UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AGRÍCOLA

Breno Bevilaqua Heinz

MANEJO BIOLÓGICO DE *MELOIDOGYNE JAVANICA* EM HORTALIÇAS: APLICAÇÃO DE CALDOS FERMENTADOS ENZIMÁTICOS ORIUNDOS DE MATRIZES FÚNGICAS

Santa Maria, RS
2018

Breno Bevilaqua Heinz

MANEJO BIOLÓGICO DE *MELOIDOGYNE JAVANICA* EM HORTALIÇAS: APLICAÇÃO DE CALDOS FERMENTADOS ENZIMÁTICOS ORIUNDOS DE MATRIZES

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Engenharia Agrícola**.

Orientador: Prof. Dr. Marcio Antônio Mazutti

Santa Maria, RS
2018

Breno Bevilaqua Heinz

MANEJO BIOLÓGICO DE *MELOIDOGYNE JAVANICA* EM HORTALIÇAS: APLICAÇÃO DE CALDOS FERMENTADOS ENZIMÁTICOS ORIUNDOS DE MATRIZES FÚNGICAS

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Engenharia Agrícola**.

Aprovado em 22 de agosto de 2018:

_____
Marcio Antônio Mazutti, Dr.
(Presidente/Orientador)

_____
Emanuele Junges, Dra. (IFFar)
(Coorientador)

_____
Luis Aquiles Martins Medeiros, Dr. (IFFar)

_____
Raquel Cristine Kuhn, Dra. (UFSM)

Santa Maria, RS
2018

À toda família,
dedico este trabalho

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela vida, proteção, saúde e por me proporcionar muitas oportunidades gratificantes durante toda minha vida.

Agradeço em especial a minha família por me incentivar nos momentos mais difíceis, dar-me carinho, educação, amor e ensinar-me valores e princípios que levo comigo por toda vida.

Agradeço minha namorada Samara Pozzan da Rocha pelo companheirismo, amor, auxílios nas atividades gerais (inclusive nas viagens a São Vicente do Sul) e palavras motivacionais que me ajudaram e fortificaram ao longo desta jornada árdua de trabalho.

Agradeço a Universidade Federal de Santa Maria, ao Instituto Federal Farroupilha, ao programa de pós-graduação em Engenharia Agrícola (PPGEA) e a CAPES pela oportunidade de estudo e possibilidade de realização do mestrado.

Agradeço ao professor e orientador Marcio Antônio Mazutti pela oportunidade de cursar o mestrado. Sou grato pela confiança depositada a mim, pelos ensinamentos prestados, os quais serão fundamentais para minha qualificação pessoal e profissional.

Agradeço a professora e coorientadora Emanuele Junges pela disponibilidade de ceder o laboratório para a realização das atividades, pelas ideias propostas a serem estudadas e por acreditar em mim na realização do mesmo.

Enfim, agradeço a todas as pessoas, as quais, de forma direta ou indireta, contribuíram para o desenvolvimento do projeto de pesquisa, especialmente as alunas de iniciação científica do Instituto Federal Farroupilha Izabelle Scheffer Romagna e Patrícia Achterberg Karsburg.

“Viver é acalentar sonhos e esperanças, fazendo da fé a nossa inspiração maior. É buscar nas pequenas coisas, um grande motivo para ser feliz!”

(Mário Quintana)

RESUMO

MANEJO BIOLÓGICO DE *MELOIDOGYNE JAVANICA* EM HORTALIÇAS: APLICAÇÃO DE CALDOS FERMENTADOS ENZIMÁTICOS ORIUNDOS DE MATRIZES FÚNGICAS

