climáticas são favoráveis. Apresentam dois tipos de crescimento, o determinado que se dá em cultivares adaptadas as culturas rasteiras, onde os frutos terão como destino a agroindústria. Seu desenvolvimento vegetativo será limitando, quando que cada haste ou ramificação tem a presença de um ramo floral apical; e o indeterminado que ocorre na maioria das cultivares onde os frutos tem destino à mesa dos consumidores. Os tomateiros são plantas tutoradas e podadas para que o ramo principal cresça mais que as ramificações laterais (ALVARENGA, 2004).

3.2. Nematoides na Cultura do Tomateiro

Diferentes gêneros de nematoides têm sido encontrados na cultura do tomateiro como *Meloidogyne*, *Belonolaimus*, *Trichodorus* e *Paratrichodorus* (PINHEIRO et al., 2014b). A maioria deles estão localizados nas regiões tropicais (MATTOS, 2002).

O gênero *Meloidogyne* é o que causa maiores perdas para a cultura do tomateiro, principalmente em sistemas de cultivo intensivo (DU et al., 2020). Os nematoides *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood, *M. javanica* (Treub) Chitwood, *M. arenaria* (Neal) Chitwood e *M. hapla* Chitwood são as espécies de maior ocorrência em tomateiro (PINHEIRO et al., 2014b). Outras espécies como *M. enterolobii* Yang & Eisenback, 1983 (sin= *M. mayaguensis*, Rammah & Hirschmann, 1988) têm sido relatados infectando tomateiros com resistência genética às três espécies citadas anteriormente (CARNEIRO et al., 2006). O gene Mi é muito utilizado em trabalhos de desenvolvimento de cultivares de tomateiro devido sua resistência a fitopatógenos (ABDELSAMAD et al., 2019; POCORULL et al., 2020). Esse gene exerce resistência a espécies de *Meloidogyne*., tais como *M. incognita*, *M. javanica*, *M.*

arenaria, *M. luci*, *M. ethiopica* (SANTOS et al., 2020) e *M. chitwoodi*, além de diminuir a taxa reprodutiva de *M. hapla* (BROWN et al., 1997).

Rosa et al. (2014) constataram a suscetibilidade a *M. enterolobii* em genótipos (05 tom0041 e 08 tom00345) e híbridos de tomateiro (Absoluto, Cascade, Cordillera, Donatto, Ellen, Fascínio, Laura, Marguerita, Nicolás e Sanni) por meio de testes em condições controladas (casa de vegetação com temperatura mínima de 25°C e máxima de 29°C e em BOD a 25°C). Tzortzakakis et al. (2014) relataram o primeiro caso de superação da resistência do tomateiro cv. Silvana a *M. incognita* no norte da Grécia. No Brasil, na região do Cerrado de Goiás ocorre também a superação da resistência do gene *Mi* do tomateiro industrial cv. Heinz 9992 (SILVA et al., 2019).

Os sintomas causados por *Meloidogyne* spp. em tomateiro são clorose de folhas, nanismo e posterior redução da produção, ligada à formação de galhas por todo o sistema radicular, que se tornam vulneráveis a outros fitopatógenos (fungos e bactérias do solo) (ASMUS, 2001).

As altas populações de *M. incognita* e *M. javanica* no campo ocorrem pela capacidade de se reproduzirem em uma faixa ampla de temperaturas de 18 a 31,5°C, ao contrário de *M. arenaria* e *M. hapla* que requerem temperaturas mais baixas e constantes (CHARCHAR & MOITA, 2001).

3.3. *Meloidogyne javanica* (Treub, 1885) Chitwood (1949)

A espécie *M. javanica* causa maior dano econômico à cultura do tomateiro, e isso se deve a sua ampla disseminação em áreas produtoras no Brasil (PINHEIRO et al., 2014b) e sua reprodução em mono e dicotiledôneas (PRZYBYLSKA & OBREPALSKA-STEPLOWSKA, 2020). Soma-se a isso a capacidade de atacar várias espécies de plantas em regiões com estações secas bem definidas (ESBENSHADE & TRIANTAPHYLLOU, 1990), além de apresentar ocorrência de poliploidia e aneuploidia (EISENBACK & TRIANTAPHYLLOU, 2020), e o pronúcleo do óvulo conserva a condição diploide com 42 a 44 cromossomos (FREIRE et al., 2002).

As fêmeas de *M. javanica* têm a forma de pera. O padrão perineal exibe estrias dorsais e ventrais e linhas laterais estendidas em ambos os lados da extremidade da cauda (KAUR et al., 2016). Os machos sempre alongados e em menor população do que as fêmeas (LORDELO, 1992).

Essa espécie possui 4 raças fisiológicas definidas por reações de plantas hospedeiro-diferenciadoras (CARNEIRO et al., 2003). A raça 1 se desenvolve em fumo, melancia e tomate, a raça 2 parasita essas plantas e o pimentão, a raça 3 parasita as mesmas plantas da raça 1, mais o amendoim (RAMMAH & HIRSCHMANN, 1990), a raça 4 se reproduz em fumo, melancia, tomate, pimentão, amendoim, com exceção do algodão que apresenta imunidade (CARNEIRO et al., 2003).

O ciclo de vida do nematoide de galhas se conclui em 25 dias a 27 °C. Temperaturas mais baixas ou mais altas atrasam a eclosão dos J2 (MUKHTAR & HUSSAIN, 2019). Dentro do ovo, o juvenil de primeiro estágio (J1) sofre uma ecdise, em seguida origina o juvenil de segundo estágio (J2). Após a eclosão, os J2 podem penetrar a mesma raiz ou infectar novas raízes (CORREIA et al., 2017). Após penetrarem nas raízes movem-se pelos espaços entre os vasos condutores e se tornam sedentários. Até a fase adulta passam por sucessivas ecdises (troca de cutícula) e mudanças na sua forma, passando da fase vermiforme para a forma alongada (machos) e arredondada (fêmeas) (PINHEIRO, 2014a). Ao se alimentarem, os nematoides excretam secreções esofágicas nos tecidos vegetais, causando hipertrofia e hiperplasia das células corticais da raiz do hospedeiro, levando à formação de galhas na raiz que alteram o formato da raiz, afetando o transporte de água e nutrientes consequentemente reduzindo o crescimento vegetativo (HUSSAIN et al., 2016).

Para a correta identificação dos nematoides utilizava-se a configuração perineal, entretanto, nas últimas décadas adicionaram-se a diagnose molecular com marcadores SCAR e eletroforese de isoenzimas (CARNEIRO et al., 2016).

3.4. Fungos Nematófagos

Os fungos nematófagos são microrganismos cosmopolitas que se alimentam de nematoides em condições nutricionais desfavoráveis, e usam estratégias altamente sofisticadas de infecção para obter seu alimento (BRAGA & ARAÚJO, 2014a; DEGENKOLB & VILCINSKAS, 2016).

O primeiro fungo nematófago a ser observado e relatado foi *Arthrobotrys oligospora* por Fresenius em 1852. Sua capacidade predatória foi avaliada por Zopf em 1888, e também foi descrito fungo endoparasita de nematoides *Hasposporium anguillulae* foi exposto em 1874 por Lohde (GRAY, 1988).

Pesquisadores como Drechsler (1933 – 1975), Duddington (1950 – 1972), e Barron (1969), contribuíram muito para o início do controle biológico de nematoides; principalmente, no isolamento e na descrição detalhada de novas espécies (GRAY, 1987). No Brasil, os primeiros trabalhos de controle biológico com fungos nematófagos foram realizados por Alcântara & Azevedo (1981), que isolaram alguns fungos oportunistas que infectaram nematoides.

Os fungos nematófagos são classificados em cinco grupos de acordo com suas características de associação com nematoides: (1) predadores, (2) oportunistas ou ovicidas, (3) endoparasitas (BRAGA & ARAÚJO, 2014a), (4) produtores de toxina e (5) produtores de dispositivos de ataque especial (estruturas que mecanicamente danificam a cutícula dos nematoides) (LIU et al., 2009; SOARES et al., 2018). A maioria dos fungos nematófagos são predadores e produzem estruturas em forma de anéis constritores e não constritores, hifas, botões e redes tridimensionais adesivas ao longo do micélio. Após o aprisionamento do nematoide tem a penetração das hifas na cutícula, crescimento destas e a digestão dos conteúdos internos do nematoide (ARAÚJO et al., 2004).

O segundo grupo é chamado de fungos endoparasitos, estes infectam os nematoides através de esporos, e após a ingestão desenvolvem hifas que absorvem o conteúdo interno do nematoide (MOTA et al., 2003; ARAÚJO et al., 2004).

O terceiro grupo de fungos é conhecido como oportunistas, parasitas de ovos, onde suas hifas penetram os pequenos poros da casca do ovo do fitonematoide, causando um desequilíbrio na permeabilidade e aumentando o volume da casca (MOTA et al., 2003; ARAÚJO et al., 2004).

O quarto grupo é denominado fungos produtores de toxinas, estes produzem substâncias que imobilizam os nematoides, como o gênero *Pleurotus* que produz toxinas poderosas que imobilizam e levam ao encolhimento da parte anterior dos nematoides antes da infecção e digestão (KWOK et al., 1992; NORDBRING et al., 1995; SATOU et al., 2008, SOARES et al., 2018).

O quinto grupo são fungos produtores de dispositivos especiais que funcionam como espadas para perfurarem os nematoides fazendo com que extravasem sem o conteúdo. Estes dispositivos podem ser explicados como: 1) crescimento de hifas em direção à cutícula do nematoide que cria uma pressão; 2) um pino de penetração (peg of infection) é formado e penetra na cutícula do nematoide; 3) as hifas colonizam o interior do nematoide; e 4) hifas

projetam-se externamente do nematoide infectado (LUO et al., 2004, 2006, 2007; SOARES et al., 2018).

Após a penetração por pressão mecânica, os fungos produzem substâncias adesivas mucilaginosas que evitam o extravasamento dos conteúdos dos nematoides para o ambiente (VEENHUIS et al., 1985). Um importante fator de parasitismo para fungos nematófagos é a produção de proteases extracelulares. A maioria das proteases pertencem à família das serinas (LOPEZ-LLORCA et al., 2008). Através da sua produção tem-se os danos ao complexo quitina-proteína de ovos de nematoides que permite a penetração pelos apressórios e fornece alimento aos fungos (LOPEZ-LLORCA et al., 2002). Os fungos que parasitam nematoides estão divididos em mais de 150 espécies incluída nos gêneros *Arthrobotrys*, *Dactylaria*, *Dactyella*, *Trichothecium*, *Duddingtonia*, *Monacrosporium*, *Genicularia* e *Dactylariopsis* (GRAMINHA et al., 2001). Os gêneros de fungos predadores que se destacam são *Arthrobotrys*, *Duddingtonia* e *Monacrosporium* (ARAÚJO et al., 2004), e para os oportunistas é o fungo *Pochonia chlamydosporia* (ARAÚJO et al., 2009; BRAGA et al., 2011a).

3.5. *Pochonia chlamydosporia*

O fungo *Pochonia chlamydosporia* foi relatado pela primeira vez por Willcox e Tribe (1974), sendo um parasita oportunista e pode parasitar e digerir ovos e fêmeas de *Heterodera schachtii* (VIAENE & ABAWI, 2000; LOPES et al., 2007; ESCUDERO & LOPEZ-LLORCA, 2012).

Morgan-Jones et al. (1981) e Godoy et al. (1983) também descreveram *P. chlamydosporia* como parasita de ovos e fêmeas de *Meloidogyne arenaria* em campos de monocultivo de amendoim no Alabama, e de muitas outras espécies desse gênero de nematoide (FREIRE & BRIDGE, 1985; RIBEIRO & CAMPOS, 1993; HIDALGO-DIAZ et al., 2000; SUN et al., 2006).

O fungo *P. chlamydosporia* faz parte da família Clavicipitaceae (Fungos: Ascomycota: Pezizomycotina: Sordariomycetes: Hypocreomycetidae: Hypocreales), possui cinco variedades a partir da morfologia filogenética e análises multigênica (SSU, LSU, tef, rpb1 e rpb2) como *P. chlamydosporia* var. *clamidosporia*, *P. chlamydosporia* var. *catenulata*, *P. chlamydosporia* var. *ellipospora*, *P. chlamydosporia* var. *spinulospora* e *P. chlamydosporia* var. *mexicana* (ZARE et al., 2001; NONAKA et al., 2013; KEPLER et al., 2014), têm como sinônimos *V. chlamydosporium*, *D. chlamydosporia*, *S. ovorum*, *D. heterospora*, *P. humicola*,

Dictyoarthrinopsis kelleyi, *Cordyceps chlamydosporia* e *Metacordyceps chlamydosporia* (EVANS & KIRK, 2017). De acordo com a base molecular e análises filogenéticas de genes que codificam beta tubulina, subunidade principal de RNA polimerase II, segunda subunidade principal da RNA polimerase II e porção do alongamento da tradução 1 alfa fator, *Pochonia* foi considerada polifilética e forma dois clados diferentes (KEPLER et al., 2014). Além disso este fungo pode se fixar próximo as raízes e erradicar muitos ovos produzidos por um único nematoide (STIRLING, 1991). Segundo Morgan-Jones et al. (1983), o parasitismo deste fungo sucede pela dissolução parcial da camada vitelínica através das exoenzimas (enzimas extracelulares). Após a hifa adentrar no ovo, acontece a dissolução enzimática das camadas de quitina e de lipídios. O efeito das exoenzimas sobre a casca do ovo, causa o aumento da permeabilidade, permitindo a passagem de toxinas produzidas pelo fungo e impedindo a eclosão dos juvenis de primeiro estágio (J2) (STIRLING, 1991).

