

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

RAIANE PEREIRA SCHWENGBER

Pochonia chlamydosporia: potencial no controle de *Meloidogyne javanica* em soja

MARINGÁ

2020

RAIANE PEREIRA SCHWENGBER

Pochonia chlamydosporia: potencial no controle de *Meloidogyne javanica* em soja

Dissertação apresentada ao programa de Pós- Graduação em Agronomia do Departamento de Agronomia, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Agronomia Área de Concentração: Proteção de Plantas. Orientador: Prof^a. Dr^a. Cláudia Regina Dias Arieira

MARINGÁ

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

S414p Schwengber, Raiane Pereira
Pochonia chlamydosporia : potencial no controle de *Meloidogyne javanica* em soja / Raiane Pereira Schwengber. -- Maringá, 2020.
viii, 64 f.: il., tabs.

Orientadora: Profa. Dra. Claudia Regina Dias Arieira.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Agronomia, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2020.

1. Soja - Controle biológico - *Pochonia chlamydosporia*. 2. Soja - *Meloidogyne javanica*. 3. Nematóide - Soja. I. Arieira, Claudia Regina Dias, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Agrárias. Departamento de Agronomia. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. III. Título.

CDD 23.ed. 633.34

FOLHA DE APROVAÇÃO

RAIANE PEREIRA SCHWENGBER

Pochonia chlamydosporia: potencial no controle de *Meloidogyne javanica* em soja

Defesa da dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia do Departamento de Agronomia, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Agronomia.

COMISSÃO JULGADORA

Prof. Dra. Claudia Regina Dias Arieira
Universidade Estadual de Maringá

Dra. Lais Fernanda Fontana
Universidade Estadual de Maringá

Dra. Andressa Cristina Zamboni Machado
IAPAR

Data: 20/02/2020 às 13:30

Local de defesa: Sala 16 – Térreo do Bloco J45 – Universidade Estadual de Maringá

DEDICATÓRIA

A Deus, por ser essencial em minha vida, autor do meu destino, meu guia.

Aos meus pais, pelo incentivo a educação, e pelo apoio incondicionalmente em todos esses anos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela vida, saúde, por ter me dado forças para enfrentar todas as dificuldades e oportunidades de crescimento.

A minha família, meu pai Anísio, minha mãe Mafalda, minha irmã Bárbara.

A minha orientadora, Prof. Dra. Cláudia Regina Dias Arieira, pela oportunidade, pelos ensinamentos e paciência ao longo dessa caminhada, mais do que isso fui privilegiada de aprender com sua postura profissional, valores éticos e morais.

Aos professores e funcionários da pós-graduação de Maringá e Umuarama, por serem sempre prestativos.

A pós doutoranda, Simone de Melo Santana Gomes por ser minha ex orientadora de projetos de iniciação científica e de trabalho de conclusão de curso, pelo enorme incentivo ao mestrado de nematologia, pelos conselhos, dedicação, carinho, paciência e por tudo que me ensinou e ajudou ao longo de todos os anos.

Aos colegas do laboratório de Fitopatologia e Nematologia da UEM – Umuarama, Adão Izidoro Junior, Angélica Melo, Guilherme Tarini, Carol Futigami, Beatriz Almeida, Simone Santana Gomes, Bruna Orlandini, Laís Fontana, Enio Amado e Jaqueline Bordin. Que me acolheram, por toda a ajuda, apoio, amizade, companheirismo e diversão. Como também agradeço aos colegas do laboratório de nematologia de Maringá.

Aos membros da banca, Dra. Lais Fernanda Fontana e Dra. Andressa Cristina Zamboni Machado, por aceitarem a fazer parte desse momento importante e pelas contribuições.

Ao laboratório de Solos da UEM de Maringá, em especial ao Prof. Dr. Marcelo Batista por me receber em seu laboratório e pelo seu técnico, Roberto Carlos, por toda a ajuda no desenvolvimento de parte do trabalho apresentado.

À Universidade Estadual de Maringá e de Umuarama, ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, por me aceitar a cursar o mestrado e utilizar de suas instalações para o desenvolvimento da pesquisa.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pela concessão da bolsa.

“Temos o destino que merecemos. O
nosso destino está de acordo com os
nossos méritos.” (Albert Einstein)

RESUMO GERAL

A cultura da soja é fundamental para a economia agrícola do Brasil, correspondendo a cerca de 15% do valor bruto da produção nacional. Entretanto, a sojicultura é ameaçada por prejuízos causados pelo *Meloidogyne javanica*. O manejo desse nematoide exige estratégias que não sejam prejudiciais ao meio ambiente e a saúde humana. Assim, o controle biológico com o uso do fungo nematófago *Pochonia chlamydosporia* (*Pc*) é uma alternativa atrativa, pois o fungo tem potencial de induzir a resistência em plantas e reduzir a população dos nematoides. Com base no exposto, o presente trabalho avaliou o efeito de *P. chlamydosporia* (Rizotec[®], Stoller) na penetração e reprodução de *M. javanica* (*Mj*), absorção de nutrientes pela planta e o potencial indutor de resistência em soja. O experimento de penetração foi realizado casa-de-vegetação e os tratamentos foram a aplicação ou não de *Pc* no sulco de semeadura, sendo as plantas inoculadas com 2000 ovos + juvenis de segundo estágio (J2) após emergência. As avaliações foram realizadas aos 10, 15, 20 e 25 dias após a inoculação. O teste de reprodução foi com os tratamentos *Pc*, *Pc+Mj*, *Mj* e testemunha. A *Pc* e os *Mj* foram aplicados na semeadura e a reprodução de *Mj* avaliada 60 dias após a inoculação. O experimento de indução foi semelhante ao de reprodução, entretanto, as avaliações foram realizadas aos 5, 8, 12 e 15 dias após a inoculação do *Mj*, avaliando-se as enzimas fenilalanina amônia-liase (PAL), peroxidase (POX) polifenoloxidase (PPO) e catalase (CAT). O experimento de nutrição e da atividade respiratória do solo foi semelhante ao de reprodução e avaliou-se macronutrientes (fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg) e nitrogênio (N)), micronutrientes (zinco (Zn), cobre (Cu), ferro (Fe) e manganês (Mn)), respiração basal do solo (RBS), carbono da biomassa microbiana (CBM), quociente metabólico do solo (QCO₂). O fungo *P. chlamydosporia* reduziu a penetração inicial de juvenis de segundo estágio de *M. javanica* nas raízes de soja e a formação de juvenis de terceiro estágio. O fungo, aplicado isoladamente, aumentou os níveis das enzimas POX, PPO, PAL e CAT na parte aérea das plantas e da PPO e da CAT nas raízes. Observou-se que o tratamento com *Pc* reduziu a reprodução de *Mj* em 40,3% e promoveu aumento na altura de planta quando associado ao nematoide. *P. chlamydosporia* promoveu maior absorção de fósforo e potássio, enquanto o teor de zinco foi superior no tratamento com o nematoide. Maior respiração basal do solo foi observada para o tratamento com *Pc*, e o carbono da biomassa microbiana foi superior no tratamento *Mj* seguido de *Pc*. A interação entre os organismos promoveu aumento no quociente metabólico do solo.

Palavras-chave: Controle alternativo. Indução de Resistência. Nematoide das galhas.

ABSTRACT OVERVIEW

The cultivation of soy is fundamental for the agricultural economy of Brazil, corresponding to about 15% of the gross value of national production. However, soybean production is threatened by losses caused by *Meloidogyne javanica*. The management of this nematode requires strategies that are not harmful to the environment and human health. Thus, biological control with the use of the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* (*Pc*) is an attractive alternative, as the fungus has the potential to induce resistance in plants and reduce the population of nematodes. Based on the above, the present study evaluated the effect of *P. chlamydosporia* (Rizotec®, Stoller) on the penetration and reproduction of *M. javanica* (*Mj*), nutrient absorption by the plant and the potential inducer of resistance in soybean. The penetration experiment was carried out in a greenhouse and the treatments were the application or not of *Pc* in the sowing furrow, and the plants were inoculated with 2000 eggs + juveniles of the second stage (J2) after emergence. Evaluations were performed at 10, 15, 20 and 25 days after inoculation. The reproduction test was with the treatments *Pc*, *Pc* + *Mj*, *Mj*, and control. *Pc* and *Mj* were applied at sowing and *Mj* reproduction evaluated 60 days after inoculation. The induction experiment was similar to the reproduction experiment, however, the evaluations were performed at 5, 8, 12 and 15 after the inoculation of *Mj*, evaluating the enzymes phenylalanine ammonia lyase (PAL), peroxidase (POX) polyphenoloxidase (PPO) and catalase (CAT). The experiment of soil nutrition and respiratory activity was similar to that of reproduction and it was evaluated macronutrients (phosphorus (P), potassium (K), calcium (Ca), magnesium (Mg) and nitrogen (N)), micronutrients (zinc (Zn), copper (Cu), iron (Fe) and manganese (Mn)), basal soil respiration (RBS), microbial biomass carbon (CBM), soil metabolic quotient (QCO₂). The fungus *P. chlamydosporia* reduced the initial penetration of juveniles of the second stage of *M. javanica* in soybean roots and the formation of juveniles of the third stage. The fungus applied alone, increased the levels of the enzymes POX, PPO, PAL, and CAT in the aerial part of the plants and PPO and CAT in the roots. It was observed that the treatment with *Pc* reduced the reproduction of *Mj* by 40.3% and promoted an increase in plant height when associated with the nematode. *P. chlamydosporia* promoted greater absorption of phosphorus and potassium, while the zinc content was higher in the treatment with the nematode. Greater basal soil respiration was observed for the treatment with *Pc*, and the carbon of the microbial biomass was higher in the treatment *Mj*, followed by *Pc*. The interaction

between the organisms promoted an increase in the soil metabolic quotient. Keywords: Alternative control. Resistance induction. Nematode of Galls.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Estádios de *Meloidogyne javanica* em raízes de plantas de soja cv. M6410 IPRO tratadas ou não (testemunha) com *Pochonia chlamydosporia* (*Pc*)33

Tabela 2. Parâmetros vegetativos de plantas de soja cv. M6410 IPRO, avaliados dias após a inoculação de *Meloidogyne javanica* em raízes tratadas ou não com *Pochonia chlamydosporia*34

Tabela 3. Atividade enzimática na parte aérea de plantas de soja, parasitadas por *Meloidogyne javanica* e tratadas com *Pochonia chlamydosporia*35

Tabela 4. Atividade enzimática das raízes de plantas de soja, parasitadas por *Meloidogyne javanica* e tratadas com *Pochonia chlamydosporia*37

CAPÍTULO II

Tabela 1 - População de *Meloidogyne javanica* em plantas de soja cv. M6410 IPRO tratadas ou não com *Pochonia chlamydosporia*54

Tabela 2 - Altura, massa fresca (MFPA) e seca (MSPA) de parte aérea, massa fresca de raiz (MF raiz) e comprimento de raiz (Comp. raiz) de soja M6410 IPRO parasitadas ou não por *Meloidogyne javanica* e tratadas ou não com *Pochonia chlamydosporia*54

Tabela 3 - Atividade respiratória do solo cultivado com plantas de soja cv. M6410 IPRO, parasitadas por *Meloidogyne javanica* e tratadas ou não com *Pochonia chlamydosporia*.....55

Tabela 4 - Macro e micronutrientes em parte aérea de plantas de soja cv. M6410 IPRO, parasitadas ou não por *Meloidogyne javanica* e tratadas ou não com *Pochonia chlamydosporia*.....56

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
A cultura da soja	3
Os nematoides na cultura da soja	4
O gênero <i>Meloidogyne</i> e a espécie <i>Meloidogyne javanica</i>	4
Controle de nematoides na soja	7
Controle biológico de nematoides	9
O fungo nematófago <i>Pochonia chlamydosporia</i>	10
REFERÊNCIAS	12
CAPÍTULO I : <i>Pochonia chlamydosporia</i> induz resistência em soja contra <i>Meloidogyne javanica</i>?	26
Resumo	Erro! Indicador não definido.
Abstract.....	27
Introdução	Erro! Indicador não definido.
Material e métodos	Erro! Indicador não definido.
Resultados.....	Erro! Indicador não definido.
Discussão	37
Referências	40
CAPÍTULO II: <i>Pochonia chlamydosporia</i> na atividade microbiana do solo e acúmulo de macro e micronutrientes em soja parasitada por <i>Meloidogyne javanica</i>.....	46
Resumo	46
Abstract.....	47
Introdução	48
Material e Métodos	49
Resultados.....	53
Discussão	56
References	59
CONCLUSÕES GERAIS	64

INTRODUÇÃO GERAL

Os nematoides são animais aquáticos que habitam desde oceanos até a fração líquida do solo (Neher; Powers, 2005). Apresentam os mais diversos hábitos alimentares (Yeates et al., 1993; Ferris, 2010), que envolvem o parasitismo de outros animais (Braga; De Araújo, 2014; Vieira et al., 2019), o parasitismo de plantas (Barker; Koenning, 1998; Dias et al., 2010), o consumo de fungos (Kanzaki; Ekino; Giblin-Davis, 2019), bactérias (Bonkowski; Villenave; Griffiths, 2009; Zhang; Holdorf; Walhout, 2017) e o hábito predatório de diversos microrganismos aquáticos móveis (Khan; Kim, 2005, 2007; Bilgrami, 2008). Entretanto, os nematoides parasitas de plantas são os que despertam maior interesse dos humanos, pois causam diversas perdas econômicas.

Os nematoides fitoparasitas são constante preocupação para a agricultura. O valor bruto da produção agrícola mundial é estimada em cerca de US\$ 5,5 trilhões anuais (FAO, 2019a) e os nematoides possuem potencial de causar prejuízos que variam de US\$ 157 bilhões (Abad et al., 2008; Hassan et al., 2013; Singh; Singh; Singh, 2015) a US\$ 358 bilhões anuais (López Gómez et al., 2014). Tais organismos podem parasitar as mais diferentes plantas, sendo os maiores prejuízos registrados para culturas cultivadas em grandes áreas, como a soja, que ocupa a 4º maior área cultivada do mundo, aproximadamente 123,6 milhões de hectares (FAO, 2019b).

Os nematoides relatados parasitando soja em diversas partes do mundo pertencem a 50 gêneros (Dias et al., 2010). No Brasil, foram relatadas 44 gêneros de nematoides fitoparasitas, dos quais 23 espécies são confirmadas, enquanto 21 são descrições somente do gênero (Tenente et al., 2019). Dentre essas espécies, destacam-se *Heterodera glycines* Ichinohe, 1951, *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood, 1949, *Meloidogyne javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949 *Pratylenchus brachyurus* (Godfrey, 1929) Filipjev & S. Stekhoven, 1941 e *Rotylenchulus reniformis* Linford & Oliveira, 1940 como as mais importantes para a cultura da soja no Brasil (Franzener et al., 2005; Dias et al., 2010; Mattos et al., 2016; Lobo et al., 2017; Miamoto et al., 2017, 2018; Mazzetti et al., 2019). Destas, *M. javanica* é a mais frequente (Franzener et al., 2005; Dias et al., 2010; Mattos et al., 2016; Mazzetti et al., 2019).

Na tentativa de reduzir os prejuízos gerados pelo parasitismo dos nematoides nas plantas e visando o manejo sustentável, o controle biológico vem sendo difundido, com número crescente de produtos disponíveis no mercado. A ação dos agentes de controle biológico pode dar-se de forma direta ou indireta sobre os nematoides (Kerry, 2000). Os fungos nematófagos

agem predando e/ou parasitando diversas fases do ciclo de vida dos nematoides, além de produzirem substâncias que favorecem o desenvolvimento das plantas e inibem outros microrganismos patogênicos.

Pochonia chlamydosporia é a espécie de fungo nematófago mais estudada para o controle de nematoides (Hahn et al., 2018). Esse fungo parasita os estágios imóveis de vários nematoides de importância agrícola (Moosavi et al., 2010) e pecuária (Braga; De Araújo, 2014; Vieira et al., 2019). Na ausência dos nematoides, pode sobreviver na matéria orgânica no solo (Dallemele-Giaretta et al., 2012; Santos et al., 2014) ou no trato digestivo de animais (Araujo et al., 2012). Além disso, em condições adversas, pode sobreviver na forma de estruturas de resistência denominadas clamidósporos (Fernandes et al., 2017). O fungo caracteriza-se ainda pelo hábito endofítico no tecido vegetal, promovendo o crescimento das plantas (Dallemele-Giaretta et al., 2015; Zavala-Gonzalez et al., 2015) e induzindo resistência a microrganismos patogênicos (Manzanilla-López et al., 2013).

Relatos indicam o potencial de *P. chlamydosporia* em reduzir a população dos nematoides (Dias-Arieira et al., 2011; Bontempo et al., 2014) de maneira semelhante ao controle químico (Medina-Canales et al., 2019).

Apesar das pesquisas já conduzidas, há algumas questões a serem, incluindo o real papel na indução de resistência e na absorção de nutrientes, bem como a relação entre tais fatores e o controle efetivo dos nematoides.

Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a ação de *P. chlamydosporia*, aplicado no sulco de semeadura na cultura da soja no controle de *M. javanica*. Especificamente, objetivou-se analisar a penetração, o desenvolvimento e a reprodução do nematoide no sistema radicular de soja, analisar o efeito da aplicação na absorção de nutrientes e na atividade das enzimas de defesa peroxidase, polifenoloxidase, fenilalanina amônia-liase e catalase em parte aérea e sistema radicular de soja e analisar a atividade respiratória do solo.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A cultura da soja

A soja moderna (*Glycine max* (L.) Merr.) é uma planta herbácea da família Fabaceae (GBIF Secretariat, 2019) e acredita-se que é originária da soja selvagem (*Glycine soja* Sieb. & Zucc.) nativa da Ásia oriental, cujo processo de domesticação surgiu há cerca de 9000 a 6000 anos atrás na bacia do rio Huanghe (Li et al., 2010; Lee et al., 2011; Kim et al., 2012; Sedivy; Wu; Hanzawa, 2017). A planta produz um fruto denominado vagem com grãos em seu interior. Na dinastia Zhou (cerca de 2500 anos atrás), os grãos de soja assumiram papel importante na agricultura e na alimentação humana (Jin et al., 2012; Sedivy; Wu; Hanzawa, 2017).

No início do século XX, a soja era conhecida na Europa somente como uma planta comum, sem potencial econômico. Somente entre 1908 e 1909, com a escassez de alimentos devido à Primeira Guerra Mundial, a soja passou a ter um valor econômico reconhecido (Prodöhl, 2010). Essa valorização da soja tornou a região da Manchúria na China a principal produtora do grão, atraindo imigrantes de diversos países (Kung; Li, 2011). Entretanto, com a valorização do grão, o cultivo já havia se espalhado por diversos países, sendo a América Latina o principal foco da expansão, pois as terras eram mais baratas, especialmente no Brasil (Fearnside, 2001).

A soja foi introduzida no Brasil em 1882, quando as cultivares americanas foram testadas em Salvador na Bahia, na intenção de avaliar o potencial produtivo da soja em regiões tropicais. Entretanto, as plantas apresentaram baixo rendimento devido à baixa adaptabilidade dos cultivares ao ambiente tropical (Cattelan; Dall’Agnol, 2018). Somente em 1908, com a chegada dos imigrantes japoneses no Rio Grande do Sul, que a soja passou a ser cultivada para o consumo humano. Posteriormente, durante o processo de colonização do estado do Paraná na década de 40, a soja começou a ser cultivada comercialmente (Oliveira, 2015). Em 1980 iniciou o cultivo no centro-oeste e, em 1990, já avançava no centro norte do país (Fearnside, 2001; Cattelan; Dall’Agnol, 2018). Após o início dos anos 2000, também houve expansão para a Amazônia (Barona et al., 2010).

Atualmente, esta leguminosa é a principal fonte de proteína para a alimentação animal, além de ser um componente básico da alimentação humana (Hartman; West; Herman, 2011; Kim et al., 2012; Sedivy; Wu; Hanzawa, 2017). Em 2019, a cultura da soja ocupou 125,6 milhões de hectares de área cultivável no mundo, onde foram produzidos 362,0 milhões de

toneladas de grãos. O Brasil é o país com a segunda maior área cultivada, aproximadamente 33,9 milhões de hectares, produzindo 114,6 milhões de toneladas de grãos, com valor bruto de produção estimado em US\$ 33,1 bilhões de dólares, correspondente a 15% do valor bruto da produção agrícola brasileira (FAO, 2019b).

A importância econômica da soja para a economia brasileira é considerável e, deste modo, é necessária atenção para os fatores limitantes para a produção de soja (Godoy; Bueno; Gazziero, 2015). Dentre os fatores limitantes da produção da soja, citam-se os nematoides (Dias et al., 2010; Lima et al., 2017).

Os nematoides na cultura da soja

Os principais nematoides parasitas de soja no Brasil são as espécies *Heterodera glycines* (nematóide de cisto da soja), *Meloidogyne incognita* e *M. javanica* (nematoides das galhas), *Pratylenchus brachyurus* (nematóide das lesões radiculares) e *Rotylenchulus reniformis* (nematóide reniforme) (Franzener et al., 2005; Dias et al., 2010; Mattos et al., 2016; Lobo et al., 2017; Miamoto et al., 2017, 2018; Mazzetti et al., 2019). Juntos, estes nematoides causam perdas na produção agrícola mundial estimadas em US\$ 100 bilhões de dólares anuais (Ralmi, 2016). Dentre essas espécies, *M. javanica* tem sido citada como a mais frequente (Franzener et al., 2005; Dias et al., 2010; Mattos et al., 2016; Mazzetti et al., 2019).