AUTOR: Breno Bevilaqua Heinz
ORIENTADOR: Marcio Antônio Mazutti

O manejo biológico de nematóides destaca-se pela viabilidade na redução do agrotóxicos em sistemas agrícolas em prol da sustentabilidade da cadeia produtiva e à saúde humana. Com os avanços do conhecimento na bioquímica e biologia dos microrganismos, é possível obter produtos a partir de processos biotecnológicos, sendo alguns deles focados principalmente na produção enzimática para fins agrícola. Assim, objetiva-se avaliar, *in vitro* e *in vivo*, o efeito nematicida de caldos enzimáticos fúngicos no controle de ovos e juvenis (J2) de *Meloidogyne javanica* em alface e tomate em desenvolvimento inicial. Para tanto, 3 caldos enzimáticos oriundos de *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* e *Trichoderma harzianum* foram produzidos e filtrados para retirada da biomassa. A suspensão de ovos e J2 foram obtidas pelo método de peneiramento e funil de Baermann modificado, respectivamente. A seguir, colocaram-se 100µL de suspensões de ovos ou J2 em placas de Elisa. Posteriormente, aplicou-se 100µL dos extratos, volume formado por diversas proporções consorciadas de cada espécie (0, 25, 50, 75, 100, em %). O ensaio de inibição da eclosão de ovos foi composto por 17 tratamentos com 8 repetições e 3 períodos de incubação (24, 48 e 72 horas), períodos onde foram realizadas as avaliações. Já para o índice de mortalidade de juvenis foram utilizadas quatro repetições e tempo de incubação de 8, 16, 24 horas. Dentre os períodos avaliativos, houve diferença significativa entre os tratamentos, pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$), onde todos os caldos apresentaram maiores índices de inibição de ovos (66,67-87,04%) e mortalidade de J2 (44,44-90,00%) em relação à testemunha. Em decorrência, foram selecionados para os ensaios *in vivo*, os 3 melhores tratamentos: nematóides + água destilada estéril (testemunha) (T1), nematóides + 75% *B. bassiana* + 25% *M. anisopliae* (T2), nematóides + 75% *B. bassiana* + 25% *T.harzianum* (T3), nematóides + 100% *B. bassiana* (T4). Para o ensaio de avaliação de danos em alface, foram utilizadas 10 repetições, onde foi implantada a cultivar Irene (altamente suscetível). Sete dias pós-transplante, inoculou-se os nematóides e, por conseguinte, em 72 horas os caldos enzimáticos. Foram avaliados os seguintes parâmetros de interesse comercial em 25 dias pós-inoculação: número de folhas, peso matéria fresca folhas, peso matéria fresca caule, peso matéria seca folhas, população final de nematoides (ovos e juvenis) e taxa de eclosão de ovos. Já para o ensaio de penetração de juvenis em tomate, foram 6 repetições, onde a cultivar utilizada para o estudo foi a Santa Clara (suscetível). Sete dias pós-transplante, inoculou-se os caldos enzimáticos e 24 horas após, a suspensão de nematóides. A avaliação da taxa de penetração foi feita, 48 horas depois, pelo método de coloração de nematóides em raízes. Houve diferença significativa entre os tratamentos em relação à testemunha, pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$), sendo que T2, T3 e T4 obtiveram respostas positivas diante das variáveis avaliadas, porém o T4, na interação planta-nematoide-extrato, apresentou sintomas fitotóxicos. Assim, o uso de caldos enzimáticos surge como possível alternativa viável, inovadora e eficaz no controle de ovos e juvenis de *M. javanica*.

Palavras-chave: Biotecnologia agrícola. Biocontrole. Enzimas microbianas.

ABSTRACT

BIOLOGICAL MANAGEMENT OF *MELOIDOGYNE JAVANICA* IN VEGETABLES: APPLICATION OF ENZYMATIC FERMENTED CALVES FROM FUNGAL MATRIXE