Cerca de 3500 clamidósporos g^{-1} de *P. chlamydosporia* de solo reduziu o número de galhas e ovos de *M. javanica* de 61 a 90% e de 36 a 58% em tomateiro inoculados com 3000 ovos (PASQUA et al., 2020). A concentração de 5.000 clamidósporos/g de *P. chlamydosporia* foi capaz de reduzir 67% de ovos de *M. javanica* por grama de raiz de bananeira (BARBOSA et al., 2019). A aplicação de 3,0 kg ha^{-1} de *P. chlamydosporia* (Pc-10) aumentou a produção de raízes de cenoura em 41,7% e reduziu a população de *M. incognita* em 48,7% e 61,4% (BONTEMPO et al., 2017).

3.6. Proteases

As proteases representam um grupo extenso de enzimas, as quais se distinguem pelas propriedades, tais como especificidade do substrato, sítio ativo, mecanismo catalítico, pH e temperatura ótima (SUMANTHA et al., 2006). Sua função é catalisar a hidrólise de ligações peptídicas nas proteínas, liberando peptídeos livres (LÓPEZ-OTÍN & OVERALL, 2002).

Conforme o pH podem ser classificadas em ácidas (pH de 2,0 a 6,0), neutras (pH de 6,0 a 8,0) ou alcalinas (pH 8,0 a 13,0) de acordo com a atividade (LIU & KOKARE, 2017). Pelo mecanismo catalítico dividem-se em proteases aspárticas, cisteíno proteases, metalo proteases e serino proteases (RAWLINGS & BARRETT, 1993).

Mais de 20 proteases pertencem a família de serina proteases, sendo estas identificadas a partir de fungos predadores de larvas como *Arthrobotrys oligospora* (TUNLID et al., 1994; ZHAO et al., 2004), *Arthrobotrys conoides* (YANG et al., 2007), *Monacrosporium sinense*

(SOARES et al., 2013) e *Duddingtonia flagrans* (BRAGA et al., 2011b); predadores de ovos *Pochonia rubescens* (LOPEZ-LLORCA, 1990) e *Pochonia chlamydosporia* (BRAGA et al., 2011c) e endoparasitos *Hirsutella rhossiliensis* (WANG et al., 2007, 2009). Ward et al. (2012) mostraram que a expressão do gene da serina protease vcp1 de *P. chlamydosporia* foi maior quando o fungo foi cultivado em pH 8 do que em pHs mais baixos (Ph 5,8 e 6,8).

De acordo com Suarez et al. (2004), as proteases fúngicas não estão envolvidas somente no desequilíbrio da parede celular do hospedeiro (formado por polímeros de quitina e glucanos, inseridos por proteínas), mas também podem exercer o papel de inativadores proteolíticos das enzimas dos patógenos ligados no processo de infecção nas plantas.

Nos estudos de Soares et al. (2014), o fungo *P. chlamydosporia* (VC4) reduziu a eclosão *in vitro* de J2 de *Diectophyma renale* em 27,8% utilizando proteases, 29,4% com quitinases e 43,4% (proteases + quitinases). Além disso as proteases e quitinases fúngicas levaram a destruição dos ovos de *Diectophyma renale* (Figura 1). As proteases de *P. chlamydosporia* (VC4) também resultaram na atividade ovicida *in vitro* em placas de Petri contendo ovos de *Ascaris suum* tratado após 14 dias de interação, e percentual de redução de 75% dos ovos deste parasita em comparação com o grupo controle (SOARES et al., 2015).

Segundo Ward et al. (2012), a protease VCP1 está relacionada ao parasitismo de ovos de nematoides secretada por *P. chlamydosporia*. De acordo com Segers et al., (1994), no teste *in vitro* a protease desnaturada de *P. chlamydosporia* (VCP1) removeu a cobertura de proteína da casca dos ovos de *M. incognita* corados com Calcofluor White M2R (Figura 2d), que apresentou baixa fluorescência nos ovos e com fluorescência azul brilhante sugerindo que a quitina subjacente fibrilas foram expostas (Figura 2b).

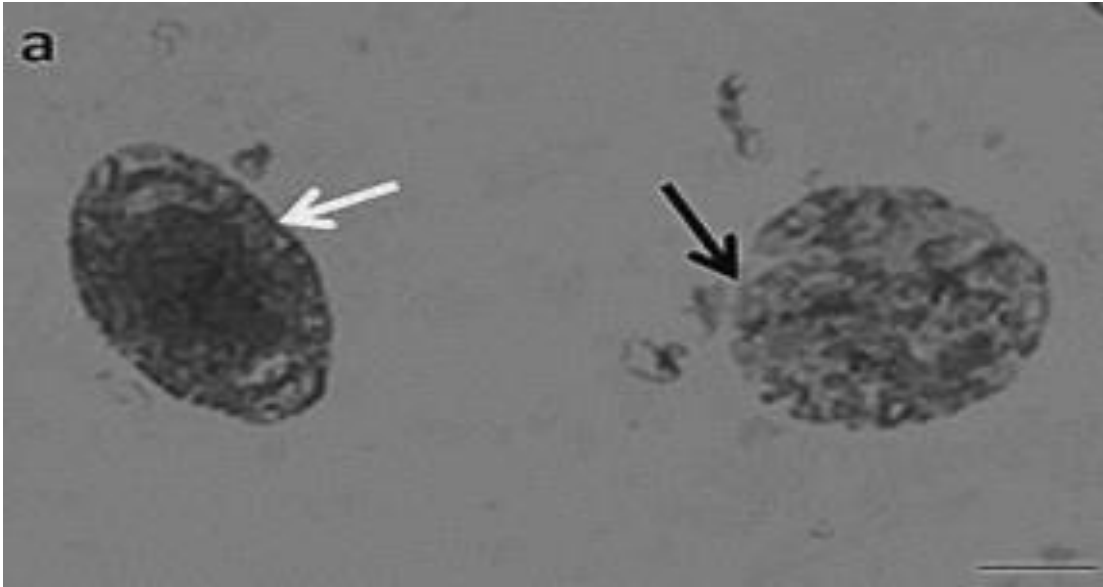


Figura 1. Ovo de *Diectophyma renale* destruído (seta preta) após contato prévio com ambas as classes de enzimas (quitinases e proteases) produzidas por *Pochonia chlamydosporia*. Ovo intacto de *Diectophyma renale* (seta branca). Microscópio óptico, objetiva de 10 ×. Bars: 168 μm. Fonte: Soares et al., 2014.

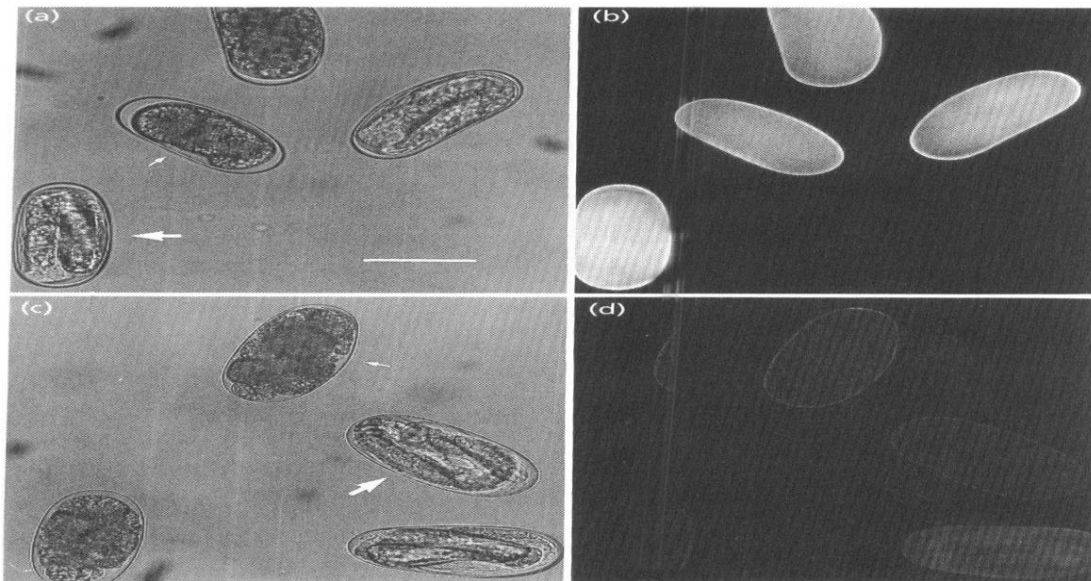


Figura 2. Fotomicrografias de *Meloidogyne incognita* ovos corados com Calcofluor White M2R e tratado com 0,2 U VCPI por 18 h, registrado em campo brilhante (a), luz violeta (b), ovos tratado com a mesma quantidade de calor para desnaturação de VCPI em campo claro (c) e violeta luz (d). Pequenas setas apontam para um imaturo ovo; setas grandes apontam para um ovo maduro. Bar, 20 μm. Fonte: Segers et al., 1994.

3.7. Quitinases

As quitinases estão muito presentes na natureza e são encontradas em muitos organismos vivos, onde desempenham funções relacionadas à nutrição, defesa e parasitismo. Nas plantas as quitinases induzem a proteção contra insetos e nematoides (HAMID et al., 2013). Estas enzimas catalisam a hidrólise das ligações β-1,4 glicosídicas do polímero linear quitina

em açúcares de N-acetil- β -D- glicosamina (LOGUERCIO-LEITE & ESPOSITO, 2004).

As quitinases fúngicas causam a formação de grandes vacúolos na camada de quitina e perda de integridade na camada vitelina de ovos de nematoides, sendo este efeito observado com as quitinases dos fungos *Duddingtonia flagrans* e *P. chlamydosporia* contra as larvas de *Strongyloides westeri* na Figura 3 (BRAGA et al., 2014b). A fonte de quitinase diferencia a eclosão de nematoides, tal como a redução da eclosão de J2 de *Meloidogyne javanica* pela quitinase fúngica. Entretanto, a quitinase bacteriana aumentou a eclosão de J2 de *M. javanica* (KHAN et al., 2004). Gan et.al, (2007) verificaram que após três dias de incubação dos ovos imaturos de *M. incognita* com a quitinase LPCHI1, 38,2% dos ovos não se desenvolveram em ovos ou juvenis, ao contrário do controle em que apenas 19,8% não conseguiram se desenvolver.

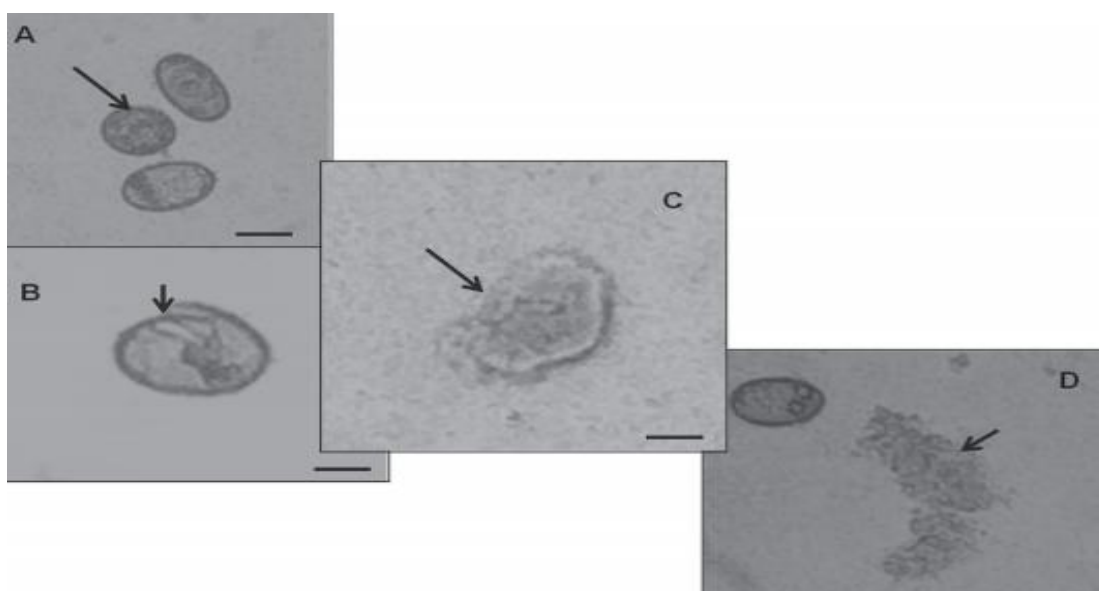


Figura 3. (A – D) Ovos de *Platynosomum fastosum* tratados com ambas as enzimas (proteases e quitinases) derivadas dos fungos *Pochonia chlamydosporia* (VC4) e *Duddingtonia flagrans* (AC001). (A) Ovo intacto de *Platynosomum fastosum*; (B) Casca de ovo rompida de *Platynosomum fastosum*; (C e D) Ovos destruídos por ação enzimática. Fonte: Braga et al., 2014b.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Meio de cultivo para a preservação do fungo

No presente trabalho foi utilizado o isolado fúngico PC10 de *Pochonia chlamydosporia*. Esse fungo foi obtido de solo do Brasil. *P. chlamydosporia* (PC10) e pertence a micoteca do laboratório de controle de fitonematoides da Universidade Federal de Viçosa. Os microrganismos foram preservados em meio Batata Dextrose Ágar (BDA, 0,05 g/mL) e posteriormente foram replicados em placa de Petri. O preparo do inóculo foi realizado

retirando-se das placas de Petri discos de 9 cm de diâmetro, os quais foram adicionados ao meio de cultivo.