No campo, a distribuição espacial dos nematoides ocorre de forma agregada formando reboleiras (Wu et al., 2011; De Brida et al., 2016; Freitas et al., 2017; Franchini et al., 2018; Poromarto; Del Río Mendoza; Nelson, 2019). Quando as reboleiras são formadas por *Meloidogyne* sp., as raízes das plantas apresentam galhas. As galhas reduzem a absorção de água e nutrientes e, conseqüentemente, reduzem seu crescimento e produção, gerando perdas consideráveis. Assim, os nematoides desse gênero constituem um dos mais importantes nematoides de importância econômica para a agricultura, principalmente nas regiões tropicais (Sikora et al., 2018).

O gênero *Meloidogyne* e a espécie *Meloidogyne javanica*

O gênero *Meloidogyne* contém 97 espécies relatadas (Hunter; Handoo, 2009) e esse número elevado de espécies é equivalente ao grande número de hospedeiros parasitados pelos

nematoides desse gênero, estimado em 5500 espécies vegetais (Trudgill; Blok, 2001; Blok et al., 2008).

Os problemas causados pelos nematoides do gênero *Meloidogyne* estão associados aos hospedeiros de interesse econômico, visto que a maior parte das grandes culturas é parasitada por *Meloidogyne spp.* (Charchar et al., 2009). Os problemas são agravados nas regiões tropicais (Fourie et al., 2013; Sikora et al., 2018), onde os nematoides são favorecidos pela temperatura e atingem altas populações que podem inviabilizar a produção.

No Brasil, as espécies *M. javanica* e *M. incognita* são as mais importantes para a agricultura (Charchar et al., 2009), sendo *M. javanica* considerada a mais agressiva para a cultura da soja (Mattos et al., 2016; Mazzetti et al., 2019). Esta espécie foi relatada pela primeira vez no Brasil parasitando plantas de *Tropaeolum majus* L., conhecida popularmente como capuchinha (Cesnik, 1957). Em soja, *M. javanica* foi relatado inicialmente em lavouras no Ceará, em 1968 (Ponte, 1968).

Os danos causados por *M. javanica* são agravados quando as condições ambientais favorecem o desenvolvimento dos nematoides. O ciclo de vida de ovo a ovo para *M. javanica* é de aproximadamente 29 dias em temperaturas médias de 25 °C, com temperatura ótima variando de 25 a 30 °C (Trudgill, 1995). Temperaturas inferiores a 11,4 °C paralisam a atividade do nematoide (Campos; Campos; Pozza, 2008; Giné et al., 2014). Por outro lado, em altas temperaturas, a viabilidade dos ovos é reduzida drasticamente (Madulu; Trudgill, 1994).

Os ovos de *M. javanica* tendem a permanecer envoltos em uma matriz gelatinosa secretada pela fêmea (Caillaud et al., 2008). Os processos embriogênicos ocorrem fora do corpo da fêmea, nessa matriz gelatinosa (Caillaud et al., 2008; Favery et al., 2016). O desenvolvimento dos ovos se inicia na fase pluricelular, avançando para a especialização das células, compondo a gastrulação e, posteriormente, a formação do J1 (Campos et al., 2008). O J1, ainda no interior do ovo, sofre a primeira ecdise e, desta forma, do ovo emerge o juvenil de segundo estágio (J2) (Calderón-Urrea et al., 2016).

Após eclodir, o J2 migra pelo solo em busca de raízes de plantas hospedeiras. Ao encontrar uma raiz, penetra a epiderme radicular e migra pelos espaços intercelulares até o cilindro vascular, onde insere o estilete em um célula (Caillaud et al., 2008). A alimentação induz a formação do sítio de alimentação e o consumo do conteúdo celular das células fornecerá os nutrientes necessários para seu desenvolvimento. Após iniciar a alimentação ocorre a 2ª ecdise, dando origem ao juvenil de terceiro estágio (J3) e, logo na sequência, ocorre a 3ª ecdise e a formação do juvenil de quarto estágio (J4). Ambos, J3 e J4, possuem o formato do corpo

salsichoide e não se alimentam. Nesses estádios, os nematoides são incapazes de se alimentar até que ocorra a 4ª ecdise, quando surgem os adultos (Caillaud et al., 2008)

Os sintomas típicos que caracterizam os nematoides desse gênero são as galhas radiculares, as quais são incitadas pelos juvenis de segundo estágio (J2) que penetram as raízes e migram para os feixes vasculares, onde usam o estilete para perfurar e selecionar algumas células que comporão o sítio de alimentação (Jones; Goto, 2011; Teillet et al., 2013; Escobar et al., 2015; López-Gómez; Verdejo-Lucas, 2017). Durante a alimentação, a glândula esofagiana dorsal secreta enzimas para degradar a parede celular e alterar o metabolismo da planta (Davis; Hussey; Baum, 2004; Escobar et al., 2015). Tais substâncias induzem a hiperplasia e a hipertrofia das células. Assim, o processo de divisão celular é suspenso, fazendo com que a célula aumente de tamanho e acomode inúmeros núcleos e organelas, principalmente ribossomos (Caillaud et al., 2008; Hofmann et al., 2010; Favery et al., 2016). O sítio de alimentação é composto por três a sete células que circundam a região cefálica do nematoide (Caillaud et al., 2008). Os plasmodesmas assumem a função de canalizar os nutrientes das células vizinhas para as células alimentadoras (Hofmann et al., 2010)

As galhas podem ser observadas cerca de três dias após a penetração do J2 (Escobar et al., 2015). Em altas populações de *Meloidogyne* spp., é possível observar abundância de galhas no sistema radicular que, conseqüentemente, afeta a absorção de água e nutrientes (Grundler; Hofmann, 2011). No dossel das plantas de soja, observam-se os sintomas reflexos, incluindo redução do crescimento das plantas (Dias et al., 2010), sintomas de deficiência de nitrogênio (López Gómez et al., 2014) e abortamento da floração e vagens que, diretamente, resulta na redução da produção (Dias et al., 2010).

As espécies de *Meloidogyne* apresentam dimorfismo sexual, ou seja, as fêmeas possuem formato corporal diferente dos machos. Elas possuem o corpo com formato periforme, o que torna a fêmea sedentária e incapaz de migrar. Os machos geralmente estão ausentes nas populações de *M. javanica* e, quando presentes, não se alimentam (Dinh; Knoblauch; Elling, 2014; Ntalli et al., 2016).

A fecundidade das fêmeas é dependente do hospedeiro, sendo que *M. javanica* tem potencial de produzir até 2000 ovos (Tzortzakakis; Trudgill, 1996; Calderón-Urrea et al., 2016). A relação entre o número de ovos inicial que compõe o inóculo inicial e o número de ovos após sucessivos ciclos reprodutivos pode ser expressada pelo fator de reprodução (Oostenbrink, 1966). Essa relação é importante para comparar a eficiência de um método de controle ou a suscetibilidade de alguma planta hospedeira.

Controle de nematoides na soja

Os nematoides, a exemplo de outros patógenos habitantes do solo, não podem ser erradicados com as tecnologias disponíveis atualmente para o controle. Nesse contexto, a única alternativa para o produtor de soja é conviver com o nematoide em populações baixas, para que a cultura não seja afetada negativamente. Entretanto, os nematoides possuem grande fecundidade com curtos períodos de geração (Trudgill; Blok, 2001), assim, a demanda por estratégias de controle é constante. Tais estratégias para a redução das populações de nematoides baseiam-se no manejo integrado, no qual estão incluídos os controles químico, genético, cultural e biológico.

O controle químico é também utilizado para o controle de nematoides na cultura da soja, sendo os demais métodos muitas vezes considerados como auxiliares (Caboni et al., 2015). Este é realizado pela aplicação de nematicidas fumigantes, tratamento de sementes ou aplicados diretamente no sulco de plantio (Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, 2019). A eficiência do controle químico é comprovada para o controle de *M. javanica* em soja (Santos, 2015; De Almeida et al., 2017). Entretanto, os métodos químicos não são econômicos a longo prazo, pois poluem o meio ambiente, podem resultar no desenvolvimento de problemas de saúde em humanos, além de levar à seleção de organismos resistentes devido ao uso frequente (Soltani et al., 2013).

O controle cultural consiste em agregar práticas de manejo visando reduzir a população inicial dos nematoides no momento da implantação das culturas agrícolas. A rotação de culturas é uma estratégia no controle de nematoides (Dias et al., 2010). Essa medida consiste em cultivar plantas não hospedeiras ou com baixo fator de reprodução dos nematoides nos intervalos de cultivo de uma planta suscetível de interesse comercial. Algumas crotalárias, quando utilizada em sistemas de rotação de culturas, atua como uma planta-isca, no qual os J2 existentes no solo penetram as raízes e iniciam a alimentação, contudo, por reação de hipersensibilidade ou outro mecanismo de resistência, o sítio de alimentação falha em nutrir o nematoide (Huang; Mota e Silva, 1980) e, por isso, apresenta baixo fator de reprodução (Miamoto et al., 2016). Além da crotalária, outras espécies são consideradas antagonistas ou más hospedeiras de *M. javanica*, incluindo *Brachiaria* sp. (= *Urochloa*) (Dias-Arieira et al., 2003), *Mucuna deeringiana*, *Cajanus cajan*, *Canavalia ensiformis*, *Macrotyloma axillare*, *Stylosanthes capitata* (Miamoto et al., 2016), *Secale cereale*, *Tagetes* spp., *Vigna unguiculata* e *Sorghum* spp. (Reddy, 2017).

Outras práticas culturais que contribuem para o controle de nematoides incluem o cultivo de plantas de cobertura e a adição de matéria orgânica ao solo (Wutke et al., 2014; Carvalho et al., 2014). As plantas utilizadas para a rotação de culturas podem fornecer a matéria orgânica necessária para favorecer o desenvolvimento de microrganismos antagonistas que inibem, parasitam ou predam os nematoides. Entretanto, a matéria orgânica pode ser oriunda de diversas fontes de origem vegetal ou animal. Os principais resíduos de origem vegetal para a redução de *M. javanica* são as palhadas de gramíneas (Dias-Arieira et al., 2003), cascas de grãos (Fabiyyi, 2018), tortas de sementes de mamona (Pedroso et al., 2019) e nim (Hussain; Mukhtar; Kayani, 2011; Rizvi et al., 2015; Kankam; Sowley, 2016) e resíduo de mandioca (Fonseca et al., 2016; Zevallos; Pereira Querol; Ambrogi, 2018). Quanto àqueles de origem animal, pode-se citar o esterco (Abolusoro et al., 2015; Amulu; Adekunle, 2015; Kankam; Sowley; Oppong, 2015) e os resíduos de abatedouros (Gomes, 2007; Osunlola; Fawole, 2015; Bakr, 2017). Os resíduos processados por microrganismos, como o substrato exaurido de cogumelos (Awd-Allah; El-Sherbiny, 2015; Elmi; Abdollahi, 2015; Hahn et al., 2019) e o soro da produção de queijos (Ntalli et al., 2019) podem ser utilizados no manejo de nematoides.

O controle genético é considerado um outro método para o manejo de patógenos radiculares, incluindo os nematoides (Seid et al., 2017). Apesar de desejável, tem como principal limitação a dificuldade na obtenção de cultivares resistentes com produtividade e adaptabilidade satisfatórias. No Brasil, há cultivares de soja resistentes a *M. javanica* (Bruinsma; Antonioli, 2015; Schmitt; Bellé, 2016; Teixeira; Barbosa; Rocha, 2017; Mazzetti et al., 2019).

Além destas estratégias, faz-se necessário o manejo correto de plantas daninhas e voluntárias, que podem manter a multiplicação do nematoide nos períodos de entressafra (Collange et al., 2011; Ramos et al., 2019). As principais plantas daninhas suscetíveis a *M. javanica* são *Amaranthus* spp., *Bidens pilosa*, *Commelina benghalensis*, *Cyperus rotundus*, *Echinochloa colonum*, *Euphorbia heterophylla*, *Ipomoea nil*, *Portulaca oleracea*, *Sida rhombifolia* e *Solanum americanum* (Bellé et al., 2019; Dias-Arieira, 2017).

Dentre as práticas empregadas para o manejo de nematoides, o controle biológico foi o que apresentou maior crescimento nos últimos anos. Após a redução do uso dos nematicidas fumigantes, como o brometo de metila (Hahn et al., 2018) e a detecção de resíduos de nematicidas não fumigantes nas águas subterrâneas dos aquíferos (Charlier et al., 2009). Esse cenário fez com que o controle biológico assumisse um papel de destaque no controle de nematoides.

Controle biológico de nematoides

Os solos apresentam uma infinidade de microrganismos que influenciam a vida do nematoide, incluindo bactérias, fungos, algas, protozoários e outros nematoides (Mukhtar; Pervaz, 2003; Lopes et al., 2007; Parnell et al., 2016), capazes de predação, parasitar ou matar os mesmos (Eapen; Beena; Ramana, 2005). A utilização do controle biológico pode consistir no favorecimento da biota nativa do solo ou na introdução de agentes de controle biológico externos (Akhtar et al., 2015; Aboutorabi, 2018).

Para o controle biológico utilizando a biota nativa, aplicam-se medidas de controle cultural, como rotação de culturas e adubação orgânica, que favorecem o desenvolvimento de microrganismos parasitas de nematoides, tais como fungos (Li et al., 2007; Liu; Xiang; Che, 2009), bactérias (Timper et al., 2016) e outros nematoides predadores (Khan; Kim, 2007). Além disso, esses microrganismos podem produzir substâncias nematicidas que atuam diretamente sobre os nematoides (Li et al., 2007; Liu; Xiang; Che, 2009; Hahn et al., 2019) e/ou podem produzir substâncias que ativam vias metabólicas nas plantas (Ghahremani et al., 2019).

Outra forma de controlar os nematoides por agentes biológicos é por meio da introdução massal (Van Lenteren et al., 2018; Köhl; Kolnaar; Ravensberg, 2019). Nesse tipo de controle biológico, a introdução massal dos agentes de controle biológico permite aumentar a população de determinado agente de forma exponencial e num intervalo pequeno de tempo, que pode ser chamado de inundação. A inundação permitirá obter controle imediato de pragas em culturas com ciclo de produção curto (controle biológico inundativo) ou para controle de pragas durante várias gerações em culturas anuais (controle biológico inoculativo sazonal) (Cock et al., 2010; Lorito et al., 2010; Parnell et al., 2016; Van Lenteren, 2012). Além disso, a introdução massal de um agente de controle biológico conhecido, permite ter previsibilidade sobre o controle promovido.

Dentre a infinidade de agentes de controle biológico de nematoides existente, alguns deles podem ser produzidos em larga escala, como as bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Pasteuria*, e os fungos *Arthrobotrys* spp., *Dactylaria* spp., *Trichoderma* spp., *Purpureocillium lilacinum* (= *Paecilomyces lilacinus*) e *Pochonia chlamydosporia*.

As bactérias podem reduzir os danos e a reprodução dos nematoides, afetando a regulação do comportamento dos nematoides (Phani et al., 2018), interferindo no reconhecimento do hospedeiro, na competição por nutrientes, na promoção do crescimento das plantas (Khanna et al., 2019; Lopes et al., 2019), na resistência sistêmica induzida (Adam;

Heuer; Hallmann, 2014; Hu et al., 2018) e na produção de exsudatos com atividade ovicida, nematicida e nematostática (Oliveira et al., 2014; Azam et al., 2018). O tratamento de sementes de soja com isolados de *Bacillus* spp. permite reduzir a formação de galhas de *M. javanica* (Chinheya; Yobo; Laing, 2017).

Os fungos nematófagos podem produzir estruturas especializadas para a predação, tais como anéis constritivos ou não, redes de hifas, vesículas espinhosas, vesículas adesivas ou tóxicas (Eapen; Beena; Ramana, 2005; Yang et al., 2007; Liu; Xiang; Che, 2009). Dentre esse grupo de fungos nematófagos, o gênero *Arthrobotrys* é um dos mais estudados no controle de *Meloidogyne* spp. (Hahn et al., 2018). A característica marcante desse gênero é a produção de rede de armadilhas adesivas formada com um conjunto de anéis (Nordbring-Hertz, 2004; Niu; Zhang, 2011). O gênero *Dactylaria*, o segundo fungo predador mais estudado, possui armadilhas compostas de anéis, mas estes não apresentam secreção adesiva e capturam os nematoides por constrição (Kumar; Singh, 2011).

Atualmente, no Brasil, os produtos comerciais mais usados para o controle de nematoides são constituídos por organismos considerados oportunistas, incluindo as espécies *P. lilacinum* e *P. chlamydosporia*, as quais são saprófitas facultativas, capazes de parasitar ovos e fêmeas sedentárias de fitonematoides (Dias-Arieira et al., 2018). Soma-se a isto o fato de que fungos nematófagos, em sua maioria, secretam substâncias com efeito nematicida, como é comumente observado para *Trichoderma* spp., cujas espécies eficientes no controle de nematoides liberam enzimas hidrolíticas extracelulares, incluindo proteases, colagenases e quitinases, que permitem a penetração na cutícula e digestão dos nematoides (Affokpon et al., 2011).

O fungo nematófago *Pochonia chlamydosporia*

A espécie *P. chlamydosporia*, anteriormente denominada *Verticillium chlamydosporium*, é um fungo de solo, que cresce por meio de um micélio espesso, inicialmente branco, cuja cor evolui para creme e ocre, formando uma crosta firme e pulverulenta. As hifas são ramificadas, septadas e hialinas e os conidióforos são verticais e ramificados, cada um com um único conídio oval e hialino. Como esporo de resistência, produz clamidósporos multicelulares, com quatro a nove células, de paredes espessas, globulosas, suportadas em ramos laterais (Evans; Kirk, 2017).

Por muito tempo, a espécie foi considerada somente um fungo comumente encontrado nos solos. Somente em 1974, foi descrito pela primeira vez o parasitismo de *V. chlamydosporium* em cistos de *Heterodera* spp. (Willcox; Tribe, 1974). No ano seguinte, mencionou-se o potencial do fungo para redução de *Heterodera avenae* em campos de cereais (Kerry, 1975). Em 2001, o fungo deixou de ser chamado de *V. chlamydosporium*, sendo reclassificado como *Pochonia chlamydosporia* (Gams; Zare, 2001).

A espécie é cosmopolita e foi encontrada em solos supressivos em diversas regiões do planeta. Possui a capacidade de sobreviver como saprófita no solo na ausência de nematoides (Manzanilla-López et al., 2013).

O principal efeito de *P. chlamydosporia* sobre a população dos nematoides ocorre pelo parasitismo de ovos de nematoides e fêmeas sedentárias. O parasitismo do fungo ocorre devido à produção de um apressório que secreta substâncias que degradam a cutícula do ovo (Escudero; Lopez-Llorca, 2012; Escudero et al., 2016). A colonização e absorção do conteúdo pelas hifas do fungo disponibilizará os nutrientes necessários para seu metabolismo, crescimento e reprodução. Os clamidósporos de *P. chlamydosporia* podem germinar e emitir o micélio, que penetra os ovos do nematoide logo em sequência (Dallemole-Giaretta et al., 2008). Quando o micélio tem tempo para colonizar o solo, o número de galhas nas plantas é reduzido (Podestá et al., 2016).

Durante o processo de colonização do solo, pode haver a liberação de diversos compostos químicos com potencial de afetar os nematoides, tais como as toxinas phomalactone (Khambay et al., 2000), chlamyphilone (Lacatena et al., 2019) e aurovertina (Niu et al., 2010; Wang et al., 2015).

Os efeitos indiretos no controle de nematoides propiciados por esses fungos estão associados à indução de crescimento e à resistência sistêmica, produção de substâncias antimicrobianas e antagonismo aos microrganismos fitopatogênicos (Monfort et al., 2005). Já foi relatado que o fungo pode promover o crescimento de plantas de tomateiro (Zavala-Gonzalez et al., 2015), alface (Dallemole-Giaretta et al., 2015) e cevada (Larriba et al., 2015), além de induzir a resistência a *M. incognita* em tomateiro (Medeiros et al., 2015; Ghahremani et al., 2019).

A indução de resistência deve-se ao fato de que *P. chlamydosporia* ativa as rotas metabólicas, aumentando as concentrações de polifenoloxidasas e peroxidases em raízes (Medeiros et al., 2015). Em tomateiros, alguns isolados de *P. chlamydosporia* foram capazes de modular a ativação da via do ácido salicílico e a via do jasmonato (Ghahremani et al., 2019).

As duas vias estão associadas à ativação de proteínas de resistência que atuam na defesa das plantas contra *Meloidogyne* spp. (Van Loon; Rep; Pieterse, 2006; Fujimoto et al., 2011; Nahar et al., 2011; Hu et al., 2017). Além dos benefícios já mencionados, há a hipótese de que, pelo fato do fungo apresentar atividade endofítica, ele possa melhorar a absorção de nutrientes pela planta, o que explicaria o melhor desenvolvimento das mesmas quando tratadas com *P. chlamydosporia* (Schäfer et al., 2009).

Apesar dos resultados já obtidos, vale destacar que diferentes isolados do fungo podem apresentar potencial variável para o controle do nematoide, bem como atuar de diferentes formas para o manejo. A produção de enzimas extracelulares envolvidas no parasitismo de ovos de *Meloidogyne* spp. varia com o isolado de *P. chlamydosporia*. Entretanto, interações complexas com o ambiente ocorrem, influenciando na patogenicidade (Esteves et al., 2009). A combinação de fatores genéticos junto à adaptabilidade é determinante para o sucesso do controle. Em muitos casos, isolados nativos apresentam eficiência superior a isolados introduzidos, pois são mais adaptados (Sorribas et al., 2003).

Apesar de todas as pesquisas, ainda não está claro o efeito direto e indireto de *P. chlamydosporia* sobre os nematoides parasitas de plantas, bem como a interação que ocorre entre o fungo, a cultura da soja e o nematoide *M. javanica*, principalmente no aspecto relacionado à indução de resistência e absorção de nutrientes.

REFERÊNCIAS

ABAD, P. et al. Genome sequence of the metazoan plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. **Nature Biotechnology**, Nova York, v. 26, n. 8, p. 909–915, 2008.