AUTHOR: Breno Bevilaqua Heinz
ADVISOR: Marcio Antônio Mazutti

The biological management of nematodes stands out for its viability in reducing agrochemicals in agricultural systems in favor of the sustainability of the production chain and human health. With advances in the biochemistry and biology of microorganisms, it is possible to obtain products from biotechnological processes, some of them focused mainly on the enzymatic production for agricultural purposes. The objective of this study was to evaluate in vitro and in vivo the nematicidal effect of fungal enzymatic broths on the control of eggs and juveniles (J2) of Meloidogyne javanica in lettuce and tomato in initial development. To do so, 3 enzyme broths from Metarhizium anisopliae, Beauveria bassiana and Trichoderma harzianum were produced and filtered for biomass removal. The egg suspension and J2 were obtained by the modified Baermann sieve and funnel method, respectively. Next, 100 µl of egg or J2 suspensions were plated on Elisa plates. Subsequently, 100µL of the extracts were applied, volume formed by several proportions consortium of each species (0, 25, 50, 75, 100,%). The egg hatch inhibition test consisted of 17 treatments with 8 replicates and 3 incubation periods (24, 48 and 72 hours), during which the evaluations were performed. For the juvenile mortality index, four replications and incubation time of 8, 16, 24 hours were used. Among the evaluation periods, there was a significant difference between the treatments, by the Scott-Knott test ($p \leq 0.05$), where all the broths presented higher rates of egg inhibition (66.67-87.04%) and mortality J2 (44.44-90.00%) relative to the control. In the present study, the best 3 treatments were selected: nematodes + sterile distilled water (control) (T1), nematodes + 75% B. bassiana + 25% M. anisopliae (T2), nematodes + 75% B bassiana + 25% T.harzianum (T3), nematodes + 100% B. bassiana (T4). For the evaluation of lettuce damage, 10 replications were used, where the Irene cultivar (highly susceptible) was implanted. Seven days after transplantation, the nematodes were inoculated, and therefore the enzyme broths were inoculated within 72 hours. The following parameters of commercial interest were evaluated at 25 days after inoculation: leaf number, fresh matter weight, fresh matter weight, leaf dry weight, final population of nematodes (eggs and juveniles) and egg hatching rate. As for the penetration test of juveniles in tomato, there were 6 replications, where the cultivar used for the study was Santa Clara (susceptible). Seven days after transplantation, the enzyme broths were inoculated and the nematode suspension 24 hours later. The evaluation of the penetration rate was made, 48 hours later, by the nematode staining method in roots. There was a significant difference between the treatments in relation to the control, by the Scott-Knott test ($p \leq 0.05$), and T2, T3 and T4 obtained positive responses to the variables evaluated, but T4, in the plant-nematoid- extract, presented phytotoxic symptoms. Thus, the use of enzymatic broths appears as a viable, innovative and effective alternative for the control of eggs and juveniles of M. javanica.

Keywords: Agricultural biotechnology. Biocontrol. Microbial enzymes.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 21
2 HIPÓTESES 24
3 OBJETIVOS 25
3.1 OBJETIVO GERAL 25
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 25
4 REVISÃO DE LITERATURA 26
4.1 GÊNERO MELOIDOGYNE 26
4.1.1 Biologia e ciclo de vida 26
4.1.2 Danos ocasionados em cultivos agrícolas 31
4.2 CONTROLE BIOLÓGICO 32
4.2.1 Conceito 33
4.2.2 Tipos de controle biológico 34
4.2.2.1 Controle biológico natural 34
4.2.2.2 Controle biológico aplicado 34
4.2.2.2.1 Controle biológico aplicado - clássico 35
4.2.2.2.2 Controle biológico aplicado - conservativo 35
4.2.2.2.3 Controle biológico aplicado - aumentativo 35
4.3 ENZIMAS E SUAS PECULIARIDADES 36
4.4 PROCESSAMENTO PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS MICROBIANAS 37
4.4.1 Escolha do inóculo 37
4.4.2 Processos fermentativos 37
4.4.2.1 Fermentação em meio sólido 38
4.5 REAÇÕES ENZIMÁTICAS DESENCADEADAS NA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA DE PLANTAS AO ATAQUE DE PRAGAS/DOENÇAS 39
4.6 APLICABILIDADE DE ENZIMAS MICROBIANAS EM SISTEMAS AGRÍCOLAS 41
4.6.1 β-1,3-glucanases 41
4.6.2 Lipases 42
4.6.3 Pectinases 43
4.6.4 Proteases 43
4.6.5 Quitinases 45
5 MATERIAIS E MÉTODOS 47
5.1 ENSAIOS PRELIMINARES 47
5.2 ENSAIOS NEMATOLÓGICOS 50
5.2.1 Extração de ovos e juvenis de *M. javanica* via raízes 51
5.3 AVALIAÇÃO IN VITRO DO EFEITO NEMATICIDA PROVENIENTE DOS CALDOS ENZIMÁTICOS SOBRE O ÍNDICE DE INIBIÇÃO DE ECLOSÃO DE OVOS DE *M. JAVANICA* 53
5.4 AVALIAÇÃO IN VITRO DO EFEITO NEMATICIDA PROVENIENTE DOS CALDOS ENZIMÁTICOS SOBRE O ÍNDICE DE MORTALIDADE DE JUVENIS (J2) DE *M. JAVANICA* 56
5.5 AVALIAÇÃO DE DANOS OCASIONADOS POR *M. JAVANICA* SOB CONTROLE APLICADO DE EXTRATOS ENZIMÁTICOS EM ESTÁGIO INICIAL DE DESENVOLVIMENTO DA CULTURA DA ALFACE 57
5.6 AVALIAÇÃO DA PENETRAÇÃO RADICULAR POR JUVENIS DE M. JAVANICA SOB CONTROLE APLICADO DE EXTRATOS ENZIMÁTICOS EM ESTÁGIO INICIAL DE DESENVOLVIMENTO DA CULTURA DO TOMATE 60
5.7 ANALISE ESTATÍSTICA 62