4.2. Extração e multiplicação do inóculo de *Meloidogyne javanica*

A população do nematoide foi multiplicada em tomateiro cv. Santa Clara com 60 dias em casa de vegetação do Laboratório de Nematologia da UFLA. A extração dos ovos de *M. javanica* foi realizada pelo método de Hussey & Barker (1973). As raízes foram cortadas em pedaços de aproximadamente um centímetro e depois triturar no liquidificador na menor rotação com 200 mL de solução de NaOCl a 0,5 % durante 20 segundos. A seguir, a suspensão e detritos foram passadas pelas peneiras de 200 sobreposta a de 500 mesh. A separação dos ovos de detritos de raízes foi realizada centrifugando os ovos de *M. javanica* com caulim, e depois repetindo o processo com 55 g de sacarose diluída em 1000 mL de água destilada. O material coletado foi levado ao microscópio fotônico invertido e depositado lâmina de Peters um mL da suspensão obtida, e homogeneizou para calibrar a população inicial desejada, neste caso 1.000 ovos por mL de suspensão.

4.3. Obtenção de juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica*

Os ovos de *M. javanica* oriundo de tomateiro foram extraídos conforme descrito no item 4.2. Os ovos obtidos foram depositados em de funil de Baermann (BAERMANN, 1917) e mantido na temperatura ambiente, e o funil utilizado foi de vidro (180 mm de diâmetro) acoplado ao caixa de isopor com furo, na ponta do funil colocou mangueira borracha médica (6 mm) e selou a parte superior desta com fita plástica e a inferior com uma presilha metálica para não permitir a saída de água e perda dos J2. Após 12 h os nematoides eclodidos foram descartados, com o fim de descartar os juvenis mortos. Após 24 h fez a primeira coleta, e cada 12 h coletava até completar 5 dias e armazenava a suspensão de J2 em recipiente de vidro em câmara fria a 18°C. A suspensão final foi concentrada com ajuda da mangueira plástica (2 mm) para 1000 J2/mL.

4.4. Produção e extração de extratos brutos enzimáticos dos isolados fúngicos

Discos de micélio dos isolados de *P. chlamydosporia* foram repicados em placas de Petri contendo o meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar) e armazenadas por sete dias. Desse crescimento micelial, seis discos foram transferidos para frascos previamente autoclavados com

diferentes macerados sólidos e líquidos sem (MSS, MLS) e com quitina (MLS, MLQ). No macerado sólido utilizou 5g de farelo de trigo lavado, caseína 1% e 25 mL do meio líquido composto por K_2HPO_4 (5,0 g/L), $MgSO_4$ (0,10 g/L), (BRAGA et al., 2013) e macerado líquido glicose 100 g/L, caseína 18,409 g/L, K_2HPO_4 5,0 g/L, $MgSO_4$ 0,10 g/L (MEYER & WIEBE, 2003) para produção de proteases e 1% (m/m) de quitina coloidal (massa seca) para produção de quitinases (NARAYANA & VIJAYALAKSHMI, 2009), sendo os meios separados para a produção de macerados com quitinases (MSQ, MLQ) e proteases (MSS, MLS). Os 6 erlenmeyers de vidro (250 mL) contendo os extratos macerados sólidos (3 MSS, 3 MSQ) foram mantidos em BOD (Demanda Bioquímica de Oxigênio) à 28 °C por 7 dias (GOUVEIA et al., 2017), e os outros 6 erlenmeyers (250 mL) para os extratos dos macerados líquidos (MLS, MLQ) em shaker por 7 dias no escuro temperatura ambiente.

Após o cultivo dos fungos, os extratos dos macerados líquidos foram filtrados em papel filtro, e centrifugou-se o filtrado a 10000 g a 4 °C. Para o extrato do macerado sólido, agitou-se com um bastão de vidro, colocou-se no shaker por 30 minutos por 180 rpm, filtrou-se em papel filtro, centrifugou por 10000 g a 4°C (KAO et al., 2007). Após a filtração, os macerados foram congelados a -20 °C por 4 dias e liofilizados (12 tubos falcons de 50 mL contendo os extratos e vendados em plástico com 4 furos) por 72 h com pressão de serviço de 120 mBar, e após isso trituraram os macerados com auxílio da espátula metálica dentro do tubo falcon, e estes foram mantidos em frascos de vidro âmbar no congelador -20 °C e para o ensaio os macerados foram dissolvidos em água destilada esterilizada nas concentrações de 2% (MSS, MSQ, MLS, MLQ) e (MSQ 0,06; 0,12; 0,25; 0,50, 1,0, 4,0%).

4.5. Dosagem de proteínas pelo método de Bradford

O método de Bradford (BRADFORD, 1976), utiliza a ligação e mudança de cor do corante Azul Brillhante de Coomassie (Coomassie G-250) na presença de proteínas. Para a solução corante de Bradford foi utilizado Coomassie Blue G-250 (100 mg) que foi dissolvido em 50 mL de metanol. Após a dissolução foram adicionados 100 mL de H_3PO_4 85%, e a solução ficou com o volume acertado para 200 mL com água destilada. Esta solução foi armazenada em frasco âmbar (protegida da luz) à 4 °C. No ensaio, foram adicionados 10µL extrato bruto enzimático 1% diluído em água (m/v), 790µL de água e 200µL reagente de Bradford, sendo incubado a 37 °C por 60 minutos. Para a curva padrão, utilizou 3 repetições de albumina sérica bovina (BSA; 10, 20, 30, 40, 60, 80, 100, 120, 140 µL), água (790, 780, 770, 760, 740, 720,

700, 680, 660 μL), Bradford (200 μL) para as 9 repetições e branco (800 μL de água, 200 μL), e após as condições de ensaio, a absorvância foi determinada em espectrofotômetro a 595 nm e a curva padrão.

4.6. Atividade proteolítica

A atividade proteolítica dos isolados foi medida pelo método caseinolítico de acordo com Soares et al. (2012). Os volumes das soluções utilizadas nesse método foram: 10 μL de extrato bruto enzimático (1%, m/v), 490 μL de tampão Tris-HCl (pH 7,5, 0,1 M), 500 μL de caseína 1%. O meio de reação foi incubado a 37 °C por 60 minutos. A reação foi interrompida com a adição de 1 mL de solução de ácido tricloroacético (TCA) 10%. O meio de reação foi centrifugado a 10,000g por 5 minutos, e o sobrenadante foi coletado. Para a curva padrão adicionou 3 repetições de tirosina (30, 60, 90, 120, 150, 200, 300, 400 μL), água (970, 940, 910, 880, 850, 800, 700, 600 μL) e TCA (1000 μL) 8 repetições e Branco (1000 μL de água e TCA) para a determinação da absorvância em espectrofotômetro a 280nm. Foi construída uma curva padrão de tirosina para a quantificação da atividade enzimática. Uma unidade de protease foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0 μg de tirosina por minuto, nas condições de ensaio.

A atividade de protease VCP1 foi testada usando N-Succinil-Ala-Ala-ProPhe p-nitroanilida (SEGERS et al. 1994). Extrato de enzima 10 μL (1%, m/v), substrato (1000 μL) e tampão (990 μL de 0,1 M Tris - HCl pH 7,9) foram misturados em microtubos (2 mL), e a absorvância foi imediatamente medida continuamente a 410 nm por três minutos em temperatura ambiente, usando um espectrofotômetro.

4.7. Atividade da quitinase

A quitina coloidal foi preparada pelo método de Rodriguez-Kabana, Morgan- Jones e Shelby (1983), por hidrólise parcial de quitina. Dissolveram-se 40 g de quitina (Sigma, St. Louis, EUA) em 400 mL de HCl 10 N por agitação durante 30 min à temperatura ambiente. A quitina foi precipitada como uma suspensão coloidal adicionando-o lentamente a 2 L de água destilada fria (aproximadamente 5°C). A suspensão coletada foi filtrada e, em seguida, lavada com 5 L de água destilada, refiltrada e lavada por várias vezes com grandes volumes de água destilada para ajustar o pH a 7,0.

A atividade de quitinase foi medida por meio da liberação de açúcares redutores a partir da hidrólise da quitina, usando o método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959).

O ensaio foi composto por: 100 µL de extrato bruto enzimático (1%), 400 µL de tampão acetato de sódio 50 mM pH 4,2 e 500 µL de quitina coloidal. A reação foi incubada durante 60 minutos a 37°C em banho-maria. A reação foi interrompida pela adição de 100 µL do reagente de DNS. A quantidade de açúcares redutores liberados foi determinada pela leitura de absorbância a 540 nm pela metodologia adaptada de Esteves et al. (2009).

Uma curva padrão de N-acetilglicosamina foi construída para a quantificação da atividade enzimática, preparou uma solução estoque 0,1% (v/v) para realizar as seguintes diluições de N-acetilglicosamina (1,50, 1,25, 1,00, 0,75, 0,50, 0,40, 0,30, 0,20, 0,10 mL) e água (3,50, 3,75, 4,00, 4,20, 4,50, 4,60, 4,70, 4,80, 4,90 mL):

Pipetou-se 1 mL de cada solução para um tubo, e realizou-se a reação de DNS. A leitura foi feita em espectrofotômetro a 540nm, sendo uma unidade de quitinase definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de N-acetilglicosamina por minuto, nas condições do ensaio.

4.8. Desinfestação de Ovos e Juvenis de *M. javanica*

A desinfestação dos ovos foi realizada por meio da metodologia adaptada de Charlson & Tylka (2003), com uma solução desinfestante de 10mL de clorexidina (Digluconato de Clorhexidina) a 0,5% obtida pela diluição de 5 mL do produto em 7,5 mL de água destilada autoclavada. Após a extração e centrifugação, os ovos foram colocados em Eppendorfs de 2 mL e centrifugados a 10.000 g por 1 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi retirado, adicionou-se 1 mL da clorexidina, agitou-se e deixou-o agir por 15 minutos. O mesmo processo descrito anteriormente foi repetido 2 vezes com água destilada autoclavada. A seguir, a amostra foi agitada e deixada em descanso por 10 minutos no final da primeira repetição e para a última 5 minutos. Finalmente, a amostra foi centrifugada, o sobrenadante foi retirado e adicionaram-se 2 mL de água destilada autoclavada. O conteúdo do Eppendorff foi transferido para um recipiente maior. Na desinfestação de juvenis se utilizou a concentração de 0,12% de clorexidina, e utilizou-se a metade da suspensão de juvenis em Eppendorfs de 2 mL. A solução desinfestante foi adicionada, agitada e centrifugada a 10.000 g por 1 minuto, e a seguir os mesmos procedimentos da desinfestação de ovos de *M. javanica* foram repetidos.

4.9. Eclosão de J2 na presença de quitinases e proteases

Por meio da metodologia adaptada de Salgado & Campos (2003), uma suspensão aquosa (200 µL) contendo aproximadamente 200 ovos de *M. javanica* foi colocada em uma câmara de eclosão, que consiste em 40 microtubos eppendorfs de 600 µL, colocados em BOD a 28 °C no escuro (11 dias). Em seguida, uma solução contendo quitinases fúngicas foi adicionada à câmara de eclosão. Os ovos foram expostos a 200 µL das diferentes concentrações de MSQ (0,06; 0,12; 0,25; 0,50%) dos materiais testados. O controle negativo foi água esterilizada. A contagem dos J2 eclodidos foi feita após 11 dias subsequentes de incubação, colocando a suspensão em poços da placa de Elisa e levando ao microscópio de objetiva invertida.

4.10. Mortalidade de J2 pelas proteases

Em 40 microtubos eppendorfs de 600 µL foram depositados 200 µL de uma suspensão aquosa contendo 100 J2 de *M. javanica*. A seguir, os J2 foram expostos a 200 µL de diferentes concentrações de extratos brutos enzimáticos sendo com os macerados (MSS, MSQ, MLS, MSQ, 2%) e MSQ (0,25; 0,5; 1 e 2%) dos materiais testados. O controle negativo foi água destilada esterilizada. A leitura de mortalidade de J2 foi realizada as 48 horas após o tratamento e, para certificar-se que os J2 paralisados estariam mortos, foi adicionado NaOH (0,24%), como proposto por Chen e Dickson (2000). Imediatamente, procedeu a contagem dos J2 mortos (inativos e esticados) e vivos (ativos) em placa de Elisa no microscópio invertido. Calculou-se, assim, a porcentagem de mortalidade dos J2.

4.11. Controle do nematoide de galhas

As mudas de tomate cv. Santa Clara com 27 dias após a semeadura foram transplantadas em bandejas de isopor com mistura do substrato vermiculita e orgânico (1:1). O solo foi infestado com 2 mL de *M. javanica* (2.000 ovos por célula) juntamente com 2 mL de macerado sólido de *P. chlamydosporia* com quitina nas concentrações (MSQ, 0,5; 1,0; 4,0%). O controle negativo foi água esterilizada. Após 50 dias, foram avaliados o número de galhas e massa fresca da raiz.

4.12. Delineamento Experimental

O delineamento foi inteiramente casualizado, formado por:

- Teste de mortalidade de juvenis de segundo estágio (J2) de *M. javanica* em 200 µL dos extratos brutos enzimáticos em solução aquosa (MSS, MSQ, MLS, MSQ, 2%), (MSQ, 0,25; 0,5, 1, 2%) e controle negativo, sendo composto por 5 tratamentos e 8 repetições;
- Teste de eclosão de J2 de *M. javanica*: 200 µL dos extratos brutos enzimáticos de macerado sólido de *P. chlamydosporia* com quitina (MSQ, 0,06; 0,12; 0,25; 0,50%) e controle negativo, tendo 5 tratamentos e 8 repetições;
- Teste *in vivo* de *M. javanica*: 2 mL do extrato bruto enzimático de macerado sólido de *P. chlamydosporia* com quitina, composto por 4 tratamentos e 6 repetições (MSQ, 0,5; 1,0; 4,0 %) e controle negativo em solução aquosa com aplicação no solo das mudas de tomateiro presente em bandejas.