ABOLUSORO, S. A. et al. Control of nematode disease of egg plant (*Solanum aethiopicum*) using manure. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, Abingdon, v. 48, n. 2, p. 188–193, 2015.

ABOUTORABI, M. A review on the biological control of plant diseases using various microorganisms. **Journal of Research in Medical and dental Science**, Irã, v. 6, n. 4, p. 30–35, 2018.

ADAM, M.; HEUER, H.; HALLMANN, J. Bacterial antagonists of fungal pathogens also control root-knot nematodes by induced systemic resistance of tomato plants. **PLOS ONE**, Áustria, v. 9, n. 2, 2014.

AFFOKPON, A. et al. Biocontrol potential of native *Trichoderma* isolates against root-knot nematodes in West African vegetable production systems. **Soil Biology and Biochemistry**,

África, v. 43, n. 3, p. 600–608, 2011.

AKHTAR, M. S. et al. Biocontrol of plant parasitic nematodes by fungi: efficacy and control strategies. In: M. K. Meghvansi; A. Varma (Orgs.); **Organic amendments and soil suppressiveness in plant disease management**, Suíça, p.219–247, 2015. Switzerland: Springer International Publishing Switzerland.

AMULU, L. U.; ADEKUNLE, O. K. Comparative effects of poultry manure, cow dung, and carbofuran on yield of *Meloidogyne incognita*-infested okra. **Journal of Agricultural Science and Technology**, Nigéria, v. 17, n. 2, p. 495–504, 2015.

ARAUJO, J. M. et al. Survival of *Pochonia chlamydosporia* in the gastrointestinal tract of experimentally treated dogs. **Research in Veterinary Science**, Lausanne, v. 93, n. 2, p. 803–806, 2012. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2011.10.019>>.

AWD-ALLAH, S. F.; EL-SHERBINY, A. A. Non chemical control of *Heterodera goldeni* and *Meloidogyne incognita* on rice plants using residues of oyster mushroom cultivation and supernatant of *Bacillus thuringiensis* before transplanting under field microplots conditions. **Egyptian Journal of Agronomy**, Cairo, v. 14, n. 1, p. 62–77, 2015.

AZAM, F. et al. Evaluation of biocontrol potencial of *Pseudomonas fluorescens* against root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*) infecting chili. **Plant Protection**, Faisalabad, v. 02, n. 02, p. 57–62, 2018.

BAKR, R. A. Utilization of oleander leaves and fish waste on root-knot nematodes control. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, Tamilnadu, v. 6, n. 2, p. 1912–1925, 2017.

BARKER, K. R.; KOENNING, S. R. Developing sustainable systems for nematode management. **Annual Review of Phytopathology**, California, v. 36, n. 1, p. 165–205, 1998.

BARONA, E. et al. The role of pasture and soybean in deforestation of the Brazilian Amazon. **Environmental Research Letters**, Berkeley, v. 5, n. 2, 2010.

BELLÉ, C. et al. *Meloidogyne* species associated with weeds in Rio Grande do Sul. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 37, p. e019214250, 2019.

BILGRAMI, A. L. Biological control potentials of predatory nematodes. In: A. Ciancio; K. G. Mukerji (Orgs.); **Integrated Management and Biocontrol of Vegetable and Grain Crops Nematodes**. p. 3–28, 2008. Dordrecht: Springer. Disponível em: <https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4020-6063-2_1>.

BLOK, V. C. et al. Parasitism genes and host range disparities in biotrophic nematodes: The conundrum of polyphagy versus specialisation. **BioEssays**, Hoboken, v. 30, n. 3, p. 249–259, 2008.

BONKOWSKI, M.; VILLENAVE, C.; GRIFFITHS, B. Rhizosphere fauna: The functional and structural diversity of intimate interactions of soil fauna with plant roots. **Plant and Soil**, Crawley, v. 321, n. 1–2, p. 213–233, 2009.

BONTEMPO, A. F. et al. *Pochonia chlamydosporia* controls *Meloidogyne incognita* on carrot. **Australasian Plant Pathology**, Heidelberg, v. 43, n. 4, p. 421–424, 2014.

BRAGA, F. R.; DE ARAÚJO, J. V. Nematophagous fungi for biological control of gastrointestinal nematodes in domestic animals. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Münster, v. 98, n. 1, p. 71–82, 2014.

BRUINSMA, J. S. DA S.; ANTONIOLLI, Z. I. Resistance of *Meloidogyne javanica* in soybean genotypes. **Nematoda**, Canberra, v. 2, n. March, p. e032015, 2015.

CABONI, P. et al. Nematicidal activity of furanocoumarins from parsley against *Meloidogyne* spp. **Pest Management Science**, Oxford, v. 71, n. 8, p. 1099–1105, 2015.

CAILLAUD, M. C. et al. Root-knot nematodes manipulate plant cell functions during a compatible interaction. **Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v. 165, n. 1, p. 104–113, 2008.

CALDERÓN-URREA. et al. Early development of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. **BMC Developmental Biology**, Londres, v. 16, n. 1, p. 1–14, 2016. BMC Developmental Biology. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s12861-016-0109-x>>.

CAMPOS, H. D.; CAMPOS, V. P.; POZZA, E. A. Efeito da temperatura na multiplicação celular, no desenvolvimento embrionário e na eclosão de juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne javanica*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 34, n. 1, p. 29–33, 2008.

CARVALHO, A. M. et al. Forms of phosphorus in an oxisol under different soil tillage systems and cover plants in rotation with maize. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 38, n. 3, p. 972–979, 2014.

CATTELAN, A. J.; DALL'AGNOL, A. The rapid soybean growth in Brazil. **OCL - Oilseeds and fats, Crops and Lipids**, Shenzhen, v. 25, n. 1, p. 1–12, 2018.

CESNIK, R. Dois nematódeos parasitando *Tropaeolum majus* L. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v. 32, n. 4, p. 253–260, 1957. Disponível em: <<http://www.revistadeagricultura.org.br/index.php/revistadeagricultura/article/view/2599>>.

CHARCHAR, J. M. et al. *Meloidogyne polycephannulata* n. sp. (Nematoda: Meloidogynidae), a root-knot nematode parasitizing carrot in Brazil. **Journal of Nematology**, Hanover, v. 41, n. 3, p. 174–186, 2009.

CHARLIER, J. B. et al. Transport of a nematicide in surface and groundwaters in a tropical volcanic catchment. **Journal of Environmental Quality**, Heverlee, v. 38, n. 3, p. 1031–1041, 2009.

CHINHEYA, C. C.; YOBO, K. S.; LAING, M. D. Biological control of the root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* (Chitwood) using *Bacillus* isolates, on soybean. **Biological Control**, Valbonne, v. 109, p. 37–41, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.03.009>>.

COCK, M. J. W. et al. Do new access and benefit sharing procedures under the convention on biological diversity threaten the future of biological control? **BioControl**, Valbonne, v. 55, n. 2, p. 199–218, 2010.

COLLANGE, B. et al. Root-knot nematode (*Meloidogyne*) management in vegetable crop production: The challenge of an agronomic system analysis. **Crop Protection**, Lincoln, v. 30, n. 10, p. 1251–1262, 2011. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2011.04.016>>.

DALLEMOLE-GIARETTA, R. et al. *Pochonia chlamydosporia* promotes the growth of tomato and lettuce plants. **Acta Scientiarum - Agronomy**, Maringá, v. 37, n. 4, p. 417–423, 2015.

DALLEMOLE-GIARETTA, R. et al. Efeito da concentração de clamidósporos de *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* no Controle de *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 32, n. 4, p. 327–332, 2008.

DALLEMOLE-GIARETTA, R. et al. Screening of *Pochonia chlamydosporia* Brazilian isolates as biocontrol agents of *Meloidogyne javanica*. **Crop Protection**, Lincoln, v. 42, p. 102–107, 2012. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2012.06.002>>.

DAVIS, E. L.; HUSSEY, R. S.; BAUM, T. J. Getting to the roots of parasitism by nematodes. **Trends in Parasitology**, Cambridge, v. 20, n. 3, p. 134–141, 2004.

DE ALMEIDA, A. A. et al. Seed treatment for management of *Meloidogyne javanica* in soybean. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 38, n. 5, p. 2995–3005, 2017.

DE BRIDA, A. L. et al. Variabilidade espacial de *Meloidogyne javanica* em soja. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 42, n. 2, p. 175–179, 2016.

DIAS, W. P. et al. **Nematóides em soja: identificação e controle**. Londrina, 2010.

DIAS-ARIEIRA, C. R. Nematoides associados a plantas daninhas. **Boletim de pesquisa**, Rondonópolis, v. 18, p. 150–156, 2017.

DIAS-ARIEIRA, C. R. et al. Biological control of *Pratylenchus brachyurus* in soya bean crops. **Journal of Phytopathology**, Göttingen, v. 166, n. 10, p. 722–728, 2018.

DIAS-ARIEIRA, C. R. et al. Avaliação de gramíneas forrageiras para o controle de *Meloidogyne incognita* e *M. javanica* (Nematoda). **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 25, n. 2, p. 473–477, 2003.

DIAS-ARIEIRA, C. R. et al. Efficiency of *Pochonia chlamydosporia* in *Meloidogyne incognita* control in lettuce crop (*Lactuca sativa* L.). **Journal of Food, Agriculture and Environment**, Washington, v. 9, n. 3–4, p. 561–563, 2011.

DINH, P. T. Y.; KNOBLAUCH, M.; ELLING, A. A. Nondestructive imaging of plant-parasitic nematode development and host response to nematode pathogenesis. **Phytopathology**, v. 104, n. 5, p. 497–506, 2014.

EAPEN, S. J.; BEENA, B.; RAMANA, K. V. Tropical soil microflora of spice-based cropping systems as potential antagonists of root-knot nematodes. **Journal of Invertebrate Pathology**, New Zealand, v. 88, n. 3, p. 218–225, 2005.

ELMI, N.; ABDOLLAHI, M. Inhibitory effects of licorice residue and spent mushroom compost of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) on root-knot nematode *Meloidogyne javanica*. **Iranian Journal of Plant Pathology**, Oran, v. 51, n. 1, p. Pe44–Pe54, 2015.

ESCOBAR, C. et al. Overview of root-knot nematodes and giant cells. **Advances in Botanical Research**, Birmingham, v. 73, p. 1–32, 2015. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/bs.abr.2015.01.001>>.

ESCUADERO, N. et al. Chitosan enhances parasitism of *Meloidogyne javanica* eggs by the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia*. **Fungal Biology**, Nottingham, v. 120, n. 4, p. 572–585, 2016. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.funbio.2015.12.005>>.

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**, v. 57, n. 1, p. 33–42, 2012.

ESTEVEZ, I. et al. Production of extracellular enzymes by different isolates of *Pochonia chlamydosporia*. **Mycological Research**, v. 113, n. 8, p. 867–876, 2009.

EVANS, H. C.; KIRK, P. M. Systematics of *Pochonia*. **Perspectives in sustainable nematode management through *Pochonia chlamydosporia* applications for root and rhizosphere health**. Editora, p.21–43, 2017.

FABIYI, O. A. Management of *Meloidogyne incognita* infected tomato plants with agricultural wastes. **Bulletin of the Institute of Tropical Agriculture**, Kyushu University, v. 41, p. 15–20, 2018.

FAO. Crops. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en>>. Acesso em: 21/10/2019b.

FAO. Value of agricultural production. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/>>. Acesso em: 20/10/2019a.

FAVERY, B. et al. Gall-forming root-knot nematodes hijack key plant cellular functions to induce multinucleate and hypertrophied feeding cells. **Journal of Insect Physiology**, v. 84, p. 60–69, 2016. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jinsphys.2015.07.013>>.

FEARNSIDE, P. M. Soybean cultivation as a threat to the environment in Brazil. **Environmental Conservation**, v. 28, n. 1, p. 23–38, 2001.

FERNANDES, R. H. et al. Survival of *Pochonia chlamydosporia* on the soil surface after different exposure intervals at ambient conditions. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 34, n. 4, p. 241–245, 2017. Asociación Española de Micología. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.riam.2017.04.001>>.

FERRIS, H. Contribution of nematodes to the structure and function of the soil food web.

Journal of nematology, v. 42, n. 1, p. 63–67, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22736838>%0A<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3380510>>.

FONSECA, W. L. et al. Toxicity of manipueira to *Meloidogyne incognita* in soybean. **Pesquisa Agropecuaria Tropical**, v. 46, n. 6, p. 413–420, 2016.

FOURIE, H. et al. Comparative cellular responses in susceptible and resistant soybean cultivars infected by *Meloidogyne incognita*. **Nematology**, v. 15, n. 6, p. 695–708, 2013.

FRANCHINI, J. C. et al. Relationship among soil properties, root-lesion nematode population, and soybean growth. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 17, n. 1, p. 30–35, 2018.

FRANZENER, G. et al. Nematoides formadores de galha e de cisto patogênicos à cultura da soja em municípios do Oeste do Paraná. **Nematologia Brasileira**, v. 29, n. 2, p. 261–265, 2005.

FREITAS, J. R. B. et al. Soil factors influencing nematode spatial variability in soybean. **Agronomy Journal**, v. 109, n. 2, p. 610–619, 2017.

FUJIMOTO, T. et al. Expression profile of jasmonic acid-induced genes and the induced resistance against the root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) in tomato plants (*Solanum lycopersicum*) after foliar treatment with methyl jasmonate. **Journal of Plant Physiology**, v. 168, n. 10, p. 1084–1097, 2011. Elsevier GmbH. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2010.12.002>>.

GAMS, W.; ZARE, R. A revision of *Verticillium* sect. Prostrata. III. Generic classification. **Nova Hedwigia**, v. 72, n. 3–4, p. 329–337, 2001.

GBIF SECRETARIAT. *Glycine max* (L.) Merr. Disponível em: <<https://www.gbif.org/species/5359660>>. Acesso em: 20/10/2019.

GHAHREMANI, Z. et al. *Pochonia chlamydosporia* induces plant-dependent systemic resistance to *Meloidogyne incognita*. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, n. August, 2019.

GINÉ, A. et al. Thermal requirements and population dynamics of root-knot nematodes on cucumber and yield losses under protected cultivation. **Plant Pathology**, v. 63, n. 6, p. 1446–1453, 2014.

GODOY, C. V. et al. Models estimating human exposure to pesticides. **Outlooks on Pest Management**, v. 26, n. 3, p. 113–117, 2015.

GOMES, V. M. **Meloidoginose da goiabeira: Estudos sobre a sua patogênese e formas de convívio com a doença a campo**, 2007. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Disponível em: <http://www.uenf.br/Uenf/Downloads/PRODVEGETAL_3434_1202393841.pdf>.

GRUNDLER, F. M. W.; HOFMANN, J. Water and nutrient transport in nematode feeding sites. In: J. Jones; G. Gheysen; C. Fenoll (Orgs.); **Genomics and molecular genetics of plant-nematode interactions**. p.423–439, 2011. Dordrecht: Springer. Disponível em: <<https://link.springer.com/book/10.1007/978-94-007-0434-3>>.

HAHN, M. H.; et al. Levantamento bibliométrico de fungos nematófagos no controle dos nematoides das galhas. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 17, n. 4, p. 389–397, 2018. Disponível em: <<http://saber.unioeste.br/index.php/scientiaagraria/article/view/19098/13857>>.

HAHN, M. H. et al. Nematophagous mushrooms can be an alternative to control *Meloidogyne javanica*. **Biological Control**, p. 104024, 2019. Elsevier Inc. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104024>>.

HARTMAN, G. L.; WEST, E. D.; HERMAN, T. K. Crops that feed the World 2. Soybean-worldwide production, use, and constraints caused by pathogens and pests. **Food Security**, v. 3, n. 1, p. 5–17, 2011.

HASSAN, M. A. et al. Nematodes threats to global food security. **Acta Agriculturae Scandinavica Section B: Soil and Plant Science**, v. 63, n. 5, p. 420–425, 2013.

HOFMANN, J. et al. The role of callose deposition along plasmodesmata in nematode feeding sites. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 23, n. 5, p. 549–557, 2010.

HU, H. et al. RNA-Seq identification of candidate defense genes targeted by endophytic *Bacillus cereus*-mediated induced systemic resistance against *Meloidogyne incognita* in tomato. **Pest Management Science**, v. 74, n. 12, p. 2793–2805, 2018.

HU, Y. et al. Exogenous application of methyl jasmonate induces defence against *Meloidogyne hapla* in soybean. **Nematology**, v. 19, n. 3, p. 293–304, 2017.

HUNT, D. J.; HANDOO, Z. A. Taxonomy, identification and principal species. In: R. N. Perry; M. Moens; J. L. Starr (Orgs.); **Root-knot Nematodes**. 1o ed, p.55–97, 2009. Wallingford - UK: CABI Publishing.

HUSSAIN, M. A.; MUKHTAR, T.; KAYANI, M. Z. Efficacy evaluation of *Azadirachta indica*, *Calotropis procera*, *Datura stramonium* and *Tagetes erecta* against root-knot nematodes *Meloidogyne incognita*. **Pakistan Journal of Botany**, v. 43, n. Special Issue, p. 197–204, 2011.

JIN, G. Y. et al. An important military city of the Early Western Zhou Dynasty: Archaeobotanical evidence from the Chenzhuang site, Gaoqing, Shandong Province. **Chinese Science Bulletin**, v. 57, n. 2–3, p. 253–260, 2012.

JONES, M. G. K.; GOTO, D. B. Root-knot nematodes and giant cells. In: J. Jones; G. Gheysen; C. Fenoll (Orgs.); **Genomics and molecular genetics of plant-nematode interactions**. p.83–100, 2011. Dordrecht: Springer. Disponível em: <<https://link.springer.com/book/10.1007/978-94-007-0434-3>>.

KANKAM, F.; SOWLEY, E. N. K.; OPPONG, N. E. Effect of poultry manure on the growth, yield and root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.) infestation of carrot (*Daucus carota* L.). **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v. 48, n. 5, p. 452–458, 2015.

KANZAKI, N.; EKINO, T.; GIBLIN-DAVIS, R. M. Feeding dimorphism in a mycophagous nematode, *Bursaphelenchus sinensis*. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–9, 2019. Springer US.

Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-50462-z>>.

KERRY, B. R. Fungi and the decrease of cereal cyst-nematode populations in cereal monoculture. **EPPO Bulletin**, v. 5, n. 4, p. 353–361, 1975.

KHAMBAY, B. P. S. et al. Communication to the editor a nematocidal metabolite from *Verticillium chlamyosporium*. **Pest Management Science**, v. 56, n. 12, p. 1098–1099, 2000.

KHAN, Z.; KIM, Y. H. A review on the role of predatory soil nematodes in the biological control of plant parasitic nematodes. **Applied Soil Ecology**, v. 35, n. 2, p. 370–379, 2007.

KHAN, Z.; KIM, Y. H. The predatory nematode, *Mononchoides fortidens* (Nematoda: Diplogasterida), suppresses the root-knot nematode, *Meloidogyne arenaria*, in potted field soil. **Biological Control**, v. 35, n. 1, p. 78–82, 2005.

KHANNA, K. et al. Role of plant growth promoting bacteria (PGPRs) as biocontrol agents of *Meloidogyne incognita* through improved plant defense of *Lycopersicon esculentum*. **Plant and Soil**, v. 436, n. 1–2, p. 325–345, 2019.

KIM, M. Y. et al. Tracing soybean domestication history: From nucleotide to genome. **Breeding Science**, v. 61, n. 5, p. 445–452, 2012.

KÖHL, J.; KOLNAAR, R.; RAVENSBERG, W. J. Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: Relevance beyond efficacy. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, n. July, p. 1–19, 2019.

KUMAR, N.; SINGH, K. P. Use of *Dactylaria brochopaga*, a predacious fungus, for managing root-knot disease of wheat (*Triticum aestivum*) caused by *Meloidogyne graminicola*. **Mycobiology**, v. 39, n. 2, p. 113–117, 2011.

KUNG, J. K. SING; LI, N. Commercialization as exogenous shocks: The effect of the soybean trade and migration in Manchurian villages, 1895-1934. **Explorations in Economic History**, v. 48, n. 4, p. 568–589, 2011. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.eeh.2011.07.002>>.

LACATENA, F. et al. Chlamyphilone, a novel *Pochonia chlamyosporia* metabolite with insecticidal activity. **Molecules**, v. 24, n. 4, p. 1–11, 2019.

LARRIBA, E. et al. Endophytic colonization of barley (*Hordeum vulgare*) roots by the nematophagous fungus *Pochonia chlamyosporia* reveals plant growth promotion and a general defense and stress transcriptomic response. **Journal of Plant Research**, v. 128, n. 4, p. 665–678, 2015.

LEE, G. A. et al. Archaeological soybean (*Glycine max*) in East Asia: Does size matter? **PLOS ONE**, v. 6, n. 11, 2011.

LI, G. et al. Nematicidal substances from fungi. **Recent Patents on Biotechnology**, v. 1, n. 3, p. 212–233, 2007. Disponível em: <<http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1872-2083&volume=1&issue=3&spage=212>>.

LI, Y. H. et al. Genetic diversity in domesticated soybean (*Glycine max*) and its wild progenitor (*Glycine soja*) for simple sequence repeat and single-nucleotide polymorphism loci. **New Phytologist**, v. 188, n. 1, p. 242–253, 2010.

LIMA FILHO, et al. **Adubação verde e plantas de cobertura no Brasil: fundamentos e prática**. Brasília: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2014.

LIMA, F. S. O. et al. Nematodes affecting soybean and sustainable practices for their management. In: E. by M. Kasai (Org.); **Soybean - The Basis of Yield, Biomass and Productivity**. p.95–110, 2017. London: IntechOpen. Disponível em: <<https://www.intechopen.com/books/advanced-biometric-technologies/liveness-detection-in-biometrics>>.

LIU, X.; XIANG, M.; CHE, Y. The living strategy of nematophagous fungi. **Mycoscience**, v. 50, n. 1, p. 20–25, 2009.