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....63
6.1 AVALIAÇÃO IN VITRO DO EFEITO NEMATICIDA PROVENIENTE DOS CALDOS ENZIMÁTICOS SOBRE O ÍNDICE DE INIBIÇÃO DE OVOS DE *M. JAVANICA*.....63
6.2 AVALIAÇÃO IN VITRO DO EFEITO NEMATICIDA PROVENIENTE DOS CALDOS ENZIMÁTICOS SOBRE O ÍNDICE DE MORTALIDADE DE JUVENIS (J2) DE *M. JAVANICA*.....66
6.3 AVALIAÇÃO DE DANOS OCASIONADOS POR *M. JAVANICA* SOB CONTROLE APLICADO DE EXTRATOS ENZIMÁTICOS EM ESTÁGIO INICIAL DE DESENVOLVIMENTO DA CULTURA DA ALFACE.....69
6.4 AVALIAÇÃO DA PENETRAÇÃO RADICULAR POR JUVENIS DE M. JAVANICA SOB CONTROLE APLICADO DE EXTRATOS ENZIMÁTICOS EM ESTÁGIO INICIAL DE DESENVOLVIMENTO DA CULTURA DO TOMATE 73
7 CONCLUSÃO.....77
REFERÊNCIAS.....78
ANEXO A – CONTAGEM INICIAL DE OVOS DE *M. JAVANICA* DAS PLACAS DE ELISA REFERENTE AOS TRÊS PERÍODOS DE INCUBAÇÃO (24, 48 E 72 HORAS).....89
ANEXO B – CONTAGEM INICIAL DE JUVENIS (J2) DE M. JAVANICA DAS PLACAS DE ELISA REFERENTES AO PERÍODO DE 8 HORAS DE INCUBAÇÃO..... 90
ANEXO C – CONTAGEM INICIAL DE JUVENIS (J2) DE M. JAVANICA DAS PLACAS DE ELISA REFERENTES AO PERÍODO DE 16 HORAS DE INCUBAÇÃO.....91
ANEXO D – CONTAGEM INICIAL DE JUVENIS (J2) DE M. JAVANICA DAS PLACAS DE ELISA REFERENTES AO PERÍODO DE 24 HORAS DE INCUBAÇÃO.....92

1 INTRODUÇÃO

A incidência de nematóides em cultivos agrícolas acarreta prejuízos econômicos relevantes e necessita de práticas eficientes de combate aos agentes causadores. O controle químico, frequentemente utilizado pelos agricultores, pode acumular resíduos no ambiente, danificar a microbiota benéfica do solo (ETHUR et al., 2007) e proporcionar aumento da resistência dos microrganismos aos compostos sintéticos (AMARAL; BARA, 2005). Assim, o controle biológico representa uma alternativa mais sustentável (ETHUR et al., 2007), sendo os agentes de biocontrole capazes de se estabelecer, colonizar e dispersar no ecossistema (ÁVILA et al., 2005).

Avanços recentes na tecnologia de reações biológicas têm gerado melhorias na indústria biotecnológica, devido à otimização da produção bem como aos processos de caracterização de biomoléculas (PÉREZ; CARREÑO, 2007). A produção enzimática é uma área de biotecnologia em expansão, tendo grande importância no mercado mundial, movimentando bilhões de dólares anualmente (VINIEGRA-GONZÁLEZ et al., 2003; RAJASEKARAN et al., 2008). Dentre os organismos produtores de enzimas microbiana, destacam-se os fungos por possuírem características como, praticidade no manuseio, rapidez de desenvolvimento através de elevadas taxas de crescimento e baixo custo devido à alta estabilidade e especificidade para substratos. Assim, a produção artificial de enzimas é realizada principalmente mediante fermentações em estado sólido, as quais são mais favoráveis à alta produção de enzimas (OKAFOR, 2007) e é definida como aquela que ocorre em substratos sólidos, provenientes de resíduos agroindustriais, na ausência ou quase ausência de água.

Estas atribuições citadas, tornam as enzimas cada vez mais atrativas para estudos e uso de tecnologias, as quais apresentam diversas aplicações, entre elas: alimentos, papel, couro, indústria têxtil e, primordialmente, na agricultura (VAN BEILEN; LI, 2002).