4.13. Análise estatística

Após os pressupostos de testes de médias serem atendidos, foi realizada a ANOVA (análise de variância), teste de Tukey e Scott-knott com nível de probabilidade de 5%. Para as variáveis quantitativas utilizou o modelo de regressão linear pelo programa R (R CORE TEAM, 2016).

5. RESULTADOS

Com base nos resultados (Figura 4) foi observado que os extratos brutos enzimáticos (1%) dos macerados sólidos de *P. chlamydosporia* sem e com quitina (MSS, 1,23 U/mg e MSQ, 0,71 U/mg) apresentaram maior atividade enzimática específica em comparação com os demais tratamentos com macerados líquidos de *P. chlamydosporia* sem e com quitina (MLS, 0,58 U/mg e MLQ, 0,29U/mg).

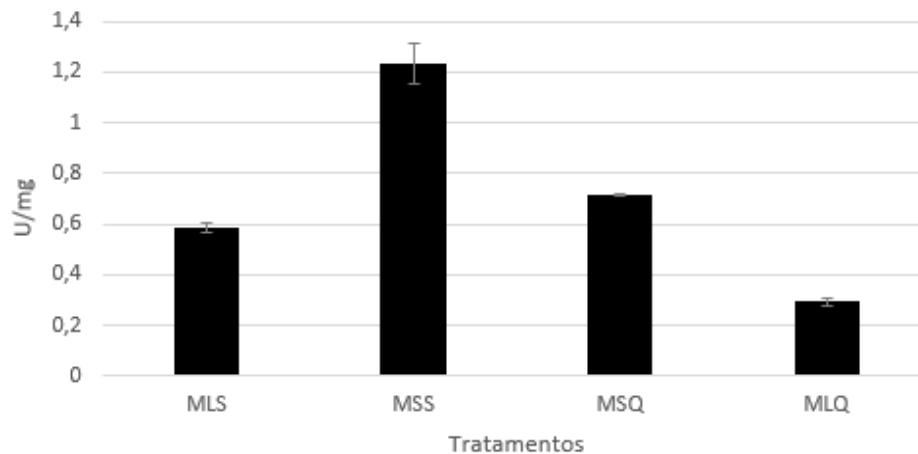


Figura 4. Atividade específica proteolítica dos extratos brutos dos macerados de cultura de *Pochonia chlamydosporia*: MLS (macerado líquido sem quitina, 0,58 U/mg), MSS (macerado sólido sem quitina, 1,23 U/mg), MSQ (macerado sólido com quitina, 0,71 U/mg) e MLQ (macerado líquido com quitina, 0,29U/mg). U= micrograma de tirosina por minuto de reação, nas condições de ensaio.

Para quitinases (Figura 5) os extratos brutos enzimáticos (1%) dos macerados sólidos a (MSS, 0,06 U/mL e MSQ, 0,10 U/mL) foram os que mais tiveram atividade de quitinase em relação aos macerados líquidos (MLS, 0,12 U/mL e MLQ, 0,01 U/mL).

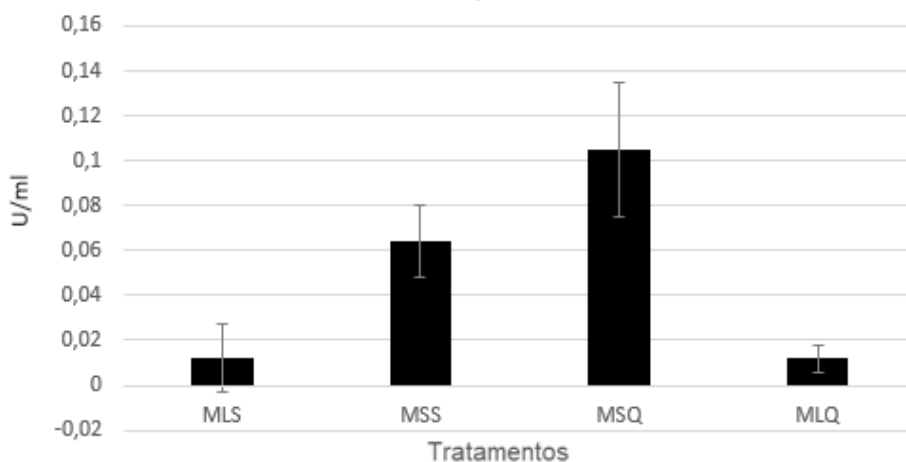


Figura 5. Atividade específica de quitinases dos extratos brutos dos macerados de cultura de *Pochonia chlamydosporia*: MLS (macerado líquido sem quitina, 0,12 U/mL), MSS (macerado sólido sem quitina, 0,06 U/mL), MSQ (macerado sólido com quitina, 0,10 U/mL) e MLQ (macerado líquido com quitina, 0,01U/mL). U= micromol de N-acetilglicosamina por minuto de reação, nas condições de ensaio.

Na atividade específica da protease VCP1 (Figura 6) os macerados sem quitina (MLS, $49 \cdot 10^{-3}$ $\mu\text{g}/\text{min}$; MSS, $45 \cdot 10^{-3}$ $\mu\text{g}/\text{min}$) teve maior produção do que os macerados com quitina (MSQ, $35 \cdot 10^{-3}$ $\mu\text{g}/\text{min}$; MLQ, $36 \cdot 10^{-3}$ $\mu\text{g}/\text{min}$).

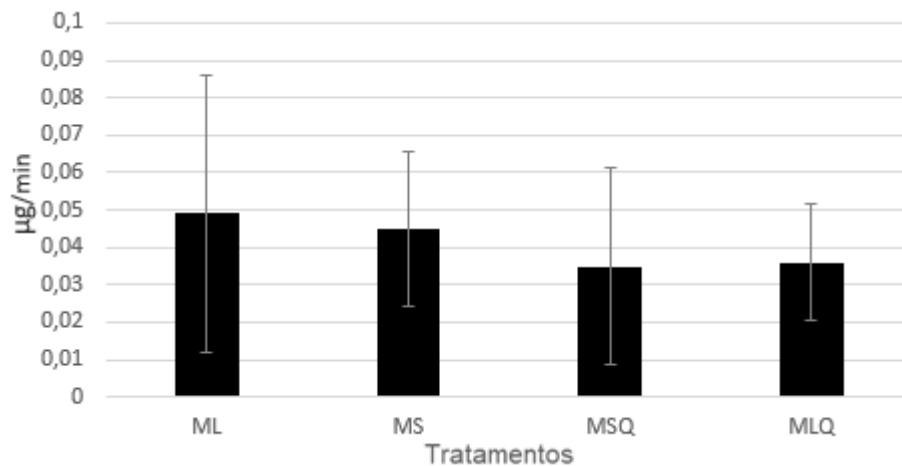


Figura 6. Atividade específica da protease VCP1 dos extratos brutos dos meios de cultura de *Pochonia chlamydosporia*: MLS (macerado líquido sem quitina, 49.10^{-3} µg/min), MSS (macerado sólido sem quitina, 45.10^{-3} µg/min), MSQ (macerado sólido com quitina, 35.10^{-3} µg/min) e MLQ (macerado líquido com quitina, 36.10^{-3} µg/min).

Os resultados (Figura 7) da porcentagem de mortalidade dos juvenis de segundo estágio (J2) foram significativos ($P \leq 0,05$) quando comparado com o controle (água). Os extratos brutos dos macerados sólidos (MSS 91,83%; MSQ 55,73%) apresentaram maior mortalidade de juvenis do que os demais tratamentos (Água 5,79%; MLQ 22,48 %; MLS 40,93%), os macerados líquidos foram estatisticamente iguais (MLQ 22,48%; ML 40,93%) e o MLQ (22,48%) e maior que a água (5,79%).

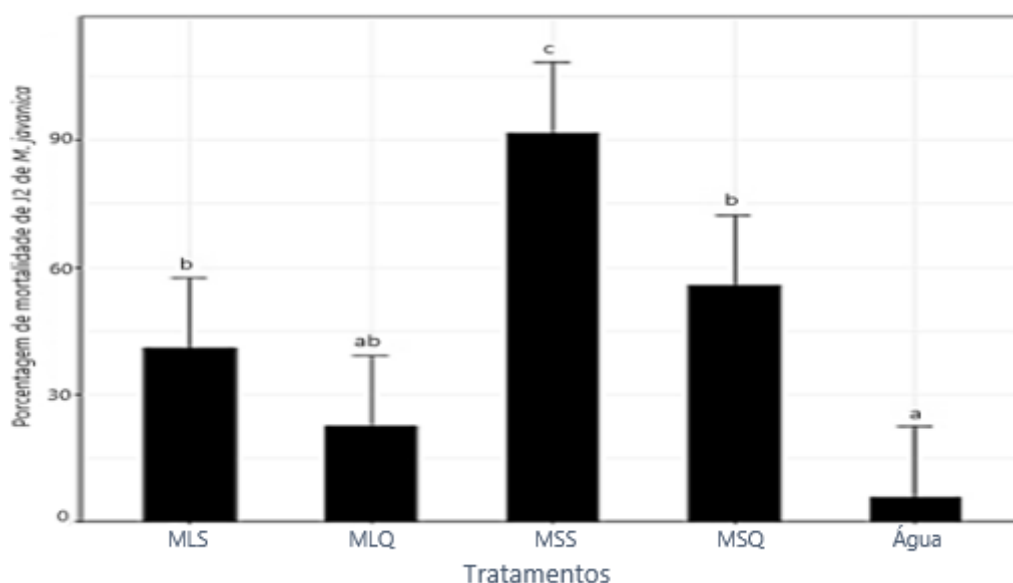


Figura 7. Porcentagem de mortalidade de J2 de *Meloidogyne javanica* em contato com os extratos brutos enzimáticos de macerado sólido e líquido com e sem quitina de *Pochonia chlamydosporia* em solução aquosa (2%).

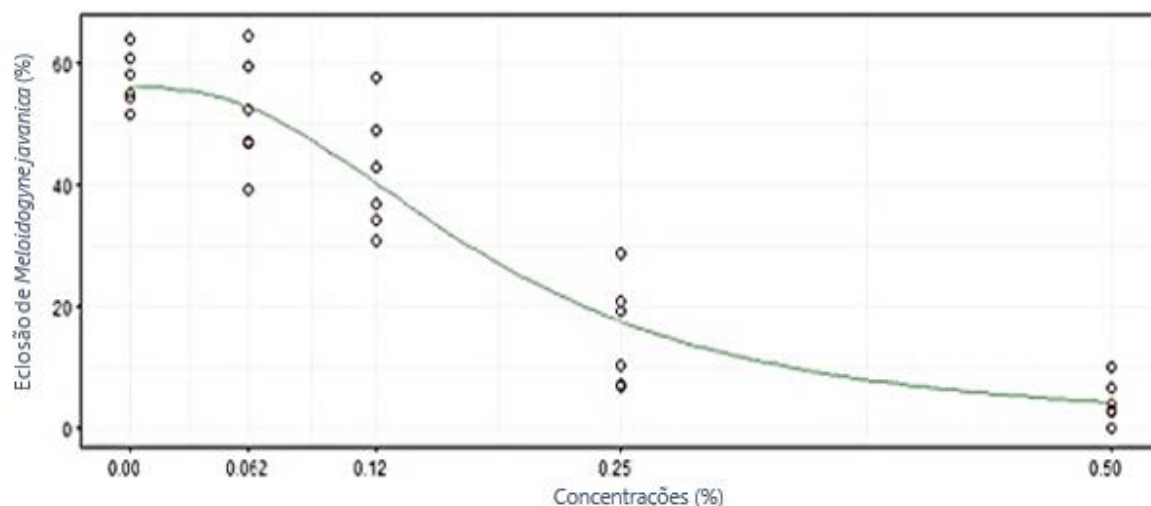


Figura 9. Análise de Regressão do percentual de J2 de *Meloidogyne javanica* eclodidos em contato com diferentes concentrações de extratos brutos enzimáticos de macerado sólido de *Pochonia chlamydosporia* com quitina em solução aquosa.

No experimento *in vivo* (Tabela 4), as massas frescas das raízes foram iguais estatisticamente a todos tratamentos, e os macerados sólidos com quitina (MSQ 0,5% 5,60 g, 1% 5,31 g) foram maiores em comparação ao controle (MSQ 0% 4,38 g) e 4% (4,35 g). O número de galhas de *M. javanica* dos tratamentos diferiram estatisticamente ($P \leq 0,05$) do controle (113,43 galhas/g), e a concentração com maior redução foi 0,5% (43 galhas/g) em relação ao controle e tratamentos (1, 4%).

Tabela 1. Valores médios das variáveis: massa fresca da raiz, galhas e ovos nas raízes de tomateiros 50 dias após a inoculação de 2.000 ovos de *Meloidogyne javanica*.

Tratamentos	Concentrações %	Massa Fresca da Raiz (g)	Galhas/g de Raiz
MSQ	0	4,38 a	113,43 a
MSQ	0,5	5,60 a	43,00 b
MSQ	1	5,31 a	52,06 b
MSQ	4	4,35 a	53,10 b

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si em nível de 5% de significância pelo teste de Scott-knott.

6. DISCUSSÃO

Os fungos nematófagos como *Pochonia chlamydosporia* produzem enzimas (proteases e quitinases) que afetam aos nematoides (BRAGA, 2011c; SOARES, 2015). No trabalho de Soares et al. (2015), foi demonstrado que as proteases de *P. chlamydosporia* (VC4) reduziram 75% da eclosão de *Ascaris suum* após 14 dias de contato. Devi e Bora (2018), confirmaram que os fungos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* inibiram a eclosão de J2 de

Meloidogyne incognita em 59,34 e 58,35% na concentração de 10% de filtrado de cultura durante 72 h de exposição.