LOBO, K. S. et al. Reaction of soybean genotypes in soil naturally infested with *Rotylenchulus reniformis*. **Nematropica**, v. 47, p. 18–25, 2017.

LOPES, E. A. et al. Potencial de isolados de fungos nematófagos no controle de *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, v. 31, n. 2, p. 20–26, 2007. Disponível em: <<http://docentes.esalq.usp.br/sbn/nbonline/ol312/78-84pb.pdf>>.

LOPES, E. P. et al. Effect of *Bacillus subtilis* on *Meloidogyne javanica* and on tomato growth promotion. **Journal of Experimental Agriculture International**, v. 35, n. 1, p. 1–8, 2019.

LÓPEZ GÓMEZ, M. et al. Damage functions of *Meloidogyne javanica* on zucchini squash and relative leaf chlorophyll content. **Journal of Nematology**, v. 46, n. 2, p. 195–196, 2014. Disponível em: <<https://journals.flvc.org/jon/issue/view/3996>>.

LÓPEZ-GÓMEZ, M.; VERDEJO-LUCAS, S. Penetration and post-infection development of root-knot nematodes in watermelon. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v. 15, n. 4, 2017.

LORITO, M. et al. Translational research on *Trichoderma*: From 'omics to the field. **Annual Review of Phytopathology**, v. 48, n. 1, p. 395–417, 2010.

MADULU, J. D.; TRUDGILL, D. L. Influence of temperature on the development and survival of *Meloidogyne javanica*. **Nematologica**, v. 40, p. 230–243, 1994.

MANZANILLA-LÓPEZ, R. H. et al. *Pochonia chlamydosporia*: Advances and challenges to improve its performance as a biological control agent of sedentary endo-parasitic nematodes. **Journal of Nematology**, v. 45, n. 1, p. 1–7, 2013.

MATTOS, V. S. et al. *Meloidogyne* spp. populations from native Cerrado and soybean cultivated areas: Genetic variability and aggressiveness. **Nematology**, v. 18, n. 5, p. 505–515, 2016.

MAZZETTI, V. C. G. et al. Reaction of soybean cultivars to *Meloidogyne javanica* and

Meloidogyne incognita. **Revista Ceres**, v. 66, n. 3, p. 220–225, 2019.

MEDEIROS, H. A. et al. Á. Induction of resistance in tomato against *Meloidogyne javanica* by *Pochonia chlamydosporia*. **Nematoda**, v. 2, n. November, 2015.

MEDINA-CANALES, M. G. et al. A. Assessment of three strategies for the management of *Meloidogyne arenaria* on carrot in Mexico using *Pochonia chlamydosporia* var. mexicana under greenhouse conditions. **Biocontrol Science and Technology**, v. 29, n. 7, p. 671–685, 2019. Taylor & Francis. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/09583157.2019.1582267>>.

MIAMOTO, A. et al. Penetration and reproduction of *Meloidogyne javanica* on Leguminous Crops. **Journal of Phytopathology**, v. 164, n. 11–12, p. 890–895, 2016.

MIAMOTO, A. et al. Antagonistic effects of Java against plant parasitic nematodes. **Journal of Agricultural Science**, v. 10, n. 2, p. 289, 2018.

MIAMOTO, A. et al. Alternative products for *Pratylenchus brachyurus* and *Meloidogyne javanica* management in soya bean plants. **Journal of Phytopathology**, v. 165, n. 10, p. 635–640, 2017.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Agrofit. Disponível em: <<http://agrofit.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 27/12/2019.

MONFORT, E.; LOPEZ-LLORCA, L. V.; JANSSEN, H. B.; et al. Colonisation of seminal roots of wheat and barley by egg-parasitic nematophagous fungi and their effects on *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* and development of root-rot. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 37, n. 7, p. 1229–1235, 2005.

MOOSAVI, M. R. et al. Pathogenicity of *Pochonia* species on eggs of *Meloidogyne javanica*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 104, n. 2, p. 125–133, 2010. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2010.03.002>>.

MUKHTAR, T.; PERVAZ, I. In vitro evaluation of ovicidal and larvicidal effects of culture filtrate of *Verticillium chlamydosporium* against *Meloidogyne javanica*. **International Journal of Agriculture & Biology**, v. 5, n. 4, p. 576–579, 2003.

NAHAR, K. et al. The jasmonate pathway is a key player in systemically induced defense against root knot nematodes in rice. **Plant Physiology**, v. 157, n. 1, p. 305–316, 2011.

NEHER, D. A.; POWERS, T. O. Nematodes. In: D. Hillel (Org.). **Encyclopedia of soils in the environment**. 3o ed, p.2200, 2005. Amsterdam: Academic Press. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/referencework/9780123485304/encyclopedia-of-soils-in-the-environment#book-info>>.

NIU, X. M.; WANG, Y. L.; CHU, Y. S.; et al. Nematodetoxic aurovertin-type metabolites from a root-knot nematode parasitic fungus *Pochonia chlamydosporia*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 2, p. 828–834, 2010.

NIU, X. M.; ZHANG, K. Q. *Arthrobotrys oligospora*: A model organism for understanding the interaction between fungi and nematodes. **Mycology**, v. 2, n. 2, p. 59–78, 2011.

NORDBRING-HERTZ, B. Morphogenesis in the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora* - An extensive plasticity of infection structures. **Mycologist**, v. 18, n. 3, p. 125–133, 2004.

NTALLI, N. et al. Acetic acid, 2-undecanone, and (E)-2-decenal ultrastructural malformations on *Meloidogyne incognita*. **Journal of Nematology**, v. 48, n. 4, p. 248–260, 2016.

NTALLI, N. et al. Whey: The soil bio-community enhancer that selectively controls root-knot nematodes. **Plants**, v. 8, n. 11, p. 1–15, 2019.

OLIVEIRA, D. F. et al. Purification and identification of metabolites produced by *Bacillus cereus* and *B. subtilis* active against *Meloidogyne exigua*, and their in silico interaction with a putative phosphoribosyltransferase from *M. incognita*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 86, n. 2, p. 525–538, 2014.

OLIVEIRA, G. DE L. T. The geopolitics of Brazilian soybeans. **Journal of Peasant Studies**, v. 43, n. 2, p. 348–372, 2015.

OOSTENBRINK, M. Major characteristic of the relation between nematodes and plants. **Mededlingen voor Landlb Hoogeschool Wageningen**, v. 66, p. 3–46, 1966.

OSUNLOLA, O. S.; FAWOLE, B. Evaluation of animal dungs and organomineral fertilizer for the control of *Meloidogyne incognita* on sweet potato. **International Journal of Agronomy**, v. 2015, 2015.

PARNELL, J. J. et al. From the lab to the farm: An industrial perspective of plant beneficial microorganisms. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. AUG2016, p. 1–12, 2016.

PEDROSO, L. A. et al. Volatile organic compounds produced by castor bean cake incorporated into the soil exhibit toxic activity against *Meloidogyne incognita*. **Pest Management Science**, v. 75, n. 2, p. 476–483, 2019.

PHANI, V. et al. Knockdown of a mucin-like gene in *Meloidogyne incognita* (Nematoda) decreases attachment of endospores of *Pasteuria penetrans* to the infective juveniles and reduces nematode fecundity. **Molecular Plant Pathology**, v. 19, n. 11, p. 2370–2383, 2018.

PODESTÁ, G. S. et al. Effect of time between soil infestation with *Pochonia chlamidosporia* and planting on the efficacy of the fungus in managing *Meloidogyne javanica*. **Crop Protection**, v. 90, p. 77–83, 2016.

PONTE, J. J. Subsídios ao conhecimento de plantas hospedeiras e ao controle dos nematóides das galhas, *Meloidogyne* spp., no Estado do Ceará. **Boletim Cearence de Agronomia**, v. 9, p. 1–26, 1968.

POROMARTO, S. H.; DEL RÍO MENDOZA, L. E.; NELSON, B. D. Spatial distribution of soybean cyst nematode in research plots. **Plant Disease**, v. 103, n. 8, p. 1876–1883, 2019.

PRODÖHL, I. "A miracle bean": How Soy conquered the west. Washington, 2010.

RALMI, N. H. A. A.; KHANDAKER, M. M.; MAT, N. Occurrence and control of root knot nematode in crops: A review. **Australian Journal of Crop Science**, v. 10, n. 12, p. 1649–1654, 2016.

RAMOS, R. F. et al. Plantas daninhas como hospedeiras dos nematoides-das-galhas. **Revista Agronomia Brasileira**, v. 3, n. 3, 2019.

REDDY, P. P. Crop rotation. In: P. P. Reddy (Org.); **Agro-ecological Approaches to Pest Management for Sustainable Agriculture**. p.1–339, 2017..

RIZVI, R. et al. Sustainable management of root-knot disease of tomato by neem cake and *Glomus fasciculatum*. **Cogent Food & Agriculture**, v. 1, n. 1, p. 1008859, 2015.

SANTOS, M. C. V. DOS et al. Interactions between *Pochonia chlamydosporia* and *Meloidogyne chitwoodi* in a crop rotation scheme. **Nematropica**, v. 44, n. 1, p. 37–46, 2014.

SANTOS, P. S. DOS. **Aplicação em sulco de nematicidas em soja**, 2015. Universidade Federal de Santa Maria. Disponível em: <http://cascavel.ufsm.br/tede//tede_busca/arquivo.php?codArquivo=8123>.

SCHÄFER, P. et al. Manipulation of plant innate immunity and gibberellin as factor of compatibility in the mutualistic association of barley roots with *Piriformospora indica*. **The plant journal**, Oxford, v. 59, n. 3, p. 461-474, July 2009.

SCHMITT, J.; BELLÉ, C. Reação de cultivares de soja a *Meloidogyne javanica* e *M. incognita*. **Nematropica**, v. 46, n. 1, p. 76–80, 2016.

SEDIVY, E. J.; WU, F.; HANZAWA, Y. Soybean domestication: the origin, genetic architecture and molecular bases. **New Phytologist**, v. 214, n. 2, p. 539–553, 2017.

SEID, A. et al. Resistance screening of breeding lines and commercial tomato cultivars for *Meloidogyne incognita* and *M. javanica* populations (Nematoda) from Ethiopia. **Euphytica**, v. 213, n. 4, p. 97, 2017. Springer Netherlands.

SIKORA, R. A. et al. Reflections on nematology in subtropical and tropical agriculture. In: R. Sikora; D Coyne; J Hallmann; P Timper (Orgs.); **Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture**. 2o ed, p.1–19, 2018. Wallingford: CABI.

SINGH, S.; SINGH, B.; SINGH, A. P. Nematodes: A Threat to sustainability of agriculture. **Procedia Environmental Sciences**, v. 29, p. 215–216, 2015. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.proenv.2015.07.270>>.

SOLTANI, T. et al. Chemical control of root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*) on olive in the greenhouse conditions. **Journal of Plant Pathology & Microbiology**, v. 04, n. 06, p. 4–7, 2013.

TEILLET, A. et al. Transcriptional changes of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* in response to *Arabidopsis thaliana* root signals. **PLOS ONE**, v. 8, n. 4, 2013.

TEIXEIRA, R. A.; BARBOSA, K. A. G.; ROCHA, M. R. DA. Reaction of soybean cultivars

to the root-knot nematode *Meloidogyne javanica*. **Científica**, v. 45, n. 2, p. 145, 2017.

TENENTE, R. C. V. et al. *Glycine* spp. Disponível em: <http://pragawall.cenargen.embrapa.br/aiqweb/nemhtml/nembanco01a_p.asp>. Acesso em: 20/10/2019.

TIMPER, P. et al. Influence of crop production practices on *Pasteuria penetrans* and suppression of *Meloidogyne incognita*. **Biological Control**, v. 99, p. 64–71, 2016. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.04.013>>.

TRUDGILL, D. L. An assessment of the relevance of thermal time relationships to nematology. **Fundamental and Applied Nematology**, v. 18, n. 5, p. 407–417, 1995. Disponível em: <<http://www.documentation.ird.fr/hor/fdi:010004271>>.

TRUDGILL, D. L.; BLOK, V. C. Apomictic, polyphagous root-knot nematodes: Exceptionally successful and damaging biotrophic root pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v. 39, n. 1, p. 53–77, 2001. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.phyto.39.1.53>>.

TZORTZAKAKIS, E. A.; TRUDGILL, D. L. A thermal time based method for determining the fecundity of *Meloidogyne javanica* in relation to modelling its population dynamics. **Nematologica**, v. 42, n. 3, p. 347–353, 1996.

VAN LENTEREN, J. C. The state of commercial augmentative biological control: Plenty of natural enemies, but a frustrating lack of uptake. **BioControl**, v. 57, n. 1, p. 1–20, 2012.

VAN LENTEREN, J. C. et al. Biological control using invertebrates and microorganisms: plenty of new opportunities. **BioControl**, v. 63, n. 1, p. 39–59, 2018.

VAN LOON, L. C.; REP, M.; PIETERSE, C. M. J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annual Review of Phytopathology**, v. 44, n. 1, p. 135–162, 2006.

VIEIRA, Í. S. et al. Association and predatory capacity of fungi *Pochonia chlamydosporia* and *Arthrobotrys cladodes* in the biological control of parasitic helminths of bovines. **Parasitology**, v. 146, n. 10, p. 1347–1351, 2019.

WANG, Y. L. et al. Yellow pigment Aurovertins mediate interactions between the pathogenic fungus *Pochonia chlamydosporia* and its nematode host. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 29, p. 6577–6587, 2015.

WILLCOX, J.; TRIBE, H. T. Fungal parasitism in cysts of *Heterodera* I. Preliminary investigations. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 62, n. 3, p. 585–594, 1974. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0007153674800690>>.

WU, H. et al. Temporal-spatial population density of *Heterodera glycines* in soybean roots during the early growth stage. **Nematology**, v. 13, n. 1, p. 79–86, 2011.

WUTKE, E. B.; CALEGARI, A.; WILDNER, L. DO P. Espécies de adubos verdes e plantas de cobertura e recomendações para seu uso. In: O. F. de Lima Filho; E. J. Ambrosano; F. Rossi; J. A. D. Carlos (Orgs.); **Adubação verde e plantas de cobertura no Brasil: fundamentos e**

prática. p.59–168, 2014. Brasília: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária.

YANG, J. et al. Extracellular enzymes and the pathogenesis of nematophagous fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, n. 1, p. 21–31, 2007.

YEATES, G. W. et al. Feeding habits in soil nematode families and genera - An outline for soil ecologists. **Journal of Nematology**, v. 25, n. 3, p. 315–331, 1993.

ZAVALA-GONZALEZ, E. A. et al. Some isolates of the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* promote root growth and reduce flowering time of tomato. **Annals of Applied Biology**, v. 166, n. 3, p. 472–483, 2015.

ZEVALLOS, D. M. P.; PEREIRA QUEROL, M.; AMBROGI, B. G. Cassava wastewater as a natural pesticide: Current knowledge and challenges for broader utilisation. **Annals of Applied Biology**, v. 173, n. 3, p. 191–201, 2018.

ZHANG, J.; HOLDORF, A. D.; WALHOUT, A. J. *C. elegans* and its bacterial diet as a model for systems-level understanding of host–microbiota interactions. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 46, p. 74–80, 2017. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2017.01.008>>.

Artigo apresentado nas normas da revista: Journal of Phytopathology

CAPÍTULO I

Pochonia chlamydosporia induz resistência em soja contra *Meloidogyne javanica*?

Abstract: *Pochonia chlamydosporia* (*Pc*) é um fungo quitinolítico, caracterizado pela eficiência em parasitar ovos e fêmeas sedentárias, que apresenta potencial para induzir resistência em plantas. Assim, objetivou-se avaliar a atividade de enzimas de defesa em soja tratada com *Pc* visando o controle de *Meloidogyne javanica* (*Mj*). Os tratamentos consistiram em plantas não inoculadas e não tratadas (testemunha); plantas inoculadas e não tratadas (*Mj*), planta não inoculadas e tratadas (*Pc*) e plantas inoculadas e tratadas (*Mj* + *Pc*). Avaliou-se penetração e desenvolvimento de *Mj* e atividade das enzimas peroxidase de guaiacol (POX), polifenoloxidase (PPO), fenilalanina amônia-liase (PAL) e catalase (CAT), aos 5, 8, 12 e 15 após a inoculação (DAI), em parte aérea e raiz. A aplicação de *Pc* reduziu penetração de juvenis e atrasou o desenvolvimento do nematoide. O fungo aumentou os níveis de POX (média geral), PPO, PAL e CAT, aos 5 e 15 DAI, na parte aérea das plantas e de PPO e CAT nas raízes aos 15 e 8 DAI. *Pc* possui potencial para indução de resistência em soja, sendo este um mecanismo adicional de controle.

Keywords: fungo nematófago, fungo endofítico, enzimas de resistência, nematoide das galhas.

Does *Pochonia chlamydosporia* induce resistance against *Meloidogyne javanica* in soybean?

Abstract

Pochonia chlamydosporia (*Pc*), a chitinolytic fungus highly efficient in parasitizing nematode eggs and sedentary females, is a potential inducer of plant resistance against root-knot nematodes. This study aimed to investigate the ability of *Pc* to enhance defense enzyme activity in soybean (*Glycine max*) inoculated with *Meloidogyne javanica* (*Mj*). Treatments consisted of uninoculated untreated plants (control), plants inoculated with *Mj*, plants treated with *Pc*, and plants inoculated with *Mj* and treated with *Pc*. Nematode penetration and development in roots and guaiacol peroxidase (POX), polyphenol oxidase (PPO), phenylalanine ammonia-lyase (PAL), and catalase (CAT) activities in shoots and roots were determined at 5, 8, 12, and 15 days after inoculation (DAI). *Pc* application reduced juvenile penetration and delayed nematode development. Treatment also increased POX, PPO, PAL and CAT activities in shoots at 5 and 15 DAI and PPO and CAT activities in roots at 15 and 8 DAI. The results indicate that the nematode-suppressive effects of *Pc* in soybean can also be attributed to resistance induction.

Keywords: nematophagous fungi, endophytic fungi, resistance enzyme, root-knot nematode.

Introduction

A indução de resistência pode ser é uma alternativa ambientalmente segura e sustentável para o controle de nematoides e consiste na ativação de mecanismos de defesa que encontram-se dormentes na planta, por meio da aplicação de microrganismos benéficos ou substâncias químicas, como o ácido jasmônico, etileno e ácido salicílico (Henry, Thonart, & Ongena, 2012; Thakur, & Sohal, 2013).

Os agentes elicitores abióticos ativam a resistência sistêmica adquirida (SAR), pela rota do ácido salicílico, sendo o acibenzolar-S-metil (ASM), um dos mais estudados para o controle dos nematoides das galhas e das lesões, em diferentes patossistemas (Chinnasri, Sipes, & Schmitt, 2003; Molinari, & Baser 2010; Puerari et al., 2013; Puerari et al., 2019). Os agentes bióticos estão relacionados, principalmente, a resistência sistêmica induzida (SIR), ativada pelas vias do ácido jasmônico e do etileno (Molinari, & Baser, 2010). Em ambos os casos, observa-se ativação de genes de defesa e aumento de proteínas relacionadas à patogênese, além de fortalecer as paredes celulares pela deposição de lignina (Raj et al., 2012; Zhu et al., 2013; Medeiros et al., 2015).

No processo de indução, várias enzimas podem ser ativadas, incluindo fenilalanina amônia-liase (PAL), peroxidase (POX), polifenoloxidase (PPO) e catalase (CAT), as quais estão associadas ao aumento de resistência de plantas a nematoides (Vasyukova et al., 2007; Sahebani, Hadavi, & Zade, 2011; Nikoo et al., 2014; Medeiros et al. 2015; Puerari et al. 2019), sendo cada enzima responsável por uma determinada atividade. Assim, a PAL catalisa a primeira reação na rota dos fenilpropanoides, transformando a L-fenilalanina em ácido cinâmico (Nakazawa et al. 2001), acelerando o processo de lignificação, fornecendo precursores do ácido hidroxicinâmico e aumentando a síntese de espécies fenólicas requeridas no processo de defesa (MacDonald, & D’Cunha, 2007).

A enzima PPO está associada à catálise da hidroxilação de monofenóis a o-difenóis e pela oxidação de o-difenóis em o-quinonas, compostos estes de alta toxicidade (Das et al. 2010), que iniciam o processo de oxidação de compostos fenólicos, quando há ruptura da célula vegetal (Das et al. 2010; War et al. 2012). A POX catalisa da oxidação de compostos fenólicos, vindos da rota de fenilpropanoides, pela redução do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Passardi, Longet, Penel, & Dunand, 2004). A CAT, por sua vez, apresenta elevada atividade quando o organismo se encontra em estresse (Avilez et al. 2008), exercendo duas funções importantes: a conversão de peróxido de hidrogênio a

água e oxigênio ($H_2O + O_2$) e a oxidação de compostos hidrogenados, como metanol, etanol, ácido fórmico e fenóis (Avci, Coruh, Bolukbasi, & Ogel, 2013).

No caso da indução de resistência a nematoides, tem-se observado, como reflexo do processo, a redução da penetração e, principalmente, da reprodução do parasita (Molinari, & Baser, 2010; Chaves, Pedrosa, Willadino, & Cardoso, 2016; Puerari et al. 2019), possivelmente por restringir a movimentação do nematoide no tecido radicular e o acesso ao alimento.

Dentro do contexto de SIR, há a hipótese de que o fungo *Pochonia chlamydosporia* possa atuar como indutor de resistência, pois, apesar de ser um fungo quitinolítico, caracterizado por parasitar ovos e fêmeas sedentárias de nematoides (Barbosa et al. 2019), há relatos da expressão de genes e enzimas relacionados à defesa da planta, em alguns patossistemas (Medeiros et al. 2015; Ghahremani et al. 2019). Contudo, sabe-se que este fenômeno pode ser específico para determinadas espécies vegetais e não há, até o momento, estudo da atividade do fungo na ativação das principais enzimas relacionadas a defesa em soja. Portanto, o trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de *P. chlamydosporia* isolado Pc-10 em controlar o nematoide *M. javanica* por meio da ativação de enzimas de resistência em soja.