Dentre os diversos fungos utilizados no manejo biológico de pragas e doenças, destacam-se *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*, por serem antagonistas eficientes de amplo número de espécies, sendo base de inúmeros inseticidas biológicos comerciais, responsáveis pela composição de 67,8% da produção global dos produtos provenientes de origem microbiana (DE FARIA; WRAIGHT, 2007). Também, espécies como *Trichoderma harzianum* são utilizadas com sucesso no

controle biológico de fitopatógenos e nematóides de solo, sendo a base de inúmeros produtos biológicos comerciais. Isto porque são comprovadamente eficientes na competição por espaço e nutrientes (BENITEZ et al., 2004; HARMAN et al., 2004; HARMAN, 2006), produzem compostos antifúngicos (ETHUR et al., 2007; ALMEIDA, 2009), apresentam baixo custo de produção, facilidade de produção massal e dispersão de propágulos (COSTA, 2011).

De acordo com o comportamento e modo de ação antagônico a espécies maléficas, tais fungos são capazes de produzir enzimas tais como proteases, celulases, lipases, lipoxigenases, quitinases e glucanases, as quais degradam a parede celular dos nematóides composta em sua grande proporção por quitina e, consequentemente, ocasionam a mortalidade (LUBECK et al, 2008; MUSTAFA; KAUR, 2009; BOLDO et al., 2009). Além disso apresentam propriedades fungistáticas geradas por metabólitos secundários (anticorpos) que podem promover o crescimento vegetal das culturas e a indução de resistência a plantas contra agentes infecciosos. (TEN HAVE et al.,2002; KERN et al., 2009; MONDAL et al., 2016).

Entre os microrganismos maléficos das culturas agrícolas, destacamos espécies altamente polífagas, isto é, capazes de atacar uma grande quantia de culturas de importância econômica, como os nematóides do gênero *Meloidogyne*. Os nematóides são organismos pertencentes ao filo Nematoda, de corpo cilíndrico e alongado, fusiformes, não segmentados, os quais possuem vida livre, geralmente alimentando-se de microrganismos e ocupam diversos habitats sendo considerados organismos aquáticos, cujos danos afetam consideravelmente a produtividade das culturas (FABRE, 2011).

Os nematóides são considerados de difícil controle, pois uma vez que ocorra a infestação, raramente haverá erradicação dos organismos e exigem adoção de práticas de manejo integrado para atingir o nível de dano econômico aceitável (FERRAZ et al., 2008). O método genético é eficaz, porém nem todos os genótipos de plantas apresentam resistência como, por exemplo, a alface e tomate. Manejo cultural e químico são úteis, porém há entraves em alguns casos, como estabelecimento e reprodutibilidade de populações de nematóides em áreas monocultivadas e métodos químicos, em excesso, causarem danos ao solo por acúmulo de resíduos, além da indução de resistência adquirida pelo uso contínuo de produtos de mesmo mecanismo de ação.

Diante do exposto, torna-se importante a realização deste estudo relacionado à produção e aplicabilidade de enzimas microbianas oriundas de matrizes fúngicas, onde em busca-se a ampliação do portfólio de nematicidas biológicos no Brasil, pois segundo o portal Agrofit, há apenas 17 produtos biológicos registrados, os quais são provenientes de matrizes bacterianas, em sua grande maioria. através da produção e aplicabilidade de enzimas microbianas oriundas de matrizes fúngicas. Sabe-se pouco à respeito dos efeitos e possíveis vantagens de enzimas fúngicas no biocontrole de nematóides, todavia, em comparação aos produtos biológicos, apresentam possibilidade de padronizar a concentração do ingrediente ativo e, consequentemente, ter melhor uniformidade nos resultados, além da menor dependência de condições climáticas e de solo adequadas por não conter esporos, micélios e células. Assim, objetiva-se verificar a viabilidade e o efeito potencialmente nematicida em *Meloidogyne javanica* pela aplicação de caldos enzimáticos, no desenvolvimento inicial da cultura do tomate e da alface, provindos de fungos de ampla utilidade na formulação de fungicidas e inseticidas presentes no mercado agrícola.