As atividades de proteases e quitinases influenciam muito na atividade nematicida das enzimas, isto é evidenciado por meio dos resultados deste trabalho (Figuras 4, 5, 6, 7 e 8) em que ficam demonstrando que os extratos brutos enzimáticos de *P. chlamydosporia* dos macerados sólidos sem quitina (MSS) e com quitina e (MSQ) com atividades específicas de proteases (MSS 1,23 U/mg, MSQ 0,71 U/mg), quitinases (MS 0,06 U/mL MSQ 0,10 U/mL) e protease VCP1 (MSS $45 \cdot 10^{-3}$ µg/min, MSQ $35 \cdot 10^{-3}$ µg/min) apresentaram maior mortalidade de J2 (MS 91,83%; MSQ 55,73%) do que os demais tratamentos (água 5,79%; MLQ 22,48%; ML 40,93%). E em dois ensaios *in vitro* as concentrações de 0,125 (33,33%), 0,25 (26,73%) e 0,50% (9,67%) de MSQ reduziram drasticamente o percentual de eclosão dos J2 de *Meloidogyne javanica*.

Os resultados dos experimentos de eclosão de J2 de *M. javanica* com extratos do macerado sólido com quitina de *P. chlamydosporia* (MSQ) nas concentrações de 0,12 (66,67%), 0,25 (73,27%) e 0,500% (90,33%) apresentaram maior atividade ovicida. Braga et al. (2012) demonstraram resultados próximos (MSQ 0,25 e 0,5%) com os extratos brutos dos isolados de *P. chlamydosporia* VC1 (0,06 U/µg) e VC4 (0,18 U/µg) que tiveram percentual ovicida de 68 e 78% sobre os ovos de *Oxyuris equi* em meio SSA (meio de ágar suplementado com amido). Também Nguyen et al. (2007) comprovaram a eficácia de 0,5% de quitinase bruta B-3 (*Lecanicillium antillanum*) que afetou 78% dos ovos de *M. incognita* no quarto dia após o tratamento ter contato com a quitinase.

Nos experimentos *in vitro* de mortalidade de J2 de *M. javanica* os extratos brutos dos macerados sólidos de *P. chlamydosporia* (MSS 91,83%; MSQ 55,73%) a 2% causaram maiores mortes de J2. Resultados semelhantes ao MSQ (2%) foi de Aminuzzaman et al. (2018) com *Purpureocillium lilacinum* PLSAU 1 (10^5 esporos/ml) que causou 52% de mortalidade em J2 de *M. incognita*, e o mesmo para Binh et al. (2019) em que *Paecilomyces variotii* NV01 (atividade proteolítica de 82,3 U/ml, 0,65% de caseína) provocou 50,4% de mortes em J2 de *Meloidogyne* spp. O percentual de mortalidade quase similar ao MSS (2%) foi de Wan et al. (2021) que mostrou a mortalidade *M. incognita* com 81,50% a 100 µg/mL de *Drechmeria coniospora* YMF1.01759 por 48 h.

De acordo com Lopez-Llorca e Robertson (1992) as proteases *in vitro* estão envolvidas na penetração de fungos em juvenis de nematoides. Nos experimentos *in vitro* (Figura 8), a

concentração que apresentou maior capacidade de causar a mortalidade de J2 de *M. javanica* foi o MSQ com concentração 0,5% (100%) e atividade específica de proteases (0,71 U/mg) em comparação aos demais tratamentos (MSQ 0% 27,49%; MSQ 0,25% 51,95%). Com analogia a atividade nematicida MSQ a 0,25% foi o experimento de Soares et al. (2019) na qual a protease do fungo *Hypsizygus marmoreus* (atividade proteolítica de $195,36 \pm 18,38$ U. g⁻¹) reduziu 52% da população do nematoide de vida livre *Panagrellus redivivus*. Próximo ao resultado de MSQ na concentração de 0,5% é o de Comans-Pérez et al. (2021) em que *Pleurotus eryngii* 1292 causa a mortalidade de 90,8% em *Haemonchus contortus* até 72 h após a exposição a 200 mg/mL de extrato.

A aplicação de proteases e quitinases de MSQ no solo de tomateiros (Tabela 1) foi eficiente na redução de galhas de *M. javanica* (MSQ 0,5% 62,09; 1% 54,10; 4% 53,18%) em relação ao MSQ 0%. Estes resultados *in vivo* foram parecidos (Tabela 1) aos trabalhos de Jang et al. (2016) com aplicação de uma mistura do filtrado de *Aspergillus niger* F22-WP10 (10%) e ácido oxálico-WP8 (8%) na proporção 1:1 em diluições de 1.000 e 500 vezes, reduziu a formação de galhas de raízes de melancia em 58,8% e 70,7% em solo infestado naturalmente com *M. incognita*. Também Niranjan e Waquar (2021) que revelou que a mistura *Purpureocillium lilacinum* incubado em 20 mg/kg de solo com 10 g/kg de esterco de fazenda reduziu o número de galhas de tomateiro com *M. incognita* em 62%.

Portanto, não há dúvidas de que o extrato bruto do macerado sólido de quitina de *P. chlamydosporia* (MSQ) afeta a infectividade de *M. javanica in vivo*, apresentando elevado potencial nematicida para aplicação líquida no solo infestado com nematoides. Além disso, acredita-se que o MSQ poderá ser utilizado para o desenvolvimento de novos nematicidas bioquímicos, uma vez que este extrato atua no J2 e ovos *M. javanica in vitro*. Novos estudos são necessários para conhecer melhor o seu modo de atuação e as viabilidades de uso em campo.

7. CONCLUSÃO

- Os extratos brutos de MSS (2%) e MSQ (0,5 e 2%) foram eficientes na redução da eclosão e aumento da mortalidade de J2 de *M. javanica*;
- A concentração letal que causou a morte de 50% dos nematoides (CL50) pelo extrato bruto enzimático MSQ (0,5%) foi 0,32%;
- O extrato enzimático de *P. chlamydosporia* (MSQ 0,5%) possuem efeito ovicida, nematicida *in vitro* e redutor de infectividade de *M. javanica in vivo*;

- A atividade enzimática dos extratos do fungo *P. chlamydosporia* foi comprovado pelas atividades específicas proteolíticas (MSS 1,23 U/mg; MSQ, 0,71 U/mg), quitinases (MSS, 0,06 U/mL, MSQ 0,10 U/mL) e protease VCP1 (MS, 45.10^{-3} µg/min, MSQ, 35.10^{-3} µg/min).

8. REFERÊNCIAS

- ABDELSAMAD, N.; REGMI, H.; DESAEGER, J.; DIGENNARO, P. Nicotinamide adenine dinucleotide induced resistance against root-knot nematode *Meloidogyne hapla* is based on increased tomato basal defense. **Journal of nematology**, v.51, p.1–10, 2019. <https://doi.org/10.21307/jofnem-2019-022>
- ALCÂNTARA, V. S. B. & AZEVEDO, J. L. de. Isolamento e seleção de fungos predadores de nematoides. **Revista Agrícola**, v.56, p.135-46, 1981. <https://doi.org/10.37856/bja.v56i3.593>.
- ALVARENGA, M. A. R. **Tomate: produção em campo, casa-de-vegetação e em hidroponia**. Lavras: UFLA. 400p., 2004.
- AMINUZZAMAN, F. M.; JAHAN, S. N.; SHAMMI, J.; MITU, A. I.; LIU, X. Z. Isolation and screening of fungi associated with eggs and females of root-knot nematodes and their biocontrol potential against *Meloidogyne incognita* in Bangladesh. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v.51, n.5-6, p.288–308, 2018. <https://doi.org/10.1080/03235408.2018.1472359>
- ARAÚJO, J. V.; ASSIS, R. C. L.; ALVES, P. H.; CAMPOS, A. K.; GANDRA, J. R. Controle biológico de tricostrongilídeos (Nematoda: Trichostrongyloidea) gastrintestinais de bovinos pelo fungo *Monacrosporium sinense*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, n.4, p.467-471, 2004. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352004000400007>.
- ARAÚJO, J. M., ARAÚJO, J. V., BRAGA, F. R., CARVALHO, R. O., SILVA, A. R., CAMPOS, A. K. Interaction and ovicidal activity of nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* on *Taenia saginata* eggs. **Experimental Parasitology**, v.121, p.338–341, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2008.12.011>.
- ASMUS, G. L. Danos causados à cultura da soja por nematoides do gênero *Meloidogyne*. In: Ferraz, L. C. B.; Asmus, G. L.; Carneiro, R. G.; Mazaferra, P.; Silva, J. F. V. **Relações parasito-hopedeiro nas meloidoginoses da soja**. Embrapa Soja, Londrina, PR, p. 39-56, 2001.
- BAI, Y. & LINDHOUT, P. Domestication and Breeding of Tomatoes: What have We Gained and What Can We Gain in the Future?, **Annals of Botany**, v. 100, p.1085–1094, 2007. <https://doi.org/10.1093/aob/mcm150>.
- BARBOSA, R. T., T. S. A. MONTEIRO, R. R. COUTINHO, J. G. SILVA, E L. G. FREITAS. *Pochonia chlamydosporia* no controle do nematoide de galhas em bananeira. **Nematropica**, v.49, p.99-106, 2019. <https://dx.doi.org/10.1093%2Faob%2Fmcm150>.

BAERMANN, G. Eine einfache methode zur auffindung Von ankvlostomum (Nematoden) larven in erdproben. **Nederlands Indie**, v. 57, p. 131 – 7, 1917.

BECKER, W. F.; WAMSER, A. F.; FELTRIM, A. L.; SUZUKI, A.; SANTOS, J. P.; VALMORBIDA, J.; HAHN, L.; MARCUZZO, L. L; MUELLER, S. **Sistema de produção integrada para o tomate tutorado em Santa Catarina**. Florianópolis, SC: Epagri, 2016, 149p.

BINH, C.; TUAN, T.; TRAM, T.; HA, B. Determination of protease and chitinase activities from *Paecilomyces variotii* NV01 isolated from Dak Lak pepper soil. **Vietnam Journal Of Science, Technology And Engineering**, v.61, n.4, p.58-63, 2019.

BONANTS, P. J.; FITTERS, P. F.; THUIS, H.; DEN BELDER, E.; WAALWIJK, C.; HENFLING, J. W. A basic serine protease from *Paecilomyces lilacinus* with biological activity against *Meloidogyne hapla* eggs. **Microbiology**, v.141, p.775-784, 1995. <https://doi.org/10.1099/13500872-141-4-775>.

BONTEMPO, A. F.; LOPES, E. A.; FERNANDES, R. H.; FREITAS, L.G; DALLEMOLE-GIARETTA, R. Efeito Dose-Resposta de *Pochonia chlamydosporia* sobre *Meloidogyne incognita* em Cenoura em Condições de Campo. **Revista Caatinga**, v.30, n.1, p. 258 –262, 2017. <https://doi.org/10.1590/1983-21252017v30n129rc>.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v.72, p.248–254, 1976.

BRAGA, F. R.; ARAUJO, J. M.; TAVELA, A. O.; ARAÚJO, J. V.; SOARES, F. E. F.; GENIÊR, H. L. A.; LIMA, W. S.; MOZER, L. R.; QUEIROZ, J. H. Atividade larvicida do extrato bruto enzimático do fungo *Duddingtonia flagras* sobre larvas de primeiro estágio de *Angiostrongylus vasorum*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.44, p.383-385, 2011a. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822011000300024>.

BRAGA, F. R.; ARAÚJO, J. V.; SOARES, F. E. F.; ARAUJO, J. M.; FERREIRA, S.R.; FRASSY, L. N.; QUEIROZ, J. H. Production and partial characterization of *Duddingtonia flagrans* (AC001) crude extract and its *in vitro* larvicidal action against trichostrongylid infective larvae, **Biocontrol Science and Technology**, v.21, n.11, p.1313-1320, 2011b. <https://doi.org/10.1080/09583157.2011.619258>.

BRAGA, F. R.; ARAÚJO, J. M.; SILVA, A. R.; ARAÚJO, J. V.; CARVALHO, R. O.; SOARES, F. E. F.; QUEIROZ, J. H.; GENIER, H. L. A. Ação ovicida do extrato bruto enzimático do fungo *Pochonia chlamydosporia* sobre ovos de *Ancylostoma* sp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.44, n.1, p.116-118, 2011c. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822011000100027>.

BRAGA, F. R.; ARAÚJO, J. V.; SOARES, F. E. F.; TAVELA, A. O.; ARAUJO, J. M.; CARVALHO, R. O.; FERNANDES, F. M.; QUEIROZ, J. H. Enzymatic analysis and *in vitro* ovicidal effect of *Pochonia chlamydosporia* and *Paecilomyces lilacinus* on *Oxyuris equi* eggs of horses. **Biocontrol Science and Technology**, v.22, n.6, p.685-696, 2012. <https://doi.org/10.1080/09583157.2012.677807>

BRAGA, F. R.; ARAUJO, J. V.; SOARES, F. E. F.; ARAUJO, J. M.; TAVELA, A. O.; MELLO, I. N. K.; PAULA, A. T.; LELIS, R.; QUEIROZ, J. H. Interaction of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* on *Amblyomma cajannense* engorged females and enzymatic characterization of its chitinase. **Biocontrol Science and Technology**, v.23, p.584–594, 2013. <https://doi.org/10.1080/09583157.2013.789481>.