Material and methods

General experimental procedures

O inóculo de *M. javanica* foi obtido de uma população pura, multiplicada em tomateiro em casa-de-vegetação, sob coordenadas geográficas 23°47'34,5'' S e 53°15'22,1'' W e 430 m de altitude. Os nematoides foram extraídos das raízes das plantas de acordo com a metodologia proposta por Hussey & Barker, modificada por Boneti & Ferraz (1981). A suspensão foi calibrada para 2000 ovos e eventuais juvenis de segundo estágio (J2) ml^{-1} , em câmara de Peters, sob microscópio óptico.

O isolado de *P. chlamydosporia* utilizado na pesquisa foi o Pc-10 (Rizotec[®], Stoller $5,2 \times 10^7$ clamidósporo g^{-1} de produto), na dose recomendada pelo fabricante (2,5 kg de produto comercial ha^{-1}) (Rizoflora Biotecnologia S.A.). O produto foi aplicado via sulco de semeadura, em um volume de calda equivalente a 50 L ha^{-1} .

Penetration test

O experimento de penetração foi realizado em casa-de-vegetação, sob coordenadas já mencionadas, com temperaturas variando de 17,7 a 23,9 °C. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em fatorial 2 x 4 (dois tratamentos x quatro épocas de avaliação), com três repetições. O primeiro fator correspondeu a plantas inoculadas com *M. javanica* tratadas ou não com *P. chlamydosporia* e o segundo fator as épocas de avaliação, que ocorreram aos 10, 15, 20 e 25 após a inoculação (DAI) do nematoide.

As unidades experimentais foram compostas por tubetes contendo 100 ml de uma mistura de solo (Latosolo Vermelho Distrófico) e areia, na proporção de 1:1 (v:v), previamente autoclavado a 121 °C por duas horas. Em cada tubete, foi aberto um orifício com 4 cm de profundidade, onde foi realizada a deposição de 1 ml da suspensão de nematoide, contendo 2000 ovos+J2 de *M. javanica*, seguido a aplicação de *P. chlamydosporia* ou água (testemunha), por aspersão do solo no orifício de semeadura, e, por fim, semeou-se uma semente de soja cv. M6410 IPRO por tubete.

Aos 10, 15, 20 e 25 dias após a inoculação, as plantas foram cuidadosamente coletadas, separando-se parte aérea e raiz. As raízes foram lavadas, depositadas sobre folhas de papel toalha para retirar o excesso de água e, posteriormente, determinou-se o comprimento da raiz e a massa fresca. Em seguida, as raízes foram submetidas à coloração com fucsina ácida (Byrd Jr, Kirpartrick, & Barker, 1983) e armazenadas em glicerina até o momento da avaliação. Para análise, os fragmentos de raízes foram depositados entre duas lâminas de microscopia e observados ao microscópio óptico no aumento de 40x, avaliando-se o número de nematoides presentes no interior das raízes, separando-os como J2, J3, J4 e fêmeas. A parte aérea das plantas foi avaliada quanto à altura, massa fresca e seca, sendo esta última obtida após 48 horas em estufa de secagem com ventilação de ar a 65 °C.

Resistance enzyme activity

O experimento de determinação da atividade enzimática foi realizado em BOD a temperatura de 26 °C, com fotoperíodo de 12 horas, em blocos inteiramente casualizados e disposto em fatorial 4 x 4, com quatro repetições. O primeiro fator correspondeu aos tratamentos, sendo eles plantas não inoculadas e não tratadas (testemunha); plantas inoculadas e não tratadas (*Mj*), planta não inoculadas e tratadas (*Pc*) e plantas inoculadas

e tratadas (*Mj* + *Pc*). O segundo fator foi o momento de avaliação, iguais a 5, 8, 12 e 15 após a inoculação (DAI) de *M. javanica*.

O experimento foi instalado e conduzido como descrito para penetração e, em cada época de avaliação, as plantas foram coletadas, sendo as raízes cuidadosamente lavadas. Então, amostras, de aproximadamente 0,5 g do tecido foliar e radicular, foram coletadas separadamente e armazenadas em papel alumínio, sendo congeladas a -20 °C. As amostras foram preparadas pela maceração em almofariz com nitrogênio líquido e, posteriormente, suspensas em 4 ml de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0, contendo 0,1 mM de EDTA e 1% (v/v) de polivinilpirrolidona (PVP). Os extratos foram centrifugados a 21.155 g (14.500 rpm) por 30 minutos a 4 °C e o sobrenadante, correspondente ao extrato enzimático, foi coletado e transferido para tubos eppendorf de 1,5 ml e armazenados congelados a -8 °C.

O teor total de proteínas foi determinado utilizando o corante Coomassie Brilliant Blue G-250 (Bradford 1976). Para isso, utilizou-se 50 µL do extrato enzimático adicionado a 2,5 ml do reagente de Bradford e, após 5 minutos de agitação, a leitura de absorbância foi realizada a 595 nm em espectrofotômetro (modelo UV 5200S, Global Trade Technology). A concentração de proteínas das amostras foi estimada pela curva padrão de concentração da albumina de soro bovino, utilizada para o cálculo das atividades enzimáticas expressas em mg de proteínas.

A atividade da enzima peroxidase de guaiacol (POX; EC 1.11.1.7) foi obtida realizando a leitura da conversão do guaiacol em tetraguaiacol na presença de peróxido de hidrogênio, pela mistura de 2,9 mL de substrato e 100 µL de extrato enzimático. O substrato foi composto de 7,25 µL de guaiacol e 8,874 µL de H₂O₂, diluídos em tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0), sendo mantido em banho-maria a 30 °C durante as análises. A leitura das amostras foi realizada durante 1 min em espectrofotômetro, a 470 nm, sendo os resultados expressos em $\Delta\text{abs } 470 \text{ nm min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína (Lusso, & Pascholati, 1999).

Determinou-se a atividade da polifenoloxidase (PPO; EC 1.10.3.2) pelo método de oxidação do catecol em quinona (Duangmal, & Apenten, 1999), obtida por uma mistura de 900 µL do substrato e 100 µL do extrato enzimático. O substrato foi composto por catecol, na concentração de 20 mM, dissolvido em tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 6,8), o qual foi mantido a 30 °C em banho-maria durante a avaliação. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 420 nm e os resultados foram expressos em $\Delta\text{abs } 420 \text{ nm min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína.

A atividade de fenilalanina amônia-liase (PAL; EC 4.3.1.5) foi determinada pelo método de conversão de L-fenilalanina em ácido trans-cinâmico (Umesha, 2006). Assim, uma solução contendo 100 µL do extrato enzimático a 400 µL de tampão Tris-HCl 0,025 M (pH 8,8) e 500 µL de solução de L-fenilalanina 0,05 M (825,9 mg diluído em 100 ml de tampão Tris-HCl 0,025 M, pH 8,8) foi mantida a 40 °C em banho-maria por 2 h. Após a incubação, a reação foi paralisada adicionando 60 µL de HCl 5 M. A suspensão foi analisada em espectrofotômetro a 290 nm. A atividade de PAL foi obtida pela diferença entre a absorbância das amostras em relação ao controle sem adição de L-fenilalanina e foi expressa em mg de ácido transcinâmico h⁻¹ mg⁻¹ de proteína.

Por fim, a atividade da catalase (CAT; EC 1.11.1.6) foi avaliada pelo método proposto por Goth, modificado por Tomankova et al. (2006). Para isso, misturou-se 100 µL do extrato enzimático a 500 µL de substrato para enzima (39,740 mL de tampão fosfato de potássio 60 mM com pH 7,4 e 260 µL de peróxido de hidrogênio, incubado a 37 °C por 30 min), sendo mantido em banho-maria a 37 °C por 4 min, adicionando 500 µL de solução de molibdato para paralisar a reação. A atividade de CAT foi obtida pela diferença entre a absorbância da mistura contendo a amostra e do controle (com adição de 500 µL de solução de molibdato antes de incubar as amostras em banho-maria). A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 405 nm e os resultados expressos em µmol⁻¹ min⁻¹ mg⁻¹ proteína.

Statistical analysis

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância a 5% de significância e quando necessário, para atender aos pressupostos de normalidade de Shapiro-Wilk, foram transformados em $\sqrt{x + 1}$. As médias foram comparados pelo Teste de Tukey à 5% de significância. As análises foram realizadas utilizando o programa estatístico Sisvar (Ferreira, 2011).

Results

Penetration test

Houve interação entre os fatores tratamento e época de avaliação para o número de J2 no interior das raízes de soja (Table 1). Aos 10 e 15 DAI, o número de J2 foi superior nas plantas inoculadas não tratadas com *P. chlamydosporia*. Nas plantas inoculadas não tratadas a média observada de J2 foi inferior nas avaliações finais, ou seja, aos 20 e 25

DAI. Para o tratamento *Pc* não houve diferença para o número de J2 ao longo do período de avaliação.

Tabela 1. Estádios de *Meloidogyne javanica* (*Mj*) em raízes de plantas de soja cv. M6410 IPRO tratadas ou não (testemunha) com *Pochonia chlamydosporia* (*Pc*).

Variável nematológica	Tratamento	Época de avaliação em dias após a inoculação (DAI)					Média
		10	15	20	25		
Juvenis	J2	<i>Mj</i>	1,25 aA	1,25 aA	0,00 aB	0,00 aB	0,62
		<i>Mj + Pc</i>	0,25 bA	0,00 bA	0,00 aA	0,00 aA	0,06
		Média	0,75	0,62	0,00	0,00	0,34
		CV (%)	16,66				
	J3	<i>Mj</i>	1,00	3,00	0,00	0,00	1,00 a
		<i>Mj + Pc</i>	0,00	0,50	0,00	0,00	0,12 b
		Média	0,50 AB	1,75 A	0,00 B	0,00 B	0,56
		CV (%)	25,25				
	J4	<i>Mj</i>	0,00	1,75	8,25	9,75	4,94 a
		<i>Mj + Pc</i>	0,00	0,00	3,25	3,50	1,69 a
		Média	0,00 C	0,88 BC	5,75 AB	6,62 A	3,31
		CV (%)	46,07				
Fêmea adulta	<i>Mj</i>	0,00	0,00	4,00	9,75	3,44 a	
	<i>Mj + Pc</i>	0,00	0,00	1,00	8,00	2,25 a	
	Média	0,00 B	0,00 B	2,50 B	8,88 A	2,84	
	CV (%)	40,06					

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. Dados transformados por $\sqrt{x + 1}$. CV: Coeficiente de variação.

As variáveis correspondentes aos números de J3, J4 e fêmeas adultas de *M. javanica* não apresentaram interação significativa entre os fatores tratamentos e épocas de avaliação. Contudo, ambos os fatores interferiram no número de J3, quando avaliados isoladamente (Table 1). O tratamento com *P. chlamydosporia* reduziu o número de J3 se comparado às plantas não tratadas. Quanto à época de avaliação, maior média foi observada aos 15 DAI. Apenas o fator época de avaliação interferiu no número de J4 e fêmeas (Table 1), sendo a maior média de J4 observada aos 25 DAI, como médias crescentes ao longo do período experimental. Fêmeas foram constatadas aos 20 e 25 DAI, sendo a média superior aos 25 DAI.

Houve interação entre os fatores para a altura de plantas, massa seca da parte aérea e massa fresca de raiz (Table 2). Aos 15 e 25 DAI, a altura das plantas inoculadas com *M. javanica* foi superior àquela observada para o tratamento *P. chlamydosporia*. No tratamento *M. javanica*, maior altura foi observada aos 25 DAI, enquanto no tratamento *P. chlamydosporia* aos 20 DAI (Table 2).

Tabela 2. Parâmetros vegetativos de plantas de soja cv. M6410 IPRO, avaliados dias após a inoculação de *Meloidogyne javanica* (*Mj*) em raízes tratadas ou não com *Pochonia chlamydosporia* (*Pc*).

Variável Agronômica	Tratamento	Dias após a inoculação					Média				
		10	15	20	25						
Altura de planta (cm)	<i>Mj</i>	12,25	aB	14,25	aAB	14,00	aAB	17,00	aA	14,38	
	<i>Mj</i> + <i>Pc</i>	13,25	aAB	11,50	bB	15,25	aA	14,00	bAB	13,50	
	Média	12,75		12,88		14,62		15,50		13,94	
	CV (%)	12,25									
Massa fresca da parte aérea (g)	<i>Mj</i>	0,89		0,95		0,84		1,14		0,96	a
	<i>Mj</i> + <i>Pc</i>	0,83		0,88		0,86		0,76		0,83	a
	Média	0,86	A	0,91	A	0,85	A	0,95	A	0,90	
	CV (%)	24,01									
Massa seca da parte aérea (g)	<i>Mj</i>	0,09	aB	0,11	aB	0,17	aA	0,17	aA	0,14	
	<i>Mj</i> + <i>Pc</i>	0,12	aA	0,12	aA	0,11	bA	0,12	bA	0,12	
	Média	0,10		0,11		0,14		0,15		0,13	
	CV (%)	23,98									
Massa fresca radicular (g)	<i>Mj</i>	0,42	aB	0,40	aB	0,68	aA	0,66	aA	0,54	
	<i>Mj</i> + <i>Pc</i>	0,49	aB	0,32	aB	0,80	aA	0,44	bB	0,51	
	Média	0,45		0,36		0,74		0,55		0,53	
	CV (%)	19,33									
Comprimento radicular (cm)	<i>Mj</i>	13,25		14,50		13,50		13,50		13,69	a
	<i>Mj</i> + <i>Pc</i>	13,50		13,00		13,50		12,25		13,06	b
	Média	13,38	A	13,75	A	13,50	A	12,88	A	13,38	
	CV (%)	6,20									

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. CV: Coeficiente de variação.

Os tratamentos, isolados ou em interação, não afetaram a massa fresca da parte aérea. Por outro lado, de forma semelhante ao observado para altura de plantas, aos 20 e 25 DAI, a massa seca da parte aérea foi superior nas plantas inoculadas com *M. javanica* não tratadas com o fungo e apenas neste tratamento o fator época de avaliação interferiu na massa seca, com maiores médias aos 20 e 25 DAI se comparados aos 10 e 15 DAI.

A massa fresca da raiz do tratamento *M. javanica* também foi superior ao tratamento com *P. chlamydosporia* aos 25 DAI e, conforme já constatado para os demais parâmetros, a média observada nas avaliações finais foi maior do que aos 10 e 15 DAI. Para *P. chlamydosporia*, média superior foi observada aos 20 DAI (Table 2). Apenas o fator tratamento afetou o comprimento da raiz, sendo este superior nas plantas não tratadas (Table 2).

O fungo *P. chlamydosporia* ativou as respostas de defesa da planta, tanto na parte aérea quanto nas raízes. Na parte aérea (Table 3), houve interação dos fatores para todas as enzimas, exceto para POX, que apresentou diferenças estatísticas para os fatores isolados. A atividade da POX foi superior em plantas tratadas com *P. chlamydosporia*, se

comparada aos tratamentos com *M. javanica* ou pela associação entre os dois organismos. Aos 12 e 15 DAI constatou-se a maior atividade desta enzima.

Valores superiores de PPO foram observados aos 5 e 15 DAI para o tratamento com *P. chlamydosporia*, contudo, aos 5 DAI, este não diferiu do tratamento com a associação entre os organismos (Table 3). Dentro de cada tratamento, a época de pico enzimático foi variável, sendo aos 12 DAI para *M. javanica* e para o controle, e aos 5 DAI para o tratamento com *P. chlamydosporia* e *M. javanica* + *P. chlamydosporia*.

Tabela 3. Atividade enzimática na parte aérea de plantas de soja, parasitadas por *Meloidogyne javanica* (*Mj*) e tratadas com *Pochonia chlamydosporia* (*Pc*).

Fator bioquímico	Tratamento	Dias após a inoculação					Média			
		5	8	12	15					
Peroxidase	<i>Mj</i>	0,16	1,26	3,24	3,62	2,07	b			
	<i>Mj</i> + <i>Pc</i>	0,86	2,47	2,57	3,43	2,33	b			
	<i>Pc</i>	1,77	2,83	3,54	4,43	3,14	a			
	Testemunha	1,71	1,67	3,49	3,25	2,53	ab			
	Média	1,13 C	2,06 B	3,21 A	3,68 A	2,52				
	CV (%)			23,63						
Polifenoloxidase	<i>Mj</i>	0,686	bAB	0,227	aB	0,840	bA	0,463	bAB	0,554
	<i>Mj</i> + <i>Pc</i>	1,130	abA	0,789	aAB	0,446	bB	0,685	bAB	0,763
	<i>Pc</i>	1,731	aA	0,300	aC	0,889	bBC	1,129	aAB	1,012
	Testemunha	0,888	bB	0,400	aB	1,720	aA	0,414	bB	0,856
	Média	1,109		0,429		0,974		0,673		0,796
	CV (%)			34,49						
Fenilalanina amônia-liase	<i>Mj</i>	0,003	abB	0,000	bB	0,020	cA	0,021	abA	0,011
	<i>Mj</i> + <i>Pc</i>	0,004	abC	0,024	aAB	0,033	abA	0,019	abB	0,020
	<i>Pc</i>	0,013	aB	0,003	bB	0,025	bcA	0,025	aA	0,167
	Testemunha	0,000	bC	0,005	bBC	0,040	aA	0,013	bB	0,014
	Média	0,005		0,008		0,030		0,020		0,016
	CV (%)			33,29						
Catalase	<i>Mj</i>	6,20	bAB	9,92	aA	8,79	bAB	5,59	bB	7,62
	<i>Mj</i> + <i>Pc</i>	12,62	aA	10,36	aAB	9,77	bAB	7,07	bB	9,95
	<i>Pc</i>	10,69	aA	12,57	aA	9,77	bA	13,51	aA	11,64
	Testemunha	5,96	bC	10,74	aB	15,28	aA	6,20	bC	9,55
	Média	8,86		10,90		10,90		8,09		9,69
	CV (%)			18,29						

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. CV: Coeficiente de variação.

Pochonia chlamydosporia promoveu pico enzimático para PAL 5 e 15 DAI, contudo, sem diferir dos tratamentos com *M. javanica*, bem como da aplicação associada dos organismos (Table 3). Além disso, os organismos associados promoveram máxima atividade da enzima aos 8 DAI. Avaliando as épocas dentro de cada tratamento, constatou-se picos de atividade de PAL de todos os tratamentos aos 12 e/ou 15 DAI, demonstrando que a atividade da enzima aumentou ao longo do período de avaliação.

O fungo aumentou a atividade da CAT aos 5 e 15 DAI, observando-se ainda um pico enzimático nas plantas controle aos 12 DAI. Dentro dos tratamentos, houve maior atividade da enzima aos 8 DAI em plantas inoculadas com *M. javanica*, aos 5 DAI em plantas que receberam *M. javanica* + *P. chlamydosporia* e aos 12 DAI para o controle (Table 3).

Nas raízes, houve interação entre os fatores para todas as enzimas estudadas (Table 4). De uma forma geral, as respostas aumentaram ao longo do período de avaliação. Atividade da POX foi superior nas raízes parasitadas com *M. javanica* e tratadas com *P. chlamydosporia* aos 5 e 8 DAI e em plantas apenas inoculadas com *M. javanica* aos 12 DAI. Houve pico enzimático de POX aos 12 DAI em plantas inoculadas com *M. javanica*, aos 5 e 8 DAI nas plantas que receberam os dois organismos e aos 12 DAI nas plantas tratadas com *P. chlamydosporia* e para o controle. Neste experimento não foi possível avaliar a atividade enzimática aos 15 DAI, pela falta de extrato enzimático.

Houve aumento na expressão de PPO (Table 4) para as plantas tratadas com *P. chlamydosporia* aos 15 DAI. Analisando as épocas de avaliação dentro de cada tratamento, a maior atividade também foi aos 15 DAI para *P. chlamydosporia*.

Para a PAL, maior atividade foi observada aos 5 DAI, quando comparado à testemunha e, aos 8 DAI, quando comparado às médias das plantas parasitadas com *M. javanica*. No estudo das épocas dentro de cada tratamento, observou-se diferença entre para o tratamento *M. javanica*, com pico aos 15 DAI, e para o tratamento *P. chlamydosporia*, com pico aos 5 e 12 DAI (Table 4).

Aos 8 dias após a inoculação, houve pico da atividade da catalase no tratamento com *P. chlamydosporia*. Aos 15 DAI também ocorreu aumento na expressão da CAT nas plantas tratadas com *P. chlamydosporia*, porém sem diferir da testemunha (Table 4). Quanto à época de avaliação, observou-se maior atividade aos 15 DAI no tratamento com *P. chlamydosporia* e no controle.

Tabela 4. Atividade enzimática das raízes de plantas de soja, parasitadas por *Meloidogyne javanica* (*Mj*) e tratadas com *Pochonia chlamydosporia* (*Pc*).