2 HIPÓTESES

- Devido à existência de formulações e o registro comercial de produtos biológicos a base de organismos vivos de *Trichoderma harzianum* como nematicida, comparando-se com os extratos enzimáticos oriundos de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*, o extrato enzimático de *T. harzianum* apresenta maior potencial de controle de ovos e juvenis de *Meloidogyne javanica*;
- Através da compatibilidade dos compostos enzimáticos obtidos, a consorciação de um aos outros, em comparação à aplicação de um único tipo (microrganismo) de extrato, potencializa o efeito nematicida sob ovos e juvenis de *M. javanica*.
- Caldos enzimáticos fúngicos que apresentam, em sua composição, maior atividade enzimática de quitinases consequentemente têm maior índice de inibição de ovos e mortalidade de juvenis de *M. javanica*.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar, *in vitro* e *in vivo*, o potencial efeito nematicida de caldos enzimáticos obtidos por três isolados fúngicos (*Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e *Trichoderma harzianum*) no controle de ovos e juvenis de 2º estádio de *Meloidogyne javanica*, *in vitro* e inoculados em alface e tomate nos estágios de desenvolvimento inicial das culturas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar, *in vitro*, a eficiência do uso dos caldos enzimáticos fúngicos utilizados em diferentes proporções (volume), seja em isolado ou em mistura dos mesmos, sob ovos e juvenis (J2) de *M. javanica*;
- Selecionar três melhores tratamentos obtidos nos ensaios *in vitro* para verificação do desempenho na aplicação destes extratos enzimáticos no controle de ovos e juvenis (J2) de nematóides em plantas de tomate e alface em estágios iniciais de desenvolvimento vegetal;
- Avaliar, em alface, o nível de danos ocasionados por *M. javanica* através da contagem da população final de ovos e/ou número de galhas visíveis presentes nas raízes e da análise de parâmetros importância comercial como: número de folhas, peso da matéria fresca e seca (folhas) e peso do matéria fresca (caule);
- Avaliar, em raízes de tomate, a taxa de penetração de juvenis (J2) de *M. javanica* quando tratadas com os caldos enzimáticos fúngicos.

4 REVISÃO DE LITERATURA

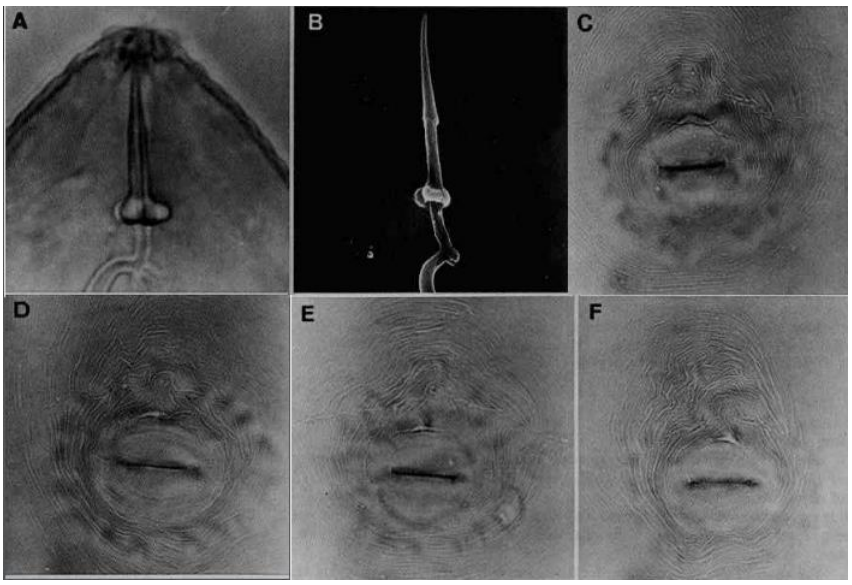
4.1 GÊNERO MELOIDOGYNE

4.1.1 Biologia e ciclo de vida

As características morfológicas mais importantes que distinguem os nematoides são: vermiformes, redondos em seção transversal, simetria bilateral, hialinos (transparentes), não segmentados e triploblásticos (presença de ectoderme, mesoderme e endoderme) (COTO, 2007).