BRAGA, F. R.; DE ARAÚJO, J. V. Nematophagous fungi for biological control of gastrointestinal nematodes in domestic animals. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 98, p.71–82, 2014a. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5366-z>.

BRAGA, F. R.; SOARES, F. E. F.; ARAUJO, J. M.; FONSECA, L. A.; HIURA, E.; GAVA, M. G.; VIEIRA, F. T.; PAZ, J. S.; CARVALHO, L. M.; FACCINI, J. V.; QUEIROZ, J. H.; ARAÚJO, J. V. Statistical experimental design to assess the influence of enzymes of nematophagous fungi *versus* helminths. **Research in Veterinary Science**, v.97, n.3, 527-532, 2014b. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2014.09.005>.

BROWN, C. R.; MOJTAHEDI, H.; SANTOS, G. S.; WILLIAMSON, V. M. The effect of the Mi gene in tomato on reproductive factors of *Meloidogyne chitwoodi* and *M. hapla*. **Journal of Nematology**, v.29, 3ed., p.416-419, 1997.

CARNEIRO, R. M. D. G.; CARNEIRO, R. G.; NEVES, D. I. N.; ALMEIDA, M. R. A. Nova raça de *Meloidogyne javanica* detectada em *Arachis pintoi* no estado do Paraná. **Nematologia Brasileira**, v.27, p.219-222, 2003.

CARNEIRO, R. M. D. G.; ALMEIDA, M. R. A.; BRAGA, R. S.; ALMEIDA, C. A.; GIORIA, R. Primeiro Registro de *Meloidogyne mayaguensis* parasitando plantas de tomate e pimentão resistentes à meloidoginose no estado de São Paulo. **Nematologia Brasileira**, v. 30, n. 1, p. 81-86, 2006.

CARNEIRO, R. M. D. G.; MONTEIRO, J. DA M. DOS S.; SILVA, U. C.; GOMES, G. Gênero *Meloidogyne*: diagnose através de eletroforese de isoenzimas e marcadores SCAR. *In*: Oliveira, M. G. de; Santos, M. A. dos; Castro, L. H. S. **Diagnose de Fitonematoides**. Campinas, SP: Millenium Editora, p.47-70, 2016.

CECCARELLI, A.V.; MIRAS-MORENO, B.; BUFFAGNI, V.; SENIZZA, B.; PII, Y.; CARDARELLI, M.; ROUPHAEL, Y.; COLLA, G.; LUCINI, L. Foliar Application of Different Vegetal-Derived Protein Hydrolysates Distinctively Modulates Tomato Root Development and Metabolism. **Plants**, v.10, n.2, 326p., 2021. <https://doi.org/10.3390/plants10020326>

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

CHARCHAR, J. M. & MOITA, A. W. Resistência de genótipos de batata a *M. javanica*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, n.3, 535-540, 2001. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2001000300019>

CHARLSON, D. V. & TYLKA, G. L. *Heterodera glycines* Cyst Components and Surface Disinfestants Affect *H. glycines* Hatching. **Journal of nematology**, v. 35, n.4, 458–464, 2003.

COMANS-PÉREZ, R. J.; SÁNCHEZ, J. E.; AL-ANI, L. K. T.; GONZÁLEZ-CORTÁZAR, M.; CASTAÑEDA-RAMÍREZ, G. S.; MENDOZA-DE-GIVES, P.; SÁNCHEZ-GARCÍA, A. D.; MILLÁN-OROZCO, J.; AGUILAR-MARCELINO, L. Biological control of sheep nematode *Haemonchus contortus* using edible mushrooms. **Biological Control**, v.152, 104420 p., 2021. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104420>

CORREIA, E. C. S. S.; NEVES, M. I. R. S.; SILVA, L. S.; SANTOS, D. S.; DOMINGUES NETO, F. J. Estratégias e Desafios no Manejo de Nematoides Formadores de Galhas (*Meloidogyne* spp.) em Cultivos de Olerícolas: Uma Revisão. **Revista Mirante**, v. 10, p. 19-33, 2017.

DEGENKOLB, T. & VILCINSKAS, A. Metabolites from nematophagous fungi and nematicidal natural products from fungi as an alternative for biological control. Part I: metabolites from nematophagous ascomycetes. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.100, p.3799–3812, 2016. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7233-6>.

DEVI, G. & BORA, L. Effect of some biocontrol agents against root-knot nematode (*Meloidogyne incognita* race2). *International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology*, v.3, p.1748–1755, 2018.

DU, B.; XU, Y.; DONG, H.; LI, Y.; WANG, J. *Phanerochaete chrysosporium* strain B-22, a nematophagous fungus parasitizing *Meloidogyne incognita*. **Plos one**, v.15, n.1, e0216688, 2020. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216688>

EISENBACK, J. D.; TRIANTAPHYLLOU, H. H. Root-knot nematodes: *Meloidogyne* species and races. In: **Manual of agricultural nematology**. CRC Press, 2020. p. 191-274.

ESBENSHADE, P. R. & TRIANTAPHYLLOU, A. C. Isozyme phenotypes for the identification of *Meloidogyne* species. **Journal of Nematology**, v.22, p.10-15, 1990.

ESCUADERO, N. & LOPEZ-LLORCA, L. V. Effects on plant growth and root-knot nematode infection of an endophytic GFP transformant of the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia*. **Symbiosis, Amsterdam**, v.57, n.1, p.33-42, 2012. <https://doi.org/10.1007/s13199-012-0173-3>.

ESTEVEZ, I.; PETEIRA, B.; ATKIM, S.D.; MAGAN, N.; KERRY, B. Production of extracellular enzymes by different isolates of *Pochonia chlamydosporia*. **Mycological research**, v.113, p.867 – 876. 2009. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2009.04.005>

EVANS, H. C. & KIRK, P. M. Systematics of *Pochonia*. In: Perspectives in Sustainable Nematode Management through *Pochonia chlamydosporia* Applications for Root and Rhizosphere Health. **Springer International Publishing**, v.1, p.21-43, 2017.

FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION - FAO. **Top 10 Country Productions of Tomatoes, 2019**. Disponível em: http://www.fao.org/faostat/en/#rankings/countries_by_commodity. Acesso em: 25 jun. 2020.

FREIRE, F. C. O.; BRIDGE, J. Parasitism of eggs, females and juveniles of *Meloidogyne incognita* by *Paecilomyces lilacinus* and *Verticillium chlamydosporium*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 10, p. 577-596, 1985.

FREIRE, C. R.; DAVIDE, L. C.; CAMPOS, V. P.; SANTOS, C. D. DOS; FREIRE, P. W. Cromossomos de três espécies brasileiras de *Meloidogyne*. **Ciência agrotécnica**, v.26, n.5, p.900-903, 2002.

GAJENDIRAN, K.; VIJAYARANGAN, P. Nematophagous Fungi: A Biological Agent for Regulation of Plant Parasitic Nematodes. **International Journal of Environmental & Agriculture Research**, v.6, n.4, p.01–06, 2020. <https://doi.org/10.5281/zenodo.3777999>

GAN, Z.; YANG, J.; TAO, N.; LIANG, L.; MI, Q.; LI, J.; ZHANG, K. Q. Cloning of the gene *Lecanicillium psalliotae* chitinase Lpch1 and identification of its potential role in the biocontrol of root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. **Biotechnologically Relevant Enzymes and Proteins. Applied Microbiology and Biotechnology**, v.76, p.1309–1317, 2007. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1111-9>.

GENIER, H. L. A.; QUEIROZ, J. H. DE; BRAGA, F. R.; SOARES, F. E. F.; ARAÚJO, J. V. DE; PINHEIRO, I. R. Nematicidal activity of *Paecilomyces marquandii* proteases on infective larvae of *Ancylostoma* spp. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.59, e16160218, 2016. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2016160218>.

GODOY, G., RODRIGUEZ-KABANA, R.; MORGAN-JONES, G. Fungal parasites of *Meloidogyne arenaria* eggs in an Alabama soil. A mycological survey and greenhouse studies. **Nematropica**, v.13, p.201-213, 183.

GONDIM, A. Catálogo brasileiro de hortaliças. In: EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. 2016. Disponível em: <http://www.embrapa.gov.br/dados/publicacao/Catalogo%20hortalicas.pdf>. Acesso em: 20 jun. 2020.

GOTAME, T. P.; SHRESTHA, S. L.; JOSHI, B. K.; KARKI, T. B. **Classification of Crop Plants based on Growing Season, Temperature Requirement and Photosynthetic Behavior. Working Groups of Agricultural Plant Genetic Resources (APGRs) in Nepal**, 103p., 2018.

GOULD, D. W. A. **Tomato production, processing & technology**. 3. ed. CT1 publications. 1992. 500p.

GOUVEIA, A.S.; SOARES, F. E. F.; MORGAN, T.; SUFIATE, B. L.; TAVARES, G. P.; BRAGA, F. R.; MONTEIRO, T. S. A.; GENIÊR, H. L. A.; FREITAS, L.G.; QUEIROZ, J. H. Enhanced production of *Monacrosporium thaumasium* protease and destruction action on root knot nematode *Meloidogyne javanica* eggs. **Rhizosphere**, v.3, p.13–15, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2016.12.001>

GRAMINHA, E. B. N.; MAIA, A. S.; SANTOS, J. M.; CÂNDIDO, R. C.; SILVA, G. F.; COSTA, A. J. Avaliação *in vitro* da patogenicidade de fungos predadores de nematoides parasitos de animais domésticos. **Semina Ciências Agrarias**, v.22, n.1, p.11-16, 2001.

GRAY, N. F. Nematophagous fungi with particular reference to their ecology. **Biological Reviews**, v.62, p.245-304, 1987. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.1987.tb00665.x>.

GRAY, N. F. Fungi attacking vermiform nematode. In: Poinar Junior, G. O.; Jansson, N. B. **Disease of nematodes**. Boca Raton, v.2, p. 3-38, 1988.

HAMID, R.; KHAN, M. A.; AHMAD, M.; AHMAD, M. M.; ABDIN, M. Z.; MUSARRAT, J.; JAVED, S. Chitinases: an update. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, v.5, n.1, p.21-29, 2013. <http://dx.doi.org/10.4103/0975-7406.106559>

HIDALGO-DIAZ, L.; BOURNE, J. M.; KERRY, B. R.; RODRÍGUEZ, M. G. Nematophagous *Verticillium* spp. in soils infested with *Meloidogyne* spp. In Cuba: isolation and screening. **International Journal of Pest Management**, v.46, n.4, P.277-284, 2000. <https://doi.org/10.1080/09670870050206046>.

HUSSAIN, M.; KAMRANC, M.; SINGHA, K.; ZOUHAR, MILOSLAV Z.; RYŠÁNEK, P.; ANWARB, S. A. Response of selected okra cultivars to *Meloidogyne incognita*. **Crop Protection**, v.82, p.1-6, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2015.12.024>.

HUSSEY, R. S.; BARKER, K. R. A comparison of methods colleting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. **Plant Disease Reporter**, v.57, p.1025-1028, 1973.

JANG, J. Y.; CHOI, Y. H.; SHIN, T. S.; KIM, T. H.; SHIN, K. S.; PARK, H. W.; KIM, Y. H.; KIM, H.; CHOI, G. J.; JANG, K. S.; CHA, B.; KIM, I. S.; MYUNG, E. J.; KIM, J. C. Biological Control of *Meloidogyne incognita* by *Aspergillus niger* F22 Producing Oxalic Acid. **PLoS One**, v.11, n.6, e0156230, 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156230>

JANSSON, H. B. & NORDBRING-HERTZ, B. Infection mechanisms in the fungus-nematodes system, In: **G.O.Poinar Jr., H.B. Jansson (Eds), Diseases of Nematodes**, v. 2, CRC Press, BocaRaton, Fl, p. 59-72, 1988.

JORGE, D.M. & SOUZA, C.A.V. **O Papel da Regulamentação dos Produtos de Origem Biológica no Avanço da Agroecologia e da Produção Orgânica no Brasil**. In: Jorge, D.M.; Souza, C. A. V. (eds.). A política nacional de agroecologia e produção orgânica no Brasil: uma trajetória de luta pelo desenvolvimento rural sustentável. Brasília: Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada (IPEA), p. 147–194, 2017.

KAO, P. M.; CHEN, C. I.; HUANG, S. C.; CHANG, Y. C.; TSAI, P. J.; LIU, Y. C. Effects of shear stress and mass transfer on chitinase production by *Paenibacillus* sp. CHE-N1. **Biochemical Engineering Journal**, v.34, p.172-178, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2006.11.028>.

KAUR, S.; KANG, S. S.; DHILLON, N. K. K; SHARMA, A. Research/Investigación Detection and Characterization of *Meloidogyne* Species Associated with Pepper in Indian Punjab. **Nematropica**, v.46, p.209-219, 2016.

KHAN, A.; WILLIAMS, K. L.; NEVALAINEN, H. K. M. Effects of *Paecilomyces lilacinus* protease and chitinase on the eggshell structures and hatching of *Meloidogyne javanica* juveniles. **Biological Control**, v. 31, p.346–352, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2004.07.011>.

KEPLER, R. M.; HUMBER, R. A.; BISCHOFF, J. F.; REHNER, S. A. Clarification of generic and species boundaries for *Metarhizium* and related fungi through multigene phylogenetics. **Mycologia**, v.106, p.811-829, 2014.

KWOK, O. C. H.; PLATTNER, R.; WEISLEDER, D.; WICKLOW, D. T. A nematocidal toxin from *Pleurotus ostreatus* NRRL 3526. **Journal of Chemical Ecology**, v. 18, p.127–136, 1992.