Fator bioquímico	Tratamento	Dias após a inoculação								
		5		8		12		15		Média
Peroxidase	<i>Mj</i>	7,52	aB	5,44	bB	14,13	aA	-	-	9,03
	<i>Mj + Pc</i>	9,44	aA	11,41	aA	6,05	cB	-	-	8,97
	<i>Pc</i>	3,43	bB	2,80	bB	6,98	bcA	-	-	4,40
	Testemunha	2,54	bB	4,76	bB	9,78	bA	-	-	5,69
	Média	5,74		6,10		9,24		-	-	7,02
	CV (%)					18,10				
Polifenol-oxidase	<i>Mj</i>	1,571	aA	1,341	aA	3,411	aA	1,449	cA	1,943
	<i>Mj + Pc</i>	1,658	aA	2,411	aA	3,628	aA	3,328	bcA	2,756
	<i>Pc</i>	1,664	aB	3,846	aB	3,429	aB	8,480	aA	4,355
	Testemunha	1,374	aA	2,060	aAB	2,842	aAB	4,920	bA	2,814
	Média	1,567		2,414		3,328		4,559		2,967
	CV (%)					44,80				
Fenilalanina amônia-liase	<i>Mj</i>	0,032	abB	0,012	bB	0,039	aB	0,099	aA	0,046
	<i>Mj + Pc</i>	0,036	abA	0,046	aA	0,043	aA	0,020	bA	0,036
	<i>Pc</i>	0,060	aA	0,052	aAB	0,061	aA	0,027	bB	0,050
	Testemunha	0,022	bA	0,025	abA	0,039	aA	0,016	bA	0,026
	Média	0,038		0,034		0,046		0,041		0,039
	CV (%)					35,90				
Catalase	<i>Mj</i>	20,32	aA	15,61	bA	22,71	aA	15,70	cA	18,58
	<i>Mj + Pc</i>	19,46	aA	15,48	bA	23,65	aA	18,54	bcA	19,28
	<i>Pc</i>	20,20	aB	32,59	aAB	20,72	aB	46,15	aA	29,92
	Testemunha	13,18	aB	17,28	abB	23,36	aAB	33,25	abA	21,77
	Média	18,29		20,24		22,61		28,41		22,39
	CV (%)					31,50				

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. CV: Coeficiente de variação.

Discussion

O tratamento com *P. chlamydosporia* reduziu a penetração de J2 de *M. javanica* nas raízes de soja e alguns fatores podem ter contribuído para isso. O primeiro, deve-se ao fato do fungo ser, caracteristicamente, um organismo quitinolítico, cuja atividade no parasitismo de ovos de nematoides das galhas foi anteriormente relatada (Dallemele et al., 2012; Yang, Liang, Li, & Zhang, 2013; Escudero, & Lopez-Llorca, 2012). Neste processo, as hifas de *P. chlamydosporia* aderem aos ovos e produzem um apressório para penetração (Lopez-Llorca et al., 2002) e, em seguida, secretam proteases que degradam a casca dos ovos (Escudero et al., 2016). Este método de ação reduz a população inicial de nematoides no solo. Por outro lado, não está elucidado se o fungo pode impedir, de forma direta, a infecção inicial dos J2 após eclodirem, mas sabe-se que isolados do fungo podem ativar os mecanismos de defesa em algumas plantas, restringindo a atividade pós

infecional do nematoide em algumas espécies vegetais (Medeiros et al., 2015; Ghahremani et al., 2019), mas não em outras (Ghahremani et al., 2019).

A hipótese de que a indução de resistência por *P. chlamydosporia* possa colaborar para o controle de *M. javanica* em soja foi confirmada, uma vez que o fungo ativou diferentes enzimas relacionadas à defesa da planta. Porém, a maior atividade enzimática foi observada na parte aérea, o que pode ser conferido a sistematicidade deste mecanismo de ação, cuja expressão pode ser temporariamente alterada (Molinari, & Baser, 2010). Desta forma, observou-se que todas as enzimas apresentaram atividade aumentada na parte aérea da planta tratada com *P. chlamydosporia*, principalmente nas avaliações realizadas aos 15 DAI.

Em geral, nos trabalhos realizados com indutores sintéticos, como ASM, a indução de resistência ocorre nos primeiros oito dias após o tratamento (Owen, Green, & Deverall, 2002; Sahebani, Hadavi, & Zade, 2011; Puerari et al., 2019). Contudo, neste estudo, o isolado de *P. chlamydosporia* utilizado foi aplicado na forma de clamidósporos, que consistem em esporos de resistência (Dallemole et al., 2012), o que permite apontar algumas hipóteses para a atividade enzimática observada mais tardiamente, incluindo o período necessário para germinação dos esporos e para estabelecimento da atividade endofítica e a possibilidade de haver necessidade de estímulos advindos dos exsudados radiculares do hospedeiro, para a germinação dos clamidósporos. Corroboram essas hipóteses, as observações de que os picos enzimáticos para POX, PAL e CAT, em plantas tratadas como *P. chlamydosporia*, ocorreram aos 12 e 15 DAI.

Na raiz, a maior atividade em plantas tratadas com *P. chlamydosporia* foi para PPO. Tal enzima está relacionada à produção de compostos tóxicos a diferentes microrganismos, por meio da catálise da hidroxilação de monofenóis a o-difenóis e pela oxidação de o-difenóis em o-quinonas (Das et al., 2010; Mishra, & Gautam, 2016), podendo atuar como o sítio nucleofílico, ligando-se a proteínas e alguns aminoácidos, tornando-os indisponíveis para alimentação de alguns organismos (War et al., 2012; Taranto et al., 2017). Além disso, a oxidação da PPO produz quinonas, que se ligam a outros compostos fenólicos e promovem o fortalecimento das paredes celulares das células vegetais (Tran, Taylor, & Constabel, 2012; Moosavi, 2017), restringindo a movimentação e a alimentação do nematoide.

Vales destacar que a POX apresentou médias nas raízes variando de 2,54 a 11,41 $\Delta_{\text{abs}} 470 \text{ nm min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína, enquanto na parte aérea, as médias variaram de 0,16 a 4,43, corroborando com observações de Puerari et al. (2019), cuja expressão enzimática

também foi superior nas raízes das plantas. Esta enzima está relacionada à catálise da oxidação de compostos fenólicos, advindos da rota dos fenilpropanoides e no processo de redução do peróxido de hidrogênio (Passardi, Longet, Penel, & Dunand, 2004), promovendo a detoxificação e o aumento de lignina na parede celular (Chaves, Pedrosa, Willadino, & Cardoso, 2016). Seu acúmulo pode estar relacionado ao estresse oxidativo ocasionado pela infecção pelo nematoide, que envolve a liberação de espécies reativas de oxigênio pela planta, para inibir a atividade do parasita no sítio de alimentação (Melillo et al., 2006; Nguyen et al., 2011). Isto explica os picos enzimáticos observados aos 5, 8 e 12 DAI em raízes de soja parasitadas por *M. javanica* e concorda com pesquisas realizadas em cana-de-açúcar infectada por *M. incognita* e tratada com piraclostribina (Chaves, Pedrosa, Willadino, & Cardoso, 2016).

Ainda nas raízes, observou pico enzimático para a PAL, em plantas tratadas com *P. chlamydosporia* aos 5 DAI, o que pode ser conferido ao papel desta enzima na catálise da primeira reação na rota dos fenilpropanoides, fazendo a conversão de L-fenilalanina em ácido cinâmico (MacDonald, & D’Cunha, 2007). Outro pico foi observado aos 15 DAI nas plantas que foram apenas inoculadas com o nematoide, possivelmente pelo processo natural de defesa da planta, que induz a lignificação da parede celular, a fim de restringir as atividades do nematoide no sítio de alimentação (Puerari et al., 2019).

A expressão de CAT nas raízes tratadas com *P. chlamydosporia* apresentou dois picos, um aos 8 e outro aos 15, sendo que este último, apesar de superior às plantas inoculadas com o nematoide, não diferiu da testemunha. Observou-se ainda que a atividade da CAT foi reduzida na presença do nematoide, o que pode ser devido à produção de compostos antioxidantes pelo nematoide, que metabolizam as espécies reativas de oxigênio (Schaffer, & Bronnikova, 2012). Estes compostos são produzidos e secretados pela hipoderme e incluem as enzimas superóxido dismutase, peroxiredoxinas e glutathione peroxidase (Jones, & Fosu-Nyarko, 2014).

Ressalta-se que, com exceção da PAL, as enzimas que apresentaram resposta significativa à época de avaliação nas raízes, geralmente tiveram a atividade aumentada com o passar do tempo, corroborando os resultados constatados para a parte aérea.

Semelhante ao que foi observado para *P. chlamydosporia*, o fenômeno de indução de resistência promovido por fungos benéficos com características endofíticas, havia sido relatado para *Trichoderma* spp. (Martinuz et al., 2015; Martínez-Medina et al., 2017). Os mecanismos responsáveis pela resistência induzida por microrganismos que se associam à planta endofiticamente precisam ser melhor elucidados (Schouten, 2016). Entretanto,

como o fungo promove atividade enzimática, especula-se que ele seja capaz de modular as vias metabólicas do ácido-salicílico e do ácido jasmônico (Schouten, 2016; Ghahremani et al., 2019).

É importante considerar a necessidade de estudos complementares a respeito da colonização de raízes de soja pelo isolado Pc-10 de *P. chlamydosporia*, visto que a interação entre cepas do fungo e raízes de plantas pode ser variável (Ghahremani et al., 2019). Contudo, mesmo que os mecanismos de defesa locais sejam insuficientes para obter uma supressão significativa dos nematoides, eles são importantes quando inseridos entre os mecanismos de ação deste fungo, por atuar nos processos de defesa pós infeccionais, dificultando o acesso ao alimento e/ou reduzindo a reprodução do parasita.

Acknowledgements

Agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de mestrado de R.P. Schwengber, de iniciação científica de A.S. Melo, de iniciação tecnológica de G. Tarini e de produtividade em pesquisa de C.R. Dias-Arieira, e à CAPES pela bolsa de pós doutorado de S.M. Santana-Gomes.

Declaration of conflicting interests

We have no conflict of interest to declare.

Authors' contributions

All authors contributed equally to the study.

References

- Avcı, G. K., Coruh, N., Bolukbasi, U., & Ogel, Z.B. (2013). Oxidation of phenolic compounds by the bifunctional catalase-phenol oxidase (CATPO) from *Scytalidium thermophilum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97, 661-672. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-3950-2>.
- Avilez, I. M., Hori, T. S. F., Almeida, L. C., Hackbarth, A., Neto, J. C. B., Bastos, V. L. F. C., & Moraes, G. (2008). Effects of phenol in antioxidant metabolism in matrinxã,

- Brycon amazonicus* (Teleostei; Characidae). *Comparative Biochemistry Physiology*, 148, 136-142. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.04.008>
- Barbosa, R. T., Monteiro, T. S. A., Coutinho, R. R., Silva, J. G., & Freitas, L. G. (2019). *Pochonia chlamydosporia* for controlling root-knot nematode in banana. *Nematropica*, 49, 99-106.
- Boneti, J. I. S., & Ferraz, S. (1981). Modificações do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* em raízes de cafeeiro. *Fitopatologia Brasileira*, 6, 553.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Byrd Jr, D. W., Kirpartrick, J., & Barker, K. R. (1983). An improved technique for clearing and staining plant tissues for detection of nematodes. *Journal of Nematology*, 15, 142-143.
- Chaves, A., Pedrosa, E. R., Willadino, L., & Cardoso, M. S. O. (2016). Activation of resistance to *Meloidogyne incognita* in sugarcane treated with pyraclostrobin. *Nematoda*, 3, 1-7. <https://doi.org/10.4322/nematoda.00516>
- Chinnasri, B., Sipes, B. S., & Schmitt, D. P. (2003). Effects of acibenzolar-s-methyl application to *Rotylenchulus reniformis* and *Meloidogyne javanica*. *Journal of Nematology*, 35, 110-114.
- Dallemole-Giaretta, R., Freitas, L. G., Lopes, E. A., Pereira, O. I., Zooca, R. J. F., & Ferraz, S. (2012). Screening of *Pochonia chlamydosporia* brazilian isolates as biocontrol agents of *Meloidogyne javanica*. *Crop Protection*, 42, 102-107. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2012.06.002>
- Das, S. C., Balamohan, T. N., Poornima, K., Seenivasan, N., Bergh, V. D., & De Waele, D. (2010). Reaction of *Musa* hybrids to the burrowing nematode, *Radopholus similis*. *Indian Journal of Nematology*, 40, 189-197.
- Duangmal, K., & Apenten, R. K. O. (1999). A comparative study of polyphenoloxidases from taro (*Colocasia esculenta*) e potato (*Solanum tuberosum* var. Romano). *Food Chemistry*, 64, 351-359. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00127-7](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00127-7)
- Escudero, N., & Lopez-Llorca, L. V. (2012). Effects on plant growth and root-knot nematode infection of an endophytic GFP transformant of the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia*. *Symbiosis*, 57, 33-42. <https://doi.org/10.1007/s13199-012-0173-3>

- Escudero, N., Ferreira, S. R., Lopez-Moya, F., Naranjo-Ortiz, M. A., Marin-Ortiz, A. I., Thornton, C. R., & Lopez-Llorca, L. V. (2016). Chitosan enhances parasitism of *Meloidogyne javanica* eggs by the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia*. *Fungal Biology*, *120*, 572-585. [https://doi: 10.1016/j.funbio.2015.12.005](https://doi.org/10.1016/j.funbio.2015.12.005)
- Ferreira, D. F. (2011). Sisvar: A computer statistical analysis system. *Ciência & Agrotecnologia*, *35*, 1039-1042. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542011000600001>
- Ghahremani, Z., Escudero, N., Saus, E., Gabaldón, T., & Sorribas, F. J. (2019). *Pochonia chlamydosporia* induces plant-dependent systemic resistance to *Meloidogyne incognita*. *Frontiers in Plant Science*, *10*, 945. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00945>
- Henry, G., Thonart, P., & Ongena, M. (2012). PAMPs, MAMPs, DAMPs and others: an update on the diversity of plant immunity elicitors. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, *16*, 257-268.
- Jones, M. G. K., & Fosu-Nyarko, J. (2014). Molecular biology of root lesion nematodes (*Pratylenchus* spp.) and their interaction with host plants. *Annals of Applied Biology*, *164*, 163-181. <https://doi.org/10.1111/aab.12105>
- Lopez-Llorca, L. V., Olivares-Bernabeu, C., Salinas, J., Jansson, H. B., & Kolattukudy, P. E. (2002). Pre-penetration events in fungal parasitism of nematode eggs. *Mycology Research*, *106*, 499-506. <https://doi.org/10.1017/S0953756202005798>
- Lusso, M. F. G., & Pascholati, S. F. (1999). Activity and isoenzymatic pattern of soluble peroxidases in maize tissues after mechanical injury or fungal inoculation. *Summa Phytopathologica*, *25*, 244-249.
- MacDonald, M. J., & D’Cunha, G. (2007). A modern view of phenylalanine ammonia lyase. *Biochemistry and Cell Biology*, *85*, 273-282. <https://doi.org/10.1139/O07-018>
- Martínez-Medina, A., Fernandez, I., Lok, G. B., Pozo, M. J., Pieterse, C. M. J., & Van Wees, S. C. M. (2017). Shifting from priming of salicylic acid- to jasmonic acid-regulated defences by *Trichoderma* protects tomato against the root knot nematode *Meloidogyne incognita*. *New Phytologist*, *213*, 363-377. <https://doi.org/10.1111/nph.14251>
- Martinuz, A., Zewdu, G., Ludwig, N., Grundler, F., Sikora, R. A., & Schouten, A. (2015). The application of *Arabidopsis thaliana* in studying tripartite interactions among plants, beneficial fungal endophytes and biotrophic plant-parasitic nematodes. *Planta*, *241*, 1015-1025. doi: 10.1007/s00425-014-2237-5.

- Medeiros, H. A., Resende, R. S., Ferreira, F. C., Freitas, L. G., & Rodrigues, F. A. (2015). Induction of resistance in tomato against *Meloidogyne javanica* by *Pochonia chlamydosporia*. *Nematoda*, 2, 11. <https://doi.org/10.4322/nematoda.10015>
- Melillo, M. T., Leonetti, P., Bongiovanni, M., Castagnone-Sereno, P., & Bleve-Zacheo, T. (2006). Modulation of reactive oxygen species activities and H₂O₂ accumulation during compatible and incompatible tomato-root-knot nematode interactions. *New Phytologist*, 170, 501-512. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01724.x>
- Mishra, B. B., & Gautam, S. (2016). Polyphenol oxidases: biochemical and molecular characterization, distribution, role and its control. *Enzyme Engineering*, 5, 1-9. doi.org/10.4172/2329-6674.1000141
- Molinari, S., & Baser, N. (2010). Induction of resistance to root-knot nematodes by SAR elicitors in tomato. *Crop Protection*, 29, 1354-1362. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2010.07.012>
- Moosavi, M. R. (2017). The effect of gibberellin and abscisic acid on plant defense responses and on disease severity caused by *Meloidogyne javanica* on tomato plants. *Journal of General Plant Pathology*, 83, 173-184. <https://doi.org/10.1007/s10327-017-0708-9>
- Nakazawa, A., Nozue, M., Yasuda, H., Takeda, G., & Kubo, H. (2001). Expression pattern and gene structure of phenylalanine ammonia-lyase in *Pharbitis nil*. *Journal of Plant Research*, 114, 323-328. <https://doi.org/10.1007/PL00013994>
- Nguyen, D. M. C., Seo, D. J., Park, R. D., Lee, B. R., & Jung, W. J. (2011). Changes in antioxidative enzyme activities in cucumber plants with regard to biological control of root-knot. *Journal Korean Society Applied Biology and Chemistry*, 54, 507-514.
- Nikoo, F. S., Sahebani, N., Aminian, H., Mokhtarnejad, L., & Ghaderi, R. (2014). Induction of systemic resistance and defense-related enzymes in tomato plants using *Pseudomonas fluorescens* CHAO and salicylic acid against root-knot nematode *Meloidogyne javanica*. *Journal of Plant Protection Research*, 54, 383-389. <https://doi.org/10.2478/jppr-2014-0057>
- Owen, K. J., Green, C. D., & Deverall, B. J. (2002). A benzothiadiazole applied to foliage reduces development and egg deposition by *Meloidogyne* spp. in glasshouse-grown grapevine roots. *Australian Plant Pathology*, 31, 47-53. <https://doi.org/10.1071/AP01068>

- Passardi, F., Longet, D., Penel, C., & Dunand, C. (2004). The class III peroxidase multigenic family in rice and its evolution in land plants. *Phytochemistry*, *65*, 1879-1893. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.06.023>
- Puerari, H. H., Dias-Arieira, C. R., Dadazio, T. S., Mattei, D., Silva, T. R. B., & Ribeiro, R. C. F. (2013). Evaluation of acibenzolar-S-methyl for the control of *Meloidogyne javanica* and effects on the development of susceptible and resistant soybean. *Tropical Plant Pathology*, *38*, 44-48. <https://doi.org/10.1590/S1982-56762013000100006>
- Puerari, H. H., Miamoto, A., Jardimetti, V. A., Schwan-Estrada, K. R. F., & Dias-Arieira, C. R. (2019). Enzymatic activity induced by acibenzolar-S-methyl for control of *Pratylenchus brachyurus* in maize. *Journal of Plant Physiology and Pathology*, *7*, 3. <https://www.scitechnol.com/download.php?download=peer-review-pdfs/enzymatic-activity-induced-by-acibenzolarmethyl-for-control-of-pratylenchus-brachyurus-in-maize-ypHb.pdf>
- Raj, S. N., Lavanya, S. N., Amruthesh, K. N., Niranjana, S. R., Reddy, M. S., & Shetty, H. S. (2012). Histo-chemical changes induced by PGPR during induction of resistance in pearl millet against downy mildew disease. *Biological Control*, *6*, 90102. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2011.10.011>
- Sahebani, N., Hadavi, N. S., & Zade, F. O. (2011). The effects of b-amino-butyric acid on resistance of cucumber against root-knot nematode, *Meloidogyne javanica*. *Acta Physiologica Plantarum*, *33*, 443-450. <https://doi.org/10.1007/s11738-010-0564-0>
- Schouten, A. (2016). Mechanisms involved in nematode control by endophytic fungi. *Annual Review of Phytopathology*, *54*, 121-142. doi.org/10.1146/annurev-phyto-080615-100114
- Taranto, F., Pasqualone, A., Mangini, G., Tripodi, P., Miazzi, M. M., Pavan, S., & Montemurro, C. (2017). Polyphenol oxidases in crops: biochemical, physiological and genetic aspects. *International Journal of Molecular Science*, *18*, 1-16. <https://doi.org/10.3390/ijms18020377>
- Thakur, M., & Sohal, B. S. (2013). Role of elicitors in inducing resistance in plants against pathogen infection: A review. *ISRN Biochemistry*, *2013*, 1-10. <https://doi.org/10.1155/2013/762412>
- Tománková, K. L., Luhová, L., Petřivalský, M., Peč, P., & Lebeda, A. (2006). Biochemical aspects of reactive oxygen species formation in the interaction between *Lycopersicon* spp. and *Oidium neolycopersici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, *68*, 22-32. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2006.05.005>

- Tran, L. T., Taylor, J. S., & Constabel, C. P. (2012). The polyphenol oxidase gene family in land plants: Lineage-specific duplication and expansion. *BMC Genomics*, *13*, 1. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-395>
- Umesha, S. (2006). Phenylalanine ammonia lyase activity in tomato seedlings and its relationship to bacterial canker disease resistance. *Phytoparasitica*, *34*, 68-71. <https://doi.org/10.1007/BF02981341>
- Vasyukova, N. I., Pridvorova, S. M., Gerasimova, N. G., Chalenko, G. I., Ozeretskoyanskaya, O. L., Udalova, Zh. V., & Zinov'eva, S. V. (2007). The involvement of phenylalanine ammonia-lyase and salicylic acid in the induction of resistance of tomato plants infested with gall nematode *Meloidogyne incognita*. *Doklady Biological Science*, *416*, 382-385. <https://doi.org/10.1134/S0012496607050171>
- War, A. R., Paulraj, M. G., Ahmad, T., Buhroo, A. A., Hussain, B., Ignacimuthu, S., & Sharma, H. C. (2012). Mechanisms of plant defense against insect herbivores. *Plant Signaling Behavior*, *7*, 1306-1320. <https://doi.org/10.4161/psb.21663>
- Yang, J., Liang, L., Li, J., & Zhang, K. Q. (2013). Nematicidal enzymes from microorganisms and their applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *97*, 70817095. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5045-0>
- Zhu, Q. H., Stephen, S., Kazan, K., Jin, G., Fan, L., Taylor, J., Dennis, E. S., Helliwell, C. A., & Wang, M. B. (2013). Characterization of the defense transcriptome responsive to *Fusarium oxysporum*-infection in *Arabidopsis* using RNA-seq. *Gene*, *512*, 259-266. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.10.036>

Artigo apresentado nas normas da revista: Acta Agriculturae Scandinavica – Section B

CAPÍTULO II

Pochonia chlamydosporia* na atividade microbiana do solo e acúmulo de macro e micronutrientes em soja parasitada por *Meloidogyne javanica

Resumo

O parasitismo por *Meloidogyne javanica* (*Mj*) induz a formar sítios de alimentação específicos, que ocasionam a redução na absorção de nutrientes essenciais para o vegetal. Alguns agentes de controle biológico podem minimizar esses danos, como *Pochonia chlamydosporia* (*Pc*) e há a hipótese de que esse fungo auxilia na absorção de nutriente e na atividade microbiológica do solo, reduzindo o impacto negativo dos nematoides. Assim, objetivou-se avaliar a influência de *Pc* na reprodução do nematoide, na atividade respiratória do solo e no acúmulo de macro e micronutrientes na parte aérea de soja. Para isso, foram avaliados, em casa-de-vegetação, os tratamentos plantas não inoculadas e não tratadas (testemunha); plantas inoculadas e não tratadas (*Mj*), planta não inoculadas e tratadas (*Pc*) e plantas inoculadas e tratadas (*Mj* + *Pc*). O inóculo consistiu de 2000 ovos e juvenis (J2) de *M. javanica* e o tratamento foi com *Pc* ($5,2 \times 10^7$ clamidósporo g^{-1} de produto), na dose de 2,5 kg de produto comercial ha^{-1} , ou água (testemunha). Após 60 dias da semeadura, observou-se que o tratamento com *Pc* reduziu a reprodução de *Mj* em 40,3% e promoveu aumento na altura de planta quando associado ao nematoide. Maior respiração basal do solo foi observada para o tratamento com *Pc*, e o carbono da biomassa microbiana foi superior no tratamento *Mj*, seguido do tratamento *Pc*. A interação entre os organismos promoveu aumento no quociente metabólico do solo. *Pochonia chlamydosporia* promoveu maior absorção de fósforo e potássio, enquanto o teor de zinco foi superior no tratamento com o nematoide.