As fêmeas adultas de Meloidogyne são brilhantes, globosas e providas de um pescoço comprido. Seu tamanho varia de menos de 0,5 mm a mais de 2 mm (BRAZ et al., 2008). A fêmea de *Meloidogyne javanica* possui o corpo em forma de pera e o pescoço está alinhado com a extremidade posterior (Figura 1A). As massas de ovos geralmente se projetam da galha, mas as fêmeas geralmente estão completamente inseridas no tecido da planta. Frequentemente a espécie possui padrão perineal (Figuras 1C a 1F), pois muitos espécimes têm linhas laterais distintas que delineiam claramente as regiões dorsal e ventral do padrão. A forma geral do padrão perineal é redonda ou oval a ligeiramente quadrada. O estilete da fêmea (Figura 1A e 1B) tem de 14-18 µm de comprimento. A abertura é próxima da ponta (0,5 µm) e é marcada por uma leve protuberância posteriormente (EISENBACK, 1991).

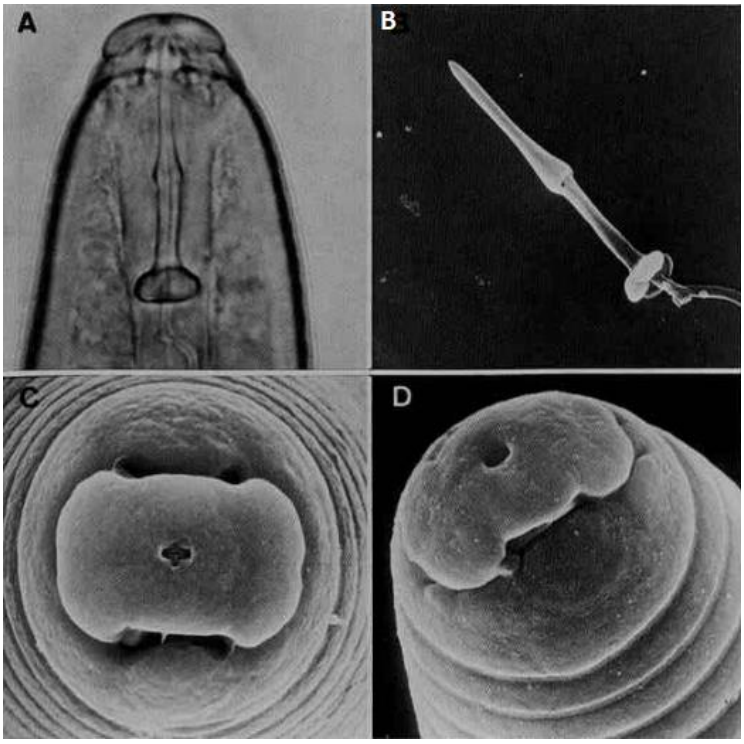
Figura 1 - Micrografias de fêmeas de *Meloidogyne javanica*. A) Micrografia de luz da extremidade anterior. B) Micrografia eletrônica de varredura de um estilete excisado. C-F) Microscopia de luz de padrões perineais.



Fonte: Eisenback (1991).

A região da cabeça dos machos de *M. javanica* é geralmente lisa, mas pode ser marcada por duas a três anulações irregulares e incompletas em algumas populações. O estilete do macho é único para a espécie e é útil para separar os machos de *M. javanica* das outras espécies com formas de cabeça semelhantes (Figura 2) e o cone é pontiagudo. Algumas populações de *M. javanica* produzem intersexos masculinos que exibem variados graus de características sexuais secundárias femininas, variando de uma pequena protuberância ventral anterior à abertura cloacal até uma grande protuberância marcada com uma vulva rudimentar (EISENBACK, 1991).