LAMOVŠEK, J.; UREK, G.; TRDAN, S. Biological Control of Root-Knot Nematodes (*Meloidogyne* spp.): Microbes against the Pests. **Acta agriculturae Slovenica**, v.102, n.2, p.263 – 275, 2013. <https://doi.org/10.2478/acas-2013-0022>.

LIANG, L.; MENG, Z.; YE, F.; YANG, J.; LIU, S.; SUN, Y.; GUO, Y.; MI, Q.; HUANG, X.; ZOU, C.; RAO, Z.; LOU, R. Z.; ZHANG, K. The crystal structures of two cuticle-degrading proteases from nematophagous fungi and their contribution to infection against nematodes. **The FASEB Journal**, v. 24, n. 5, p. 1391–1400, 2010. <https://doi.org/10.1096/fj.09-136408>.

LIU, X. & KOKARE, C. Microbial enzymes of use in industry. In: Brahmachari G, editor. *Biotechnology of microbial enzymes: production, biocatalysis and industrial applications*. **Cambridge: Academic Press**; p.267-298, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-803725-6.00011-X>.

LOPES, E. A.; FERRAZ, S.; FERREIRA, P. A.; FREITAS, L. G.; DHINGRA, O. D.; GARDIANO, C. G.; CARVALHO, S. L. Potencial de isolados de fungos nematófagos no controle de *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, v. 31 n. 2, p. 78-84, 2007.

LOPEZ-LLORCA, L.V.; MACIÁ-VICENTE, J. G.; JANSSON, H. B. **Mode of action and interactions of nematophagous fungi**. In: Ciancio, A., Mukerji, K.G. (Eds.), *Integrated Management and Biocontrol of Vegetable and Grain Crops Nematodes*. Springer, Dordrecht, v. 2, p. 51–76, 2008. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6063-2_3

LOPEZ-LLORCA, L. V.; OLIVARES-BERNABEU, C.; SALINAS, J.; JANSSON, J. H. B.; KOLATTUKUDY, P. E. Pre-penetration events in fungal parasitism of nematode eggs. **Mycological Research**, v. 106, p. 499-506, 2002. <https://doi.org/10.1017/S0953756202005798>

LOPEZ-LLORCA, L. V. Purification and properties of extracellular proteases produced by the nematophagous fungus *Verticillium suchlasporium*. **Canadian Journal of Microbiology**, v.36, p.530–537, 1990. <https://doi.org/10.1139/m90-093>.

LOPEZ-LLORCA, L.V. & ROBERTSON, W.M. Immunocytochemical localization of a 32-kDa protease from the nematophagous fungus *Verticillium suchlasporium* in infected nematode eggs. **Experimental Mycology**, v.16, n.4, p.261–267, 1992. [https://doi.org/10.1016/0147-5975\(92\)90002-9](https://doi.org/10.1016/0147-5975(92)90002-9).

LÓPEZ-OTÍN, C.; OVERALL, C. Protease degradomics: A new challenge for proteomics. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.3, p.509–519, 2002. <https://doi.org/10.1038/nrm858>

LORDELO, A. I. L. & LORDELO, R. R. A. Genótipos de milho indicados para plantio em áreas infestadas por *Meloidogyne javanica*. **O Agrônomo**, v.44, n.1/3, p. 74- 76, 1992.

LOGUERCIO-LEITE, C. & ESPOSITO, E. Fungos: estrutura e ultra-estrutura. **In: fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: Editora da Universidade de Caxias do Sul, p. 12-44, 2004.

LUO, H.; MO, M. H.; HUANG, X. W.; LI, X.; ZHANG, K. Q. *Coprinus comatus*: A basidiomycete fungus forms novel spiny structures and infects nematodes. **Mycologia**, v. 96, p.1218–1225, 2004.

LUO, H.; LI, X.; LI, G.; PAN, Y.; ZHANG, K. Acanthocytes of *Stropharia rugosoannulata* function as a nematode-attacking device. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p.2982–2987, 2006. <https://dx.doi.org/10.1128%2FAEM.72.4.2982-2987.2006>

LUO, H.; LIU, Y.; FANG, L.; LI, X.; TANG, N.; ZHANG, K. *Coprinus comatus* damages nematode cuticles mechanically with spiny balls and produces potent toxins to immobilize nematodes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p.3916-3923, 2007. <https://doi.org/10.1128/aem.02770-06>

MATTOS, J. K. A. Nematoides do solo como indicadores da interferência humana nos sistemas naturais: aspectos gerais e alguns resultados obtidos no Brasil. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.10, p.373-390. 2002.

MEYER, W. J.; WIEBE, M. G. Enzyme production by the nematode-trapping fungus, *Duddingtonia flagrans*. **Biotechnol Letters**, v. 25, p.791-795, 2003. <https://doi.org/10.1023/A:1023580621840>.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, p.426-428, 1959. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>.

MORGAN-JONES, G.; WHITE, J. F.; RODRÍGUEZ-KÁBANA, R. Phytonematode pathology: Ultrastructural studies. I. Parasitism of *Meloidogyne arenaria* eggs by *Verticillium chlamydosporium*. **Nematropica**, v. 13, n. 2, p. 245-260, 1983.

MOTA, M. A.; CAMPOS, A. K.; ARAÚJO, J. V. Controle Biológico de Helminthos Parasitos de Animais: Estágio Atual e Perspectivas Futuras. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.23, n.3, p.93-100, 2003.

MUKHTAR, T., & HUSSAIN, M. A. Pathogenic Potential of Javanese Root-knot Nematode on Susceptible and Resistant Okra Cultivars. **Pakistan Journal of Zoology**, v.51, n.5, p.1891–1897, 2019. <https://doi.org/10.17582/journal.pjz/2019.51.5.1891.1897>

NARAYANA, K. J. P.; VIJAYALAKSHMI, M. Chitinase production by *Streptomyces* sp. ANU 6277. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.40, p.725-733, 2009. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822009000400002>.

NGUYEN, N. V.; KIM, Y.; OH, K.; JUNG, W.; PARK, R. The role of chitinase from *Lecanicillium antillanum* B-3 in parasitism to root-knot nematode *Meloidogyne incognita* eggs. **Biocontrol Science and Technology**, v.17, n.10, p.1047-1058, 2007. <https://doi.org/10.1080/09583150701668658>.

NIRANJAN, D.; & WAQUAR, T. Bio-Efficacy of *Purpureocillium lilacinum* on Management of Root-Knot Nematode, *Meloidogyne incognita* in Tomato. **Indian Journal of Nematology**, v.51, n.2, p.129-136, 2021. <http://doi.org/10.5958/0974-4444.2021.00020.2>

NONAKA, K.; OMURA, S.; MASUMA, R.; KAIFUCHI, S. Three new *Pochonia* taxa (Clavicipitaceae) from soils in Japan. **Mycologia**, v.105, p.1202-1218, 2013.

NORDBRING-HERTZ, B., NEUMEISTER, H., SJOLLEMA, K., VEENHUIS, M. A conidial trap forming mutant of *Arthrobotrys oligospora*. **Mycological Research**, v. 99, p.1395–1398, 1995. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)81228-8](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)81228-8)

PASQUA, S. D.; DALLEMOLE-GIARETTA, R.; DOS SANTOS, I.; REINER, D. A.; LOPES, E. A. Combined application of *Pochonia chlamydosporia* and solid by-product of the wine industry for the control of *Meloidogyne javanica*. **Applied Soil Ecology**, v.147, 103397 p., 2020. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.103397>.

PINHEIRO, J. B.; PEREIRA, R. B.; SUINAGA, F. A. **Manejo de nematoides na cultura do tomate**. Embrapa. Brasília, DF. Circular Técnica 132. 7 p., 2014a.

PINHEIRO, J. B.; BOITEUX, L. S.; PEREIRA, R. B.; ALMEIDA, M. R. A.; CARNEIRO, R. M. D. G. **Identificação de espécies de *Meloidogyne* em tomateiro no Brasil**. Embrapa, Brasília, 16p., 2014b. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento).

POCURULL, M.; FULLANA, A. M.; FERRO, M.; VALERO, P.; ESCUDERO, N.; SAUS, E.; GABALDÓN, T.; SORRIBAS, F. J. Commercial formulates of *Trichoderma* induce systemic plant resistance to *Meloidogyne incognita* in tomato and the effect is additive to that of the Mi-1.2 resistance gene. **Frontiers in microbiology**, v.10, 3042p., 2020.

PRZYBYLSKA, A. & OBREPALSKA-STEPLOWSKA, A. Plant defense responses in monocotyledonous and dicotyledonous host plants during root-knot nematode infection. **Plant Soil**, v.451, p.239–260, 2020. <https://doi.org/10.1007/s11104-020-04533-0>

R CORE TEAM R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria, 2016.

RAMMAH, A.; HIRSCHMANN, H. *Meloidogyne niayaguensis* n. sp. (Meloidogynidae), a root-knot nematode from Puerto Rico. **Journal of Nematology**, v.20, n.1, p.58-69, 1988.

RAMMAH, A.; HIRSCHMANN, H. Morphological comparison of three host races of *Meloidogyne javanica*. **Journal of Nematology**, v.22, p.56-68, 1990.

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J. Evolutionary families of peptidases. **Biochemistry Journal**, v.290, p. 205-218, 1993. <https://dx.doi.org/10.1042%2Fbj2900205>.

RIBEIRO, R. C. F.; CAMPOS, V. P. Isolamento, identificação e efeito da temperatura no crescimento *in vitro* de fungos parasitas de ovos de *Meloidogyne* spp. do sul de Minas Gerais. **Nematologia Brasileira**, v. 17, n. 2, p. 132-139, 1993.

RODRIGUEZ-KABANA, R.; GODOY, G.; MORGAN-JONES, G.; SHELBY, R. The Determination of Soil Chitinase Activity: Conditions for Assay and Ecological Studies. **Plant and Soil**, v.75, p.95-106, 1983. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02178617>

ROSA, J. M. O.; WESTERICH, J. N.; WILCKEN, S. R. S. Reação de genótipos e híbridos de tomateiro à *Meloidogyne enterolobii*. **Ciência Rural**, v.44, n.7, p.1166-1171, 2014. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20130041>.

SALGADO, S. M. L. & CAMPOS, V. P. Eclosão e mortalidade de *Meloidogyne exigua* em extratos e em produtos naturais. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p.166-170, 2003.

SANTOS, D., MARTINS DA SILVA, P., ABRANTES, I.; MALEITA, C. Tomato Mi-1.2 gene confers resistance to *Meloidogyne luci* and *M. ethiopica*. **European Journal of Plant Pathology**, v.156, p.571–580, 2020. <https://doi.org/10.1007/s10658-019-01907-8>

SARVEN, M. S.; AMINUZZAMAN, F. M.; HUQ, M. E. Dose-response relations between *Purpureocillium lilacinum* PLSAU-1 and *Meloidogyne incognita* infecting brinjal plant on plant growth and nematode management: a greenhouse study. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v.29, n.26, 2019. <https://doi.org/10.1186/s41938-019-0128-6>

SATOU, T.; KANEKO, K.; LI, W.; KOIKE, K. The toxin produced by *Pleurotus ostreatus* reduces the head size of nematodes. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, p.574–576, 2008. <https://doi.org/10.1248/bpb.31.574>

SEGERS, R.; BUTT, T. M.; KERRY, B. R.; PEBERDY, J. F. The nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium* produces a chymoelastase-like protease which hydrolyses host nematode proteins in situ. **Microbiology**, v.140, p.2715–2723, 1994.

SHARON, E.; BAR-EYAL, M.; CHET, I. HERRERA-ESTRELLA, A. A.; KLEIFELD, O.; SPIEGEL, Y. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. **Phytopathology**, v.91, n.7, p.687-693, 2001. <https://doi.org/10.1094/phyto.2001.91.7.687>.

SILVA, R. V.; LIMA, B. V.; PEIXOTO, F. R.; GONDIM, J. P. E.; MIRANDA, B. E. C. Supplanting resistance of the *Mi* gene by root-knot nematode in industrial tomato in the Cerrado

in Goiás State of Brazil. **Ciência Rural**, v. 49, n. 9, 2019. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20180784>

SOARES, F. E. D. F.; BRAGA, F.R.; ARAÚJO, J. V.; LIMA, W. S.; MOZER, L. R.; QUEIRÓZ, J.H. *In vitro* activity of a serine protease from *Monacrosporium thaumasium* fungus against first-stage larvae of *Angiostrongylus vasorum*. **Parasitology Research**, v.110, p. 2423–2427, 2012. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2781-x>

SOARES, F. E. D. F.; BRAGA, F. R.; ARAÚJO, J. V.; GENIÊR, H. L.; GOUVEIA, A. S.; QUEIROZ, J. H. Nematicidal activity of three novel extracellular proteases of the nematophagous fungus *Monacrosporium sinense*. **Parasitol Research**, v.112, p.1557–1565, 2013. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3304-8>.