Palavras-chave: Controle alternativo; fungo nematófago; nutrição de planta; atividade respiratória

Pochonia chlamydosporia* in soil microbial activity and accumulation of macro and micronutrients in soybean parasitized by *Meloidogyne javanica

Abstract

Parasitism by *Meloidogyne javanica* (*Mj*) induces the formation of specific feeding sites, which cause a reduction in the absorption of essential nutrients for the plant. Some biological control agents can minimize these damages, such as *Pochonia chlamydosporia* (*Pc*) and there is the hypothesis that this fungus helps in nutrient absorption and the microbiological activity of the soil, reducing the negative impact of nematodes. Thus, the objective was to evaluate the influence of *Pc* in the reproduction of the nematode, in the respiratory activity of the soil and the accumulation of macro and micronutrients in the aerial part of soybean. For this, the treatments were evaluated in a greenhouse, the treatments not inoculated and not treated (witness); inoculated and untreated plants (*Mj*), uninoculated and treated plants (*Pc*) and inoculated and treated plants (*Mj + Pc*). The inoculum consisted of 2000 eggs and juveniles (J2) of *M. javanica* and the treatment was with *Pc* (5.2×10^7 chlamydospore g⁻¹ product), in the dose of 2.5 kg of commercial product ha⁻¹, or water (witness). After 60 days of sowing, it was observed that the treatment with *Pc* reduced the reproduction of *Mj* by 40.3% and promoted an increase in plant height when associated with the nematode. Greater basal soil respiration was observed for the treatment with *Pc*, and the carbon of the microbial biomass was higher in the *Mj* treatment, followed by the *Pc* treatment. The interaction between the organisms promoted an increase in the soil metabolic quotient. *Pochonia chlamydosporia* promoted greater absorption of phosphorus and potassium, while the zinc content was higher in the treatment with the nematode.

Keywords: Alternative control; nematophagous fungus; plant nutrition; respiratory activity

Introdução

Nematoides do gênero *Meloidogyne*, comumente denominados de nematoides das galhas, são parasitas obrigatórios que se alimentam das raízes das plantas e, no processo parasitário, induzem a formação de sítios de alimentação específicos (Mahapatra & Nayak 2019), que consistem em células nutritoras, caracterizadas por citoplasma denso e granular, aumento no número de organelas e parede celular invaginada com vários núcleos conspícuos (Favery et al. 2016; Mahapatra & Nayak 2019). O parasitismo induz ainda a hiperplasia e hipertrofia das células, que culminam na formação de galhas (Favery et al. 2016).

Os sítios de alimentação das fêmeas de *Meloidogyne* são formados no xilema da planta hospedeira, ou próximos a ele, ocasionando danos a este tecido (Kyndt et al. 2013) e comprometendo a absorção de água e nutrientes essenciais pelo hospedeiro (Palomares-Rius et al. 2017). Na parte aérea das plantas infectadas, observam-se sintomas como amarelecimento de folhas, descoloração de caules e ramos, desfolha, redução do tamanho das plantas e menor produção, sendo estes considerados como reflexo do mau funcionamento do sistema radicular (Favery et al. 2016).

Para reduzir os danos iniciais causados nas raízes, deve-se optar por práticas de controle que reduzam a penetração do nematoide no sistema radicular do hospedeiro, sendo o controle biológico uma das atividades que mais se destaca para este fim (Zouhar et al. 2013; Manzanilla-Lopez et al. 2013; Hussain et al. 2017). Contudo, outras formas de manejo que influenciam na nutrição e crescimento das plantas, decomposição de matéria orgânica do solo, solubilização de minerais e liberação de compostos quelantes, podem fazer com que o sistema radicular da planta se desenvolva melhor, mesmo na presença de nematoides (Manzanilla-Lopez et al. 2013), melhorando a eficiência na absorção de nutrientes (Altomare & Tringovska 2011). Neste contexto, organismos endofíticos parecem ser os mais promissores (Singh et al. 2012), sendo os fungos do gênero *Trichoderma* e as bactérias do gênero *Bacillus* os mais estudados (Mukhtar 2018; Albahadli et al. 2019; Messa et al. 2019).

Outro fungo endofítico que apresenta resultados promissores para o controle de nematoides é a *Pochonia chlamydosporia*, que se caracteriza como um saprófita de solo, capaz de parasitar ovos e fêmeas sedentárias (Dallemole-Giaretta et al. 2012), cuja eficiência foi comprovada contra diferentes espécies de nematoides das galhas, incluindo o controle de *M. enterolobii*, *M. javanica* e *M. incognita* (Dallemole-Giaretta et al. 2012; Medeiros et al. 2015; Silva et al. 2017; Ghahremani et al. 2019). Contudo, a ação deste

fungo parece ir além do parasitismo direto, havendo relatos do potencial para indução de resistência (Larriba et al. 2015; Medeiros et al. 2015; Zavala-Gonzalez et al. 2017) e competição da rizosfera (Escudero & Lopez-Lorca 2012; Zavala-Gonzalez et al., 2015). Como o fungo é um bom colonizador da rizosfera (Zavala-Gonzalez et al., 2015), acredita-se que ele possa melhorar a atividade microbiana do solo. Além disso, há a hipótese de que o fungo possa colaborar com a absorção de nutrientes, no entanto, pesquisas com este objetivo ainda são limitadas.

Baseado no exposto, objetivou-se avaliar a reprodução do nematoide, o desenvolvimento vegetativo da planta, a atividade respiratória do solo, e os teores de macro e micronutrientes presentes nas folhas de soja parasitadas com *M. javanica*, quando tratadas com *P. chlamydosporia*.

Material e Métodos

Inóculo de *Meloidogyne javanica* e *Pochonia chlamydosporia*

O inóculo de *M. javanica* foi obtido de uma população pura, multiplicada em tomateiro em casa-de-vegetação, sob coordenadas geográficas 23°47'34,5'' S e 53°15'22,1'' W. Os nematoides foram extraídos das raízes das plantas de acordo com a metodologia proposta por Hussey & Barker (1973) modificada por Boneti & Ferraz (1981). A suspensão foi calibrada para 2000 ovos e eventuais juvenis de segundo estágio (J2) ml⁻¹, em câmara de Peters, sob microscópio óptico.

O isolado de *P. chlamydosporia* utilizado na pesquisa foi o Pc-10 (Rizotec[®], Stoller 5,2 x 10⁷ clamidósporo g⁻¹ de produto), na dose recomendada pelo fabricante (2,5 kg de produto comercial ha⁻¹). (Rizoflora Biotecnologia S/A, 2019). O produto foi aplicado via sulco de semeadura, em um volume de calda equivalente a 50 L ha⁻¹.

Pochonia chlamydosporia na reprodução de *Meloidogyne javanica* e desenvolvimento vegetativo da soja

O experimento de reprodução de *M. javanica* foi realizado em casa-de-vegetação com temperaturas variando de 19,8 a 31 °C. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro tratamentos e cinco repetições. Os tratamentos corresponderam a plantas não inoculadas com *M. javanica* e não tratadas com *P. chlamydosporia* (testemunha), plantas não inoculadas e tratadas com o fungo (*Pc*),

plantas inoculadas com *M. javanica* e não tratadas com *P. chlamydosporia* (*Mj*), plantas inoculadas e tratadas com *P. chlamydosporia* (*Mj + Pc*).

As unidades experimentais foram compostas por recipientes contendo 500 ml de uma mistura de solo (Latosolo Vermelho Distrófico) e areia, na proporção de 1:1 (v:v), previamente autoclavada a 121 °C por duas horas. Em cada unidade experimental foi aplicado 0,7 g de calcário e 0,12 g de fertilizante N-P-K na formulação 04-14-08, conforme análise química. No solo, foi aberto um sulco de 5 cm de diâmetro e 4 cm de profundidade, onde foi realizado a deposição de 1 ml da suspensão de nematoide contendo 2000 ovos e eventuais juvenis, seguido da aplicação da *P. chlamydosporia* na dose e calda já mencionados e, por fim, semeou-se uma semente de soja cv. M6410 IPRO.

Após 60 dias da inoculação, as plantas foram coletadas, separando raiz de parte aérea. As raízes, depois de lavadas e pesadas, foram submetidas ao processo de extração de nematoide já mencionado. O número de nematoide foi determinado em câmara de Peters sob microscópio de luz. Este foi dividido pela massa da raiz, obtendo-se o parâmetro nematoide por grama de raiz. Avaliou-se o fator de reprodução (RF), pela fórmula: $RF = Pf/Pi$, sendo Pf a população final e Pi a população inicial (Oostenbrink 1966).

Além disto, avaliou-se o comprimento de raiz, altura de plantas e massa fresca de parte aérea. Este material fresco foi lavado em água deionizada e seco em estufa de circulação forçada de ar, à temperatura de 60 °C por 72 horas, quando atingiu massa constante. Em seguida, determinou-se a massa seca da parte aérea e o material foi mantido em local seco, para posterior análise de nutrientes.

Atividade respiratória do solo

O solo obtido de cada unidade experimental do experimento anterior, foi coletado para avaliar a atividade respiratória. Inicialmente, determinou-se a umidade do solo, retirando-se uma porção de solo úmido com massa conhecida, secado em estufa a 105 °C por 24 horas ou até a obtenção de massa constante. Com base na diferença entre massa fresca e seca do solo, obteve-se o percentual de umidade, utilizado nos cálculos.

Avaliou-se a respiração basal do solo (RBS) pelo método proposto por Jenkinson & Powlson (1976). Para isso, foi pesada 30 g de amostra de solo e acondicionada em frasco de vidro de 100 ml. Em um novo frasco (100 ml) foi adicionado 10 ml de hidróxido de sódio (NaOH) 1 M, para a captação do CO₂ liberado da amostra de solo. Ambos os frascos foram transferidos para um recipiente de vidro (500 ml) hermeticamente fechado,

para que não houvesse entrada nem fuga de CO₂. Foram também preparados recipientes (500 ml) contendo apenas o frasco de NaOH 1 M, denominada de solução controle (branco). Todas as amostras e a solução controle foram incubadas por sete dias no escuro, à temperatura ambiente de 25 a 28 °C.

Após a incubação, os recipientes com NaOH foram retirados dos frascos e receberam 2 ml de cloreto de bário (BaCl₂) a 10% e 3 gotas de fenolftaleína em solução alcoólica a 3%. A solução da amostra foi titulada utilizando ácido clorídrico (HCl) 0,5 M, até a solução apresentar alteração na coloração, de rosa para incolor. A concentração de CO₂ absorvido pela solução de NaOH foi calculada segundo a equação:

$$\text{RBS (mg de C-CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ solo hora}^{-1}) = ((v_b - v_a) \cdot M \cdot 6 \cdot 1000) \text{ Ps}^{-1} \text{ T}^{-1}$$

Sendo, RBS o carbono oriundo da respiração basal do solo; v_b (ml) o volume de ácido clorídrico gasto na solução controle (branco); v_a (ml) o volume gasto na titulação da amostra; M a molaridade do HCl; Ps (g) a massa de solo seco e T o tempo de incubação da amostra em horas.

Outro parâmetro analisado foi o carbono da biomassa microbiana do solo (CBM), determinado pelo método fumigação-extração (Vance et al. 1987; Tate et al. 1988). Para tanto, coletou-se 20 g de solo de cada unidade experimental, acondicionando-os em dois frascos de vidro de 100 ml, com 10 g de solo cada, sendo que o solo de um dos frascos foi fumigado e o outro não.

Para as amostras submetidas à fumigação, cada frasco recebeu 1 ml de clorofórmio isento de etanol, sendo, posteriormente fechado e armazenado no escuro por 24 horas, em temperatura de 25 a 28 °C. Decorrido esse período, as tampas foram retiradas em capela de exaustão, deixando evaporar todo clorofórmio (Brookes et al. 1982; Witt et al. 2000). Para as amostras não-fumigadas, adicionou-se apenas 10 g de solo aos frascos.

A extração do carbono se deu nas amostras fumigadas e não-fumigadas, adicionando 50 ml de solução de sulfato de potássio (K₂SO₄) 0,5 M. As amostras foram agitadas por 30 minutos em agitador orbital a 220 rpm e, em seguida, deixadas em repouso por 30 minutos. Por fim, filtrou-se o sobrenadante obtendo um extrato. Deste, utilizou-se 8 ml, o qual foi transferido para um erlenmeyer de 250 ml, sendo acrescentados mais 2 ml de solução de dicromato de potássio (K₂Cr₂O₇) 0,066 M, 10 ml de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 95 a 98% e 5 ml de ácido orto-fosfórico (H₃PO₄) 85%.

Após o esfriamento da solução, adicionou 70 ml de água deionizada, aguardou seu esfriamento novamente, acrescentando, na sequência, 4 gotas de difenilamida a 1% ((C₆H₅)₂NH). Procedeu a titulação com solução de sulfato ferroso amoniacal [(NH₂)₂

Fe(SO₄)₂ 6H₂O] 0,033 M, até a solução alterar a coloração púrpura para verde. O CBM nos extratos foi calculado pela seguinte equação:

$$C \text{ (mg C kg}^{-1} \text{ solo)} = \frac{(V_b - V_a) \cdot M \cdot 0,003 \cdot V_1 \cdot 10^6}{P_s \cdot V_2} =$$

Sendo: C o carbono extraído do solo; V_b (ml) o volume de sulfato ferroso amoniacal gasto na titulação da solução controle (branco); V_a (ml) o volume de sulfato ferroso amoniacal gasto na titulação da amostra; M a molaridade do sulfato ferroso amoniacal; V₁ o volume do extrator sulfato de potássio utilizado; V₂ a alíquota pipetada do extrato para titulação; 0,0033 é o miliequivalente do carbono; P_s (g) a massa do solo seco e K_c = 0,4, fator de correção adotado por Kaschuk et al. (2010).

Determinou-se também o quociente metabólico do solo (qCO₂), que consiste na razão entre a respiração basal do solo por unidade de carbono da biomassa microbiana do solo (Silva et al. 2007), podendo ser utilizado como possível indicador de estresse, quando a biomassa microbiana é afetada. A determinação do quociente foi obtida pela fórmula:

$$qCO_2 \text{ (mg C - CO}_2 \cdot \text{g}^{-1} \text{BMS - C} \cdot \text{h}^{-1}) = \frac{\text{RBS (mg C - CO}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \text{ solo} \cdot \text{h}^{-1})}{\text{BMS - C (mg C} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ solo)}} \times 1000$$

Sendo: qCO₂ o quociente metabólico do solo; RBS a respiração basal do solo e BMS-C o carbono da biomassa microbiana do solo.

Acúmulo de macro e micronutrientes na parte aérea das plantas

As folhas secas de cada amostra (unidade experimental) foram trituradas em moinho de facas tipo Willey, passando em peneira de 20 e 40 mesh, para obtenção das amostras em pó. As amostras foram acondicionadas em sacos de plásticos, hermeticamente fechados. De cada amostra moída, foram retiradas alíquotas de 500 mg para determinação dos macronutrientes (fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca) e magnésio (Mg)) e dos micronutrientes (zinco (Zn), cobre (Cu), ferro (Fe) e manganês (Mn)). Para análise de nitrogênio (N), coletou-se 100 mg. As análises dos nutrientes foram realizadas no Laboratório de Análise de Solos da Universidade Estadual de Maringá, utilizando as metodologias propostas por Malavolta et al. (1997), para determinação dos teores foliares de macro e micronutrientes.

O teor de nitrogênio (N) nas amostras foi determinado pelo método semi-micro-Kjeldahl, utilizando, de cada amostra moída, uma alíquota de 100 mg, transferindo-as para tubos de digestão. Os tubos foram colocados no bloco digestor de aquecimento,

sendo adicionado 6 ml da solução digestora em cada tubo até atingir 450 °C, aproximadamente. A digestão foi finalizada quando as amostras atingiram coloração clara, em um tempo aproximado de 10 horas. Em seguida, as amostras digeridas foram destiladas em destilador de N (Tecnal[®]), com solução indicadora de ácido bórico, até ocorrer a alteração de cor rosa para verde. Por fim, as amostras destiladas foram tituladas com ácido sulfúrico (H₂SO₄) até atingir o ponto de viragem, alteração da cor verde para rosa.

A determinação do teor de N foi obtida pela fórmula:

$$N (\%) = \frac{Vg. 0,02.14. Fc. 100}{1000. ma}$$

Sendo: Vg o volume gasto de H₂SO₄; 0,02 a molaridade do H₂SO₄; Fc o fator de correção do H₂SO₄ (1,675) e ma a massa da amostra. O teor de N foi obtido em % e transformado para g kg⁻¹.

Para os demais elementos, as amostras secas e moídas (500 mg) foram transferidas para tubos de digestão e levadas para bloco digestor de aquecimento, usando solução digestora nítrico-perclórica até atingir 450 °C, aproximadamente. Depois, cada amostra (2 ml) foi transferida para um balão volumétrico, completando o volume de 50 ml com água deionizada. Essas diluições foram utilizadas para a realização da leitura, conforme Malavolta et al. (1997), por meio do sistema 4200 MP-AES, da Agilent Technologies[®]. A quantidade de macronutrientes foi expressa em g kg⁻¹, enquanto os micronutrientes em mg kg⁻¹.

Análise estatística

Os dados obtidos em cada experimento foram submetidos à análise de variância a 5% de probabilidade e, quando significativo, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância, utilizando o programa estatístico Sisvar (Ferreira 2011).

Resultados

Pochonia chlamydosporia na reprodução de *Meloidogyne javanica* e desenvolvimento vegetativo da soja

A população total de nematoides e o fator de reprodução foram influenciados pelo tratamento com o fungo *P. chlamydosporia*, o qual promoveu redução de aproximadamente 40,3% na reprodução de *M. javanica* (Tabela 1).

Tabela 1 - População de *Meloidogyne javanica* (*Mj*) em plantas de soja cv. M6410 IPRO tratadas ou não com *Pochonia chlamydosporia* (*Pc*).

Tratamentos	Nematoides g ⁻¹ de raiz	Nematoide total	Fator de reprodução
<i>M. javanica</i>	6634 ^{ns}	22903 a	11,47 a
<i>M. javanica</i> + <i>P. chlamydosporia</i>	4661	13677 b	6,83 b
CV (%)	45,20	24,95	21,72

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. ns = não significativo. CV= coeficiente de variação.

As plantas sob o tratamento *M. javanica* + *P. chlamydosporia* apresentaram média de altura de plantas superior à testemunha (*Mj*), mas não diferiram estatisticamente entre si (Tabela 2). A massa fresca de raiz foi superior nas plantas inoculadas com *M. javanica* e os demais parâmetros vegetativos estudados não foram afetados pela presença do nematoide ou do fungo.

Tabela 2 - Altura, massa fresca (MFPA) e seca (MSPA) de parte aérea, massa fresca de raiz (MF raiz) e comprimento de raiz (Comp. raiz) de soja M6410 IPRO parasitadas ou não por *Meloidogyne javanica* (*Mj*) e tratadas ou não com *Pochonia chlamydosporia* (*Pc*).

Tratamentos	Altura (cm)	MFPA (g)	MSPA (g)	MF raiz (g)	Comp. raiz (cm)
<i>M. javanica</i> (<i>Mj</i>)	28,0ab	80,9 ^{ns}	21,1 ^{ns}	56,0 a	20,8 ^{ns}
<i>Mj</i> + <i>P. chlamydooria</i>	34,4 a	82,7	26,5	35,9 b	18,6
<i>P. chlamydosporia</i>	28,2ab	101,2	26,3	27,3 b	19,2
Testemunha	24,7 b	74,9	21,1	33,6 b	20,8
CV (%)	15,12	27,33	16,12	24,42	36,01

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. ns= não significativo. CV= coeficiente de variação

Atividade respiratória do solo

Maior carbono da biomassa microbiana foi evidenciado no solo em que havia apenas a presença do nematoide, seguido do tratamento com *P. chlamydosporia* (Tabela 3). A presença do nematoide isoladamente reduziu a respiração basal, se comparado aos demais tratamentos, os quais não diferiram entre si ou da testemunha.

Tabela 3 - Atividade respiratória do solo cultivado com plantas de soja cv. M6410 IPRO, parasitadas por *Meloidogyne javanica* (*Mj*) e tratadas ou não com *Pochonia chlamydosporia* (*Pc*).

Tratamentos	CBM (mg C kg ⁻¹ solo)	RBS (mg de C- CO ₂ kg ⁻¹ solo h ⁻¹)	qCO ₂ (mg C-CO ₂ g ⁻¹ BMS-C h ⁻¹)
<i>M. javanica</i> (<i>Mj</i>)	3665,84 a	0,29 b	0,08 b
<i>Mj</i> + <i>P. chlamydosporia</i>	166,62 c	0,61 a	4,46 a
<i>P. chlamydosporia</i>	2381,41 b	0,51 a	0,21 b
Testemunha	685,03 c	0,59 a	0,87 b
CV (%)	23,98	16,58	84,09

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância; CBM: Carbono da biomassa microbiana; RBS: respiração basal; qCO₂: quociente metabólico do solo; CV: coeficiente de variação.

Maior quociente metabólico do solo foi constatado na presença de ambos os organismos, ou seja, nematoide e fungo (Tabela 3).

Acúmulo de macro e micronutrientes na parte aérea das plantas

Dentre os macronutrientes avaliados em parte aérea, apenas os teores de fósforo (P) e potássio (K) apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos e foi possível observar maiores médias para ambos os nutrientes no tratamento que recebeu *P. chlamydosporia* aplicada isoladamente (Tabela 4), especialmente se comparados aos tratamentos com plantas inoculadas com o nematoide e não tratadas com o agente de controle biológico. Tal aumento foi de, aproximadamente, 46% no teor de fósforo e 69% no teor de potássio. Ressalta-se ainda que, o tratamento com *P. chlamydosporia* não diferiu daquele com *M. javanica* + *P. chlamydosporia*.

Tabela 4 - Macro e micronutrientes em parte aérea de plantas de soja cv. M6410 IPRO, parasitadas ou não por *Meloidogyne javanica* (Mj) e tratadas ou não com *Pochonia chlamydosporia* (Pc).

Tratamentos	Macronutrientes (g kg ⁻¹)				
	N	P	K	Ca	Mg
<i>M. javanica</i> (Mj)	0,37 ^{ns}	2,14 b	9,96 b	12,76 ^{ns}	5,50 ^{ns}
Mj + <i>P. chlamydosporia</i>	0,42	2,46 ab	13,44 ab	14,14	6,24
<i>P. chlamydosporia</i>	0,37	3,13 a	16,84 a	13,43	6,66
Testemunha	0,45	2,71 ab	11,62 b	12,42	6,52
CV (%)	23,16	27,44	20,83	11,81	13,97

Tratamentos	Micronutrientes (mg kg ⁻¹)			
	Cu	Fe	Mn	Zn
<i>M. javanica</i> (Mj)	2,61 ^{ns}	37,41 ^{ns}	90,79 ^{ns}	6,05 a
Mj + <i>P. chlamydosporia</i>	1,41	47,32	80,63	4,43 b
<i>P. chlamydosporia</i>	1,53	48,91	83,01	5,57 ab
Testemunha	1,58	44,19	90,42	5,02 ab
CV (%)	67,78	26,10	23,01	20,41

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. ns = não significativo. CV = coeficiente de variação.

Para os micronutrientes, houve diferença significativa apenas para o zinco, cuja média foi superior no tratamento com *M. javanica*, se comparada com *M. javanica* + *P. chlamydosporia* (Tabela 4), não diferindo dos demais tratamentos.

Discussão

O fungo *P. chlamydosporia* foi eficiente em controlar a reprodução de *M. javanica* em soja, corroborando com outros trabalhos realizados anteriormente (Escudero & Lopez-Llorca 2012; Manzanilla-López et al. 2013; Medeiros et al. 2015; Ghahremin et al. 2019). *Pochonia chlamydosporia* é um fungo quitinolítico (Dallemolle et al. 2012), que age principalmente pela predação de ovos de nematoides (Ghahremin et al. 2019). O fato dos nematoides das galhas depositarem os ovos agrupados em uma matriz gelatinosa, possibilita a maior eficiência deste mecanismo de ação, visto que a colonização da massa de ovos pelo fungo, pode promover a destruição de indivíduos que

a compõe (Dallemolle et al. 2012). Contudo, há outros mecanismos de ação envolvidos no controle de *Meloidogyne* spp. pela *P. chlamydosporia*.

Este fungo pode colonizar as raízes de forma endofítica, promovendo alterações hormonais e enzimáticas, que podem promover melhor desenvolvimento da planta ou ativar os mecanismos de defesa naturais (Medeiros et al. 2015; Zavala-Gonzalez et al. 2017). Além disso, esta colonização resulta na redução da penetração dos nematoides nas raízes, comprometendo seu desenvolvimento e reprodução (Escudero & Lopez-Llorca 2012).

Apesar dos relatos de que a *P. chlamydosporia* promove crescimento de plantas (Escudero e Lopez-Llorca 2012; Zavala-Gonzalez et al. 2015), não houve evidências conclusivas deste modo de ação no presente estudo, no qual foi constatado aumento na altura das plantas apenas no tratamento com *P. chlamydosporia* associada a *M. javanica*, se comparado às plantas testemunhas. Contudo, o referido tratamento não diferiu dos demais, em que havia ao menos um organismo envolvido, o que pode ser conferido ao fato do fungo e do nematoide promoverem a produção de ácido indolacético (Zavala-Gonzalez et al. 2015), auxiliando no desenvolvimento vegetal (Meneguzzi et al., 2015). Por outro lado, o fungo não promoveu incremento em outros parâmetros vegetativos estudados, corroborando com Ghahremani et al. (2019), que ao aplicar *P. chlamydosporia* no controle de *M. incognita* em tomateiro, não constataram aumento na massa fresca e seca da parte aérea.

A relação entre agente de controle biológico, nematoide e planta é complexa e soma-se ainda os fatores edáficos do solo, que podem agir sobre os três organismos. Desta forma, é esperado que as respostas relacionadas aos parâmetros vegetativos sejam variáveis. A maior massa de raiz observada em plantas inoculadas, pode estar relacionada ao aumento na quantidade de galhas ocasionadas pelo nematoide, conforme já observado em outras pesquisas (Castro et al. 2012).

O carbono da biomassa microbiana do solo (CBM) foi maior no tratamento inoculado somente com *M. javanica*, seguida do tratamento com *P. chlamydosporia* aplicada isoladamente. Neste caso, como os organismos não interagem entre si, é possível que tenha havido condições favoráveis ao pleno desenvolvimento e reprodução de cada um isoladamente (Oliveira et al. 2016), aumentando assim a biomassa microbiana do solo. Por outro lado, na associação entre fungo e nematoide, a interação parasitária pode promoveu redução da biomassa microbiana, diminuindo a quantidade de organismos vivos no solo (Maboreke et al. 2017). Vale destacar que como o solo utilizado no trabalho

foi autoclavado, outros organismos habitantes naturais do solo foram parcial ou totalmente eliminados (Hu et al. 2019), sendo maior atividade conferida aos organismos introduzidos, uma vez que a biomassa microbiana é a porção viva do solo (Kaschuk et al. 2010).

A respiração basal do solo (RBS), por sua vez, é a quantidade de carbono em forma de CO₂, proveniente da respiração de organismos presentes no solo, que atuam na decomposição da matéria orgânica (Medeiros et al. 2019), o que explica as maiores médias observadas no tratamento com *P. chlamydosporia*, visto tratar-se de um fungo saprófita, que também se alimenta comumente da matéria orgânica em decomposição (Siddiqui et al. 2009). Por outro lado, os tratamentos com *P. chlamydosporia* não diferiram do tratamento cujas plantas não foram parasitadas com *M. javanica* nem tratadas com *P. chlamydosporia*, o que pode estar associado a interferências de fatores abióticos, como umidade, temperatura e aeração (Silva et al., 2007).

O quociente metabólico do solo (qCO_2) foi superior na presença dos organismos associados. Tal parâmetro está relacionado a eficiência dos microrganismos na utilização de carbono disponível para a promoção de crescimento (Batista et al. 2018). É possível que, com a presença do nematoide e do fungo *P. chlamydosporia*, tenha ocorrido maior gasto energético para a manutenção da comunidade microbiana, ou seja, a população de *M. javanica* está sofrendo estresse para a manutenção do fungo, já que é seu substrato, sendo consumido para sua sobrevivência (Carneiro et al. 2008; Silva et al. 2010; Gomide et al. 2011), demonstrando assim que, a *P. chlamydosporia*, em solo infestado por nematoide gera estresse ao fitoparasita e interfere diretamente na biomassa microbiana do solo.

Houve acúmulo de P e K na parte aérea das plantas tratadas com *P. chlamydosporia*, principalmente em relação às plantas inoculadas com *M. javanica*. Este resultado corrobora com a hipótese de que o fungo apresenta a capacidade de solubilizar formas não lábeis de fósforo, tornando-o solúvel e disponível para a absorção pela planta (Zavala-Gonzalez et al. 2015). Há também relatos de melhoria na aquisição de outros nutrientes, como K na presença da *P. chlamydosporia* (Zavala-Gonzalez et al. 2015). É possível que a relação endofítica do fungo com a planta contribua para a melhoria na absorção de alguns nutrientes. Soma-se a isto o fato de as plantas inoculadas com o nematoide, apresentarem alterações na absorção e translocação de água e nutrientes, em função da formação de sítios de alimentação associados ao xilema (Kyndt et al. 2013; Palomares-Rius et al. 2017)

Nas condições em que o experimento foi conduzido, o fungo não influenciou positivamente na absorção de micronutrientes. Uma das hipóteses é a de que, o processo de autoclavagem pode ter promovido a redução da matéria orgânica do solo e que a quantidade de micronutrientes remanescentes era baixa, não havendo disponibilidade suficiente para absorção pela planta. No entanto, a absorção de zinco foi aumentada no tratamento com *M. javanica*. Como as pesquisas relacionando nematoide e micronutrientes são escassas, faz-se necessário novas investigações, com diferentes tipos de solo e adubações, a fim de entender melhor a relação entre nematoide e absorção de nutrientes.

Os resultados obtidos mostraram que, além de controlar o nematoide, o fungo *P. chlamydosporia* apresenta efeito benéfico na comunidade microbiana do solo e a absorção de fósforo e potássio pela planta, podendo ser um importante aliado no manejo sustentável de nematoides. Porém, novas pesquisas com a adição de macro e micronutrientes ao solo, bem como com diferentes tipos de solo, devem ser realizadas, a fim de melhor entender esta complexa relação.

Agradecimentos

Agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de mestrado do primeiro autor e de produtividade em pesquisa do último autor.

References

Albahadli YIH, Mamarabadi M, Mahdikhani ME. 2019. Possibility of the biocontrol of *Meloidogyne javanica* using the fungus *Trichoderma harzianum* under greenhouse condition. *Plant Archives* 19:47-51.

Altomare C, Tringovska I. 2011. Beneficial soil microorganisms, an ecological alternative for soil fertility management. In: Lichtfouse E. (ed) *Genetics, Biofuels and Local Farming Systems. Sustainable Agriculture Reviews*, vol. 7. Springer, Dordrecht Chemistry 161-214p.

Batista ER, Zanchi CS, Ferreira DA, Santiago FDA, Pinto FA, Santos JD, Paulino HB, Carneiro MAC. 2018. Atributos biológicos do solo em sistema integrado de produção agropecuária. *Sistemas Integrados de Produção Agropecuária no Brasil* 1:71-90.

Boneti JIS, Ferraz S. 1981. Modificações do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* em raízes de cafeeiro. Fitopatologia Brasileira 6:553.

Brookes PC, Powlson DS, Jenkinson DS. 1982. Measurement of microbial biomass phosphorus in soil. Soil Biology & Biochemistry 14:319-329.

Castro JMC, Santos CAF, Flori JE, Siqueira SVC, Novaes PAR, Lima RG. 2012. Reaction of Psidium accessions to the *Meloidogyne enterolobii* root-knot nematode. Acta Horticulturae, Leuven, v. 959, n. 5, p. 51-57.

Carneiro MAC, Siqueira JO, Moreira FDS, Soares ALL. 2008. Carbono orgânico, nitrogênio total, biomassa e atividade microbiana do solo em duas cronossequências de reabilitação após a mineração de bauxita. Revista Brasileira de Ciência do Solo 32:621-632.

Dallemole-Giaretta R, Freitas LG. De, Lopes EA, Pereira OI, Zooca RJF, Ferraz S. 2012. Screening of Pochonia chlamydosporia brazilian isolates as biocontrol agents of Meloidogyne javanica. Journal of Crop protection v.42, p. 102-107.

Escudero N, Lopez-Llorca LV. 2012. Effects on plant growth and root-knot nematode infection of an endophytic GFP transformant of the nematophagous fungus Pochonia chlamydosporia. Symbiosis 57:33-42.

Favery B, Quentin M, Jaubert-Possamai S, Abad P. 2016. Gall-forming root-knot nematodes hijack key plant cellular functions to induce multinucleate and hypertrophied feeding cells. Journal of Insect Physiology 84:60-69.

Ferreira DF. 2011. Sisvar: a computer statistical analysis system. Ciência e Agrotecnologia 35:1039-1042.

Ghahremani Z, Escudero N, Saus E, Gabaldón T, Sorribas FJ. 2019. Pochonia chlamydosporia induces plant-dependent systemic resistance to Meloidogyne incognita. Frontiers in Plant Science 10:00945.

Gomide PHO, Silva MLN, Soares CRFS. 2011. Atributos físicos, químicos e biológicos do solo em ambientes de voçorocas no município de Lavras, MG. Revista Brasileira de Ciência do Solo 35:567-577.

Hu W, Wei S, Chen H, Tang M. 2019. Effect of sterilization on arbuscular mycorrhizal fungal activity and soil nutrient status. Journal of Soil Science and Plant Nutrition, 10.1007/s42729-019-00156-2.

Hussain M, Zouhar M, Ryšánek P. 2017. Effects of nematophagous fungi on viability of eggs and juveniles of *Meloidogyne incognita*. *Journal of Animal and Plant Science* 27:252-258.

Hussey RS, Barker KR. 1973. A comparison of methods collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. *Plant Disease Reporter* 57:1025-1028.

Jenkinson DS, Powlson DS. 1976. The effects of biocidal treatments on metabolism in soil. V. A method for measuring soil biomass. *Soil Biology & Biochemistry* 8:209-213.

Kyndt T, Vieira P, Gheysen G, Almeida-Engler J. 2013. Nematode feeding sites: unique organs in plant roots. *Planta* 238:807-818.

Kaschuk G, Alberton O, Hungria M. 2010. Three decades of soil microbial biomass studies in Brazilian ecosystems: Lessons learned about soil quality and indications for improving sustainability. *Soil Biology & Biochemistry* 42:1-13.

Larriba E, Jaime MDLA, Nislow C, Martín-Nieto J, Lopez-Llorca LV. 2015. Endophytic colonization of barley (*Hordeum vulgare*) roots by the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* reveals plant growth promotion and a general defense and stress transcriptomic response. *Journal of Plant Research* 128:665-678.

Maboreke HR, Graf M, Grams TEE, Herrmann S, Scheu S, Ruess L. 2017. Multitrophic interactions in the rhizosphere of a temperate forest tree affect plant carbon flow into the belowground food web. *Soil Biology & Biochemistry* 115:526–536.

Mahapatra M, Nayak DK. 2019. Biochemical and physiochemical changes in susceptible and resistant bitter melon cultivars/varieties as influenced by root knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *Journal of Entomology and Zoology Studies* 7:80-87.

Malavolta E, Vitti GC, Oliveira S. 1997. Avaliação do Estado Nutricional das Plantas: princípios e aplicações. 2º ed. Piracicaba: Potafós.

Manzanilla-López RH, Esteves I, Finetti-Sialer MM, Hirsch PR, Ward E, Devonshire J, Hidalgo-Díaz L. 2013. *Pochonia chlamydosporia*: advances and challenges to improve its performance as a biological control agent of sedentary endo-parasitic nematodes. *Journal of Nematology* 45:1-7.

Medeiros HA, Resende RS, Ferreira FC, Freitas LG, Rodrigues FA. 2015. Induction of resistance in tomato against *Meloidogyne javanica* by *Pochonia chlamydosporia*. *Nematoda* 2:e10015. 10.4322/nematode.10015.

Medeiros TS, Gomes ARMG, Alves MPB, Marcelino AS, Santos DM, Giongo AMM, Costa AR. 2019. Production of radish (*Raphanus sativus* L.) cultivated under

bovine manure levels and soil basal respiration. *Brazilian Applied Science Review* 3:1348-1357.

Meneguzzi A, Navroski MC, Lovatel QC, Marco FT, Pereira MO, Tonett EL. 2015. Ácido indolacético influencia no enraizamento de estacas de *Pittosporum tobira*. *Revista de Ciências Agroveterinárias* 14:24-28.

Messa V, Nunes J, Matte, D. 2019. Seed treatment with *Bacillus amyloliquefaciens* for the control of *Meloidogyne javanica* “in vivo” bean culture and its direct effect on the motility, mortality and hatching of *M. javanica* “in vitro”. *Agronomy Science and Biotechnology* 5:59-69.

Mukhtar T. 2018. Management of root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*, in tomato with two *Trichoderma* species. *Pakistan Journal of Zoology* 50:1590-1592.

Oliveira P, Nascente AS, Ferreira EPB, Kluthcouski J, Lobo Junior M. 2016. Response of soil fungi and biological processes to crop residues in no-tillage system. *Pesquisa Agropecuária Tropical* 46:57-64.

Oostenbrink M. 1966. Major characteristics of the relation between nematodes and plants. *Mededelingen Landbouw* 66:1-46.

Palomares-Rius JE, Escobar C, Cabrera J, Vovlas A, Castillo P. 2017. Anatomical alterations in plant tissues induced by plant-parasitic nematodes. *Frontiers in Plant Science* 8:1987.

Siddiqui IA, Siddiqui SD, Atkins BR, Kerry BR. 2009. Relationship between saprotrophic growth in soil of different biotypes of *Pochonia chlamydosporia* and the infection of nematode eggs. *Annals of Applied Biology* 155:131-141.

Silva EE, Azevedo PHS, De-Polli H. 2007. Determinação da respiração basal (RBS) e quociente metabólico do solo (qCO₂). Embrapa: Seropédica. 4 p. (Comunicado técnico, 99).

Silva AP, Babujia LC, Franchini JC, Souza RA, Hungria M. 2010. Microbial biomass under various soil- and crop-managementsystems in short- and long-term experiments in Brazil. *Journal Field Crops Research* 119:20-26.

Silva SD, Carneiro RM, Faria M, Souza DA, Monnerat RG, Lopes RB. 2017. Evaluation of *Pochonia chlamydosporia* and *Purpureocillium lilacinum* for Suppression of *Meloidogyne enterolobii* on tomato and banana. *Journal of Nematology* 49:77-85.

Singh UB, Sahu A, Sahu N, Singh RK, Prabha R, Singh DP, Sarma B, Manna MC. 2012. Co-inoculation of *Dactylaria brochopaga* and *Monacrosporium eudermatum* affects disease dynamics and biochemical response in tomato (*Lycopersicon esculentum*

Mill.) to enhance bio-protection against *Meloidogyne incognita*. Journal Crop Protection 35:102-109.

Tate KR, Ross DJ, Feltham CW. 1988. A direct extraction method to estimate soil microbial-C - effects of experimental- variables and some different calibration procedures. Soil Biology & Biochemistry 20:329-335.

Vance ED, Brookes PC, Jenkinson DS. 1987. An extraction method for measuring soil microbial biomass-C. Soil Biology & Biochemistry 19:703-707.

Zavala-Gonzalez EA, Escudero N, Lopez-Moya F, Aranda-Martinez A, Exposito A, Ricaño-Rodríguez J. 2015. Some isolates of the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* promote root growth and reduce flowering time in tomato. Annual Applied Biology 166:472-483.

Zavala-Gonzalez EA, Rodríguez-Cazorla E, Escudero N, Aranda-Martinez A, Martínez-Laborda A, Ramírez-Lepe M. 2017. *Arabidopsis thaliana* root colonization by the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* is modulated by jasmonate signaling and leads to accelerated flowering and improved yield. New Phytologist 213:351-364.

Zouhar M, Douda O, Nováková J, Doudová E, Mazáková J, Wenzlová J, Ryšánekandm P, Renčo M. 2013. First report about the trapping activity of *Stropharia rugosoannulata* acanthocytes for Northern Root Knot Nematode. Helminthologia 2:127-131.

Witt C, Gaunt JL, Galicia CC, Ottow JCG, Neue HU. 2000. A rapid chloroformfumigation extraction method for measuring soil microbial biomass carbon and nitrogen in flooded rice soils. Biology and Fertility of Soils 30:510-519.

CONCLUSÕES GERAIS

O trabalho permitiu concluir que:

- A aplicação de *P. chlamydosporia* reduz a penetração e a reprodução de *M. javanica*.
- O fungo apresenta potencial para indução de resistência em soja contra *M. javanica*.
- *P. chlamydosporia* aumenta a absorção de fósforo e potássio pela planta e melhora a atividade microbiana do solo.