SOARES, F. E. F.; QUEIRÓZ, J. H.; BRAGA, F. R.; TAVELA, A. O.; ARAÚJO, J. M.; FONSECA, L. A.; GOUVEIA, A. S.; ARAÚJO, J. V. Action of the nematophagous fungus *soares* on *Diectophyma renale* eggs, *Biocontrol Science and Technology*, v. 24, n. 4, p.399-406, 2014. <https://doi.org/10.1080/09583157.2013.863828>

SOARES, F. E. D. F.; QUEIROZ, J. H. D.; ARAÚJO, J. V. D.; RODRIGUES, M. G. R.; TAVELA, A. DE O.; AGUIAR, A. R.; LACERDA, T.; FERRAZ, C. M.; RANGEL, M. C. V.; SENNA, T.; ARAÚJO, A. L., REGO, T. D. P.; SENA, C. C.; BRAGA, F. R. Action of proteases of the nematophagous fungi *Pochonia chlamydosporia* on *Ascaris suum* eggs of collared peccary (*Pecari tajacu*). **African Journal of Microbiology Research**, v.9, n.31, p.1883-1886, 2015. <https://doi.org/10.5897/AJMR2015.7650>

SOARES, F. E. D.F.; SUFIATE, B. L.; QUEIROZ, J. H. D. Nematophagous fungi: far beyond the endoparasite, predator, and ovicidal groups. **Agriculture and Natural Resources**, v. 52, p.1–8, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.anres.2018.05.010>

SOARES, F. E. D. F.; NAKAJIMA, V. M.; SUFIATE, B. L.; SATIRO, L. A. S.; GOMES, E. H.; FRÓES, F. V.; SENA, F. P.; BRAGA, F. R.; QUEIROZ, J. H. Proteolytic and nematicidal potential of the compost colonized by *Hypsizygus marmoreus*. **Experimental Parasitology**, v. 197, p. 16–19, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2018.12.006>.

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

SUAREZ, B.; REY, M.; CASTILLO, P. Isolation and characterization of PRA1, a trypsin-like protease from the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* CECT 2413 displaying nematicidal activity. **Applied Microbiol Biotechnological**, v. 65, p. 46-55, 2004. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1610-x>.

SUMANTHA, A.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Microbiology and Industrial Biotechnology of Food-Grade Proteases: A Perspective. **Food Technology and Biotechnology**, v.44, p.211–220, 2006.

SUN, M. H.; GAO, L.; SHI, Y. X.; LI, B. J.; LIU, X. Z. Fungi and actinomycetes associated with *Meloidogyne* spp. eggs and females in China and their biocontrol potential. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 93, p. 22-28, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2006.03.006>.

TAMBI, M. D. Relevance of micro financial institution credit in tomato production and Livelihood IN Santa, Cameroon. **Journal of Business Management & Accounts Studies**, v. 1, n.2, p.15-23, 2018.

TUNLID, A.; ROSEN, S. E. K. B.; RASK, L. Purification and characterization of an extracellular serine protease from the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. **Microbiology**, v.140, v.1687–1695, 1994. <https://doi.org/10.1099/13500872-140-7-1687>.

TZORTZAKAKIS, E. A., CONCEIÇÃO, I., DIAS, A. M.; SIMOGLU, K. B; ABRANTES, I. Occurrence of a new resistant breaking pathotype of *Meloidogyne incognita* on tomato in Greece. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v.121, p.184–186, 2014. <https://doi.org/10.1007/BF03356508>.

URWIN, P. E.; TROTH, K. M.; ZUBKO, E. I.; ATKINSON, H. J. Effective transgenic resistance to *Globodera pallida* in potato field trials. **Molecular Breeding**, v.8, n.1, p.693 95-101, 2001. <https://doi.org/10.1023/A:1011942003994>

VEENHUIS, M.; NORDBRING-HERTZ, B.; HARDER, W. An electron-microscopic analysis of capture and initial-stages of penetration of nematodes by *Arthrobotrys oligospora*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v.51, p.385-398, 1985. <https://doi.org/10.1007/BF02275043>

VIAENE, N. M.; G. S. ABAWI. *Hirsutella rhossiliensis* and *Verticillium chlamydosporium* as biocontrol agents of the root-knot nematode *Meloidogyne hapla* on lettuce. **Journal of Nematology**, v. 32, n. 1, p.85-100, 2000.

WAN, J.; DAI, Z.; ZHANG, K.; LI, G.; ZHAO, P. Pathogenicity and Metabolites of Endoparasitic Nematophagous Fungus *Drechmeria coniospora* YMF1.01759 against Nematodes. **Microorganisms**, v. 9, 1735p., 2021. <https://doi.org/10.3390/microorganism s9081735>

WANG, R. B.; YANG, J. K.; LIN, C.; ZHANG, Y.; ZHANG, K. Q. Purification and characterization of an extracellular serine protease from the nematode-trapping fungus *Dactylella shizishanna*. **Letters in Applied Microbiology**, v.42, p. 589-594, 2006. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765x.2006.01908.x>.

WANG, B.; WU, W. P.; LIU, X. Z. Purification and characterization of a neutral serine protease with nematocidal activity from *Hirsutella rhossiliensis*. **Mycopathologia**, v.163, p.169–176, 2007. <https://doi.org/10.1007/s11046-007-0100-y>.

WANG, B.; LIU, X.; WU, W. P.; LIU, X.; LI, S. Purification, characterization, and gene cloning of an alkaline serine protease from a highly virulent strain of the nematode-endoparasitic fungus *Hirsutella rhossiliensis*. **Microbiology Research**, v.164, p.665–673, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2009.01.003>.

WARD, E.; KERRY, B. R.; MANZANILLA-LÓPEZ, R. H.; MUTUA, G.; DEVONSHIRE, J.; KIMENJU, J.; HIRSCH, P. R. The *Pochonia chlamydosporia* serine protease gene vcp1 is subject to regulation by carbon, nitrogen and pH: implications for nematode biocontrol. **PloS one**, v.7, n.4, e35657, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035657>

YANG, J.; HUANG, X.; TIAN, B.; WANG, M.; NIU, Q.; ZHANG, K. Isolation and Characterization of a Serine Protease from the Nematophagous Fungus, *Lecanicillium psalliotae*, Displaying Nematicidal Activity. **Biotechnology Letters**, v.27, p.1123–1128, 2005. <https://doi.org/10.1007/s10529-005-8461-0>

YANG, J. K.; LI, J.; LIANG, L. M.; TIAN, B. Y.; ZHANG, Y.; CHEN, C. M.; ZHANG, K. Q. Cloning and characterization of an extracellular serine protease from the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys conoides*. **Archive Microbiology**, v.188, p.167–174, 2007. <https://doi.org/10.1007/s00203-007-0233-x>.

ZARE, R.; GAMS, W.; EVANS, H. C. A revision of *Verticillium* section Prostrata. V. The genus *Pochonia*, with notes on *Rotiferophthora*. **Nova Hedwig**, v. 73, p.51-86, 2001.

ZHAO, M. L.; MO, M. H.; ZHANG, K. Q. Characterization of a neutral serine protease and its full-length cDNA from the nematode trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. **Mycologia**, v.96, p.16–22, 2004. <https://doi.org/10.1080/15572536.2005.11832991>.

9. ANEXOS



Figura 10. Experimento *in vivo* de *Meloidogyne javanica* em contato com diferentes concentrações dos extratos brutos enzimáticos de meio sólido de *Pochonia chlamydosporia* com quitina (0, 0,5, 1, 4%) via aplicação líquida (2 mL) no solo de mudas de tomateiro (29 dias) em bandejas.

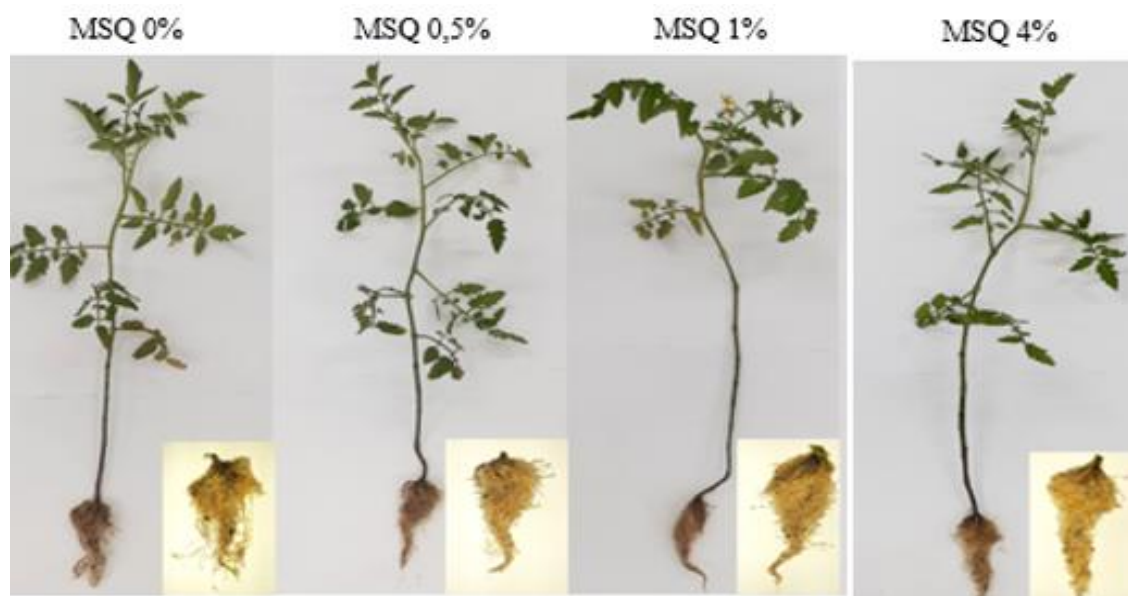


Figura 11. Experimento *in vivo* 01 de *Meloidogyne javanica* com interação a diferentes concentrações de extrato bruto enzimático de macerado sólido de *Pochonia chlamydosporia* com quitina (0, 0,5, 1, 4%) em tomateiro.

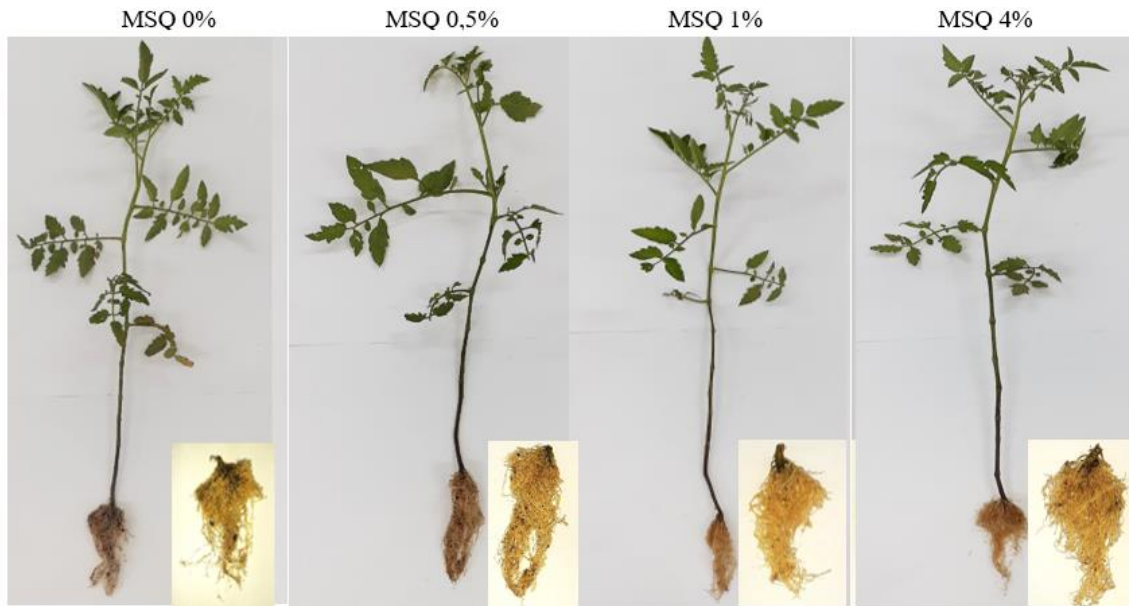


Figura 12. Experimento *in vivo* 02 de *Meloidogyne javanica* com interação a diferentes concentrações de extrato bruto enzimático de meio sólido de *Pochonia chlamydsporia* com quitina (0, 0,5, 1, 4%) em tomateiro.

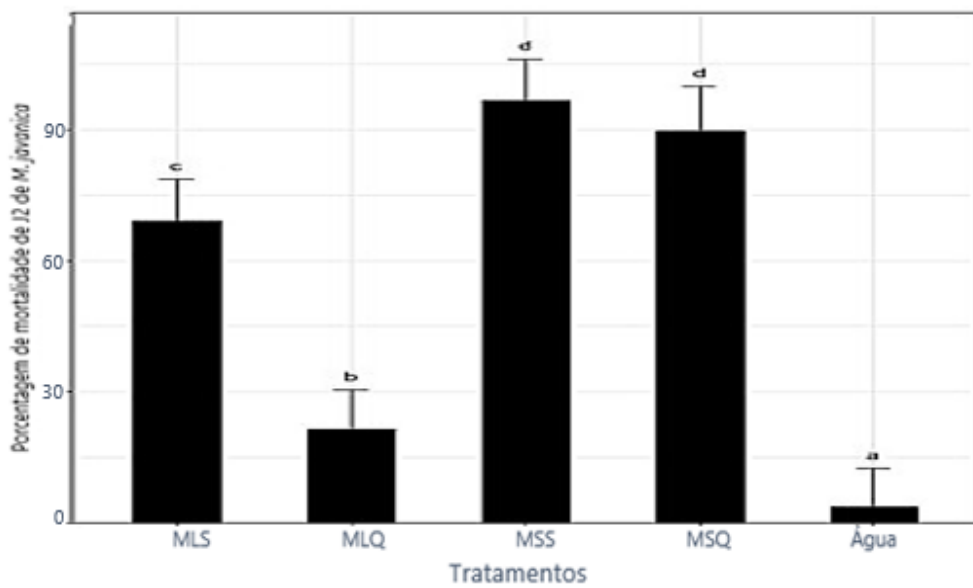


Figura 13. Repetição do experimento: Porcentagem de mortalidade de J2 de *Meloidogyne javanica* em contato com os extratos brutos enzimáticos de macerado sólido e líquido com e sem quitina de *Pochonia chlamydsporia* em solução aquosa (2%).

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si em nível de 5% de significância pelo teste de Scott-knott.