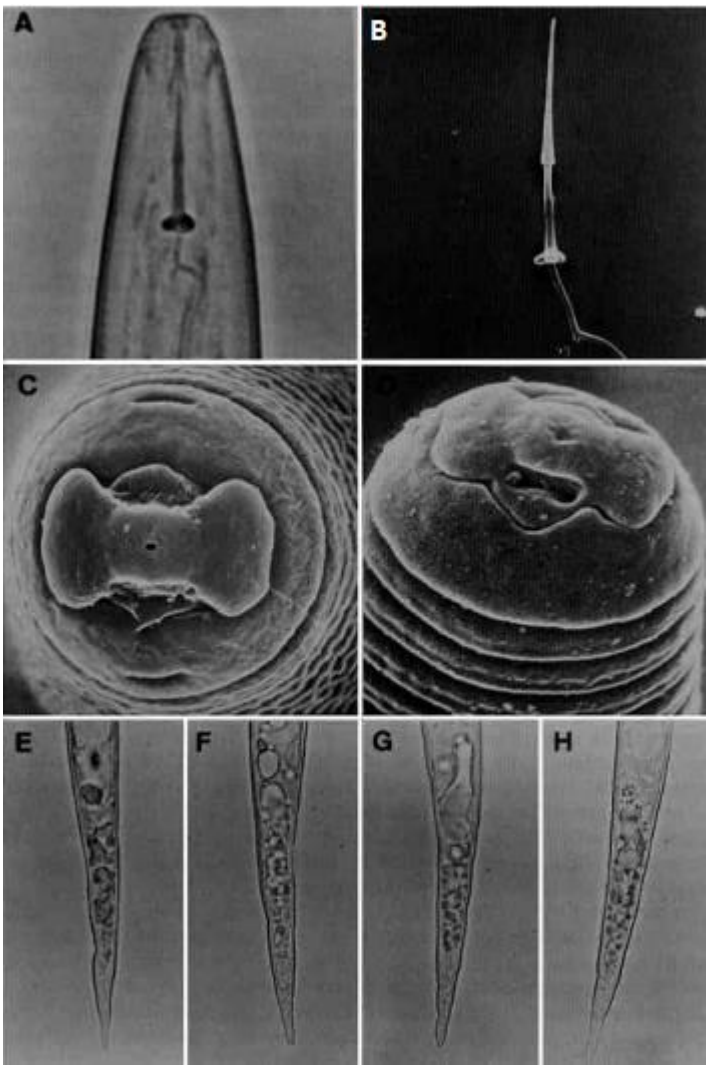
Figura 2 - Micrografias de machos de *Meloidogyne javanica*. A) Micrografia de luz da cabeça e estilete em vista lateral. B) Micrografia eletrônica de varredura do estilete excisado. C) Microscopia eletrônico de varredura da extremidade anterior na vista frontal. D) Microscopia eletrônico de varredura da extremidade anterior em vista lateral.



Fonte: Eisenback (1991).

O comprimento do corpo dos juvenis no J2 de *M. javanica* é de 402-560 µm (488 µm), e a cauda é de 51-63 µm. A forma da cabeça dos juvenis de segundo estágio de *M. javanica* é característica da espécie, possuindo o disco labial e os lábios mediais frequentemente com a forma de halteres. Os lábios laterais são geralmente de forma triangular, e às vezes fundidos com a região da cabeça, mas em alguns espécimes eles podem ser mais alongados. A cabeça pode ser marcada por algumas poucas anulações incompletas, mas geralmente é suave. O estilete dos juvenis no J2 de *M. javanica* no J2 tem de 10-12 µm de comprimento e a cauda cônica afunila em uma ponta fina e arredondada (EISENBACK, 1991) (Figura 3).

Figura 3 - Micrografias de juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne javanica*. A) Micrografia de luz da cabeça e estilete em vista lateral. B) Micrografia eletrônica de varredura do estilete excisado. C) Micrografia eletrônica de varredura da extremidade anterior na vista frontal. D) Micrografia eletrônica de varredura da extremidade anterior em vista lateral. E-H) Microscopia de luz das caudas.



Fonte: Eisenback (1991).

O ciclo de vida das espécies de *Meloidogyne* (Figura 4) tem início com um ovo, geralmente na fase de uma célula, depositado pela fêmea (PINHEIRO, 2018). As fêmeas põem ovos em massas gelatinosas compostas de uma matriz de glicoproteína, que é produzida por glândulas retais na fêmea. Esta matriz fornece proteção aos ovos e possui propriedades antimicrobianas (MOENS et al., 2010). A massa dos ovos é inicialmente mole, pegajosa e hialina, mas torna-se mais firme e marrom escuro com o passar do tempo (MOENS, 2010; BRAZ et al., 2008). As fêmeas produzem 400 a 500 ovos em média, havendo, porém, registro de fêmeas que

produzam mais de 2000 ovos (BRAZ et al., 2008), dependendo da temperatura, da umidade e do tipo de solo (PINHEIRO, 2018). A oviposição pode ser no interior ou no exterior dos tecidos e ocorre durante seu desenvolvimento, pela ruptura do córtex radicular, emergindo a superfície da raiz. São notáveis manchas escuras salientes correspondendo cada uma a uma ooteca depositada externamente (BRAZ et al., 2008).

O desenvolvimento do ovo começa dentro de algumas horas após sua deposição, iniciando o primeiro estágio juvenil (J1), onde eventualmente um juvenil totalmente formado com um estilete visível permanece enrolado dentro do ovo (BRAZ, 2008; COTO, 2007; PINHEIRO, 2018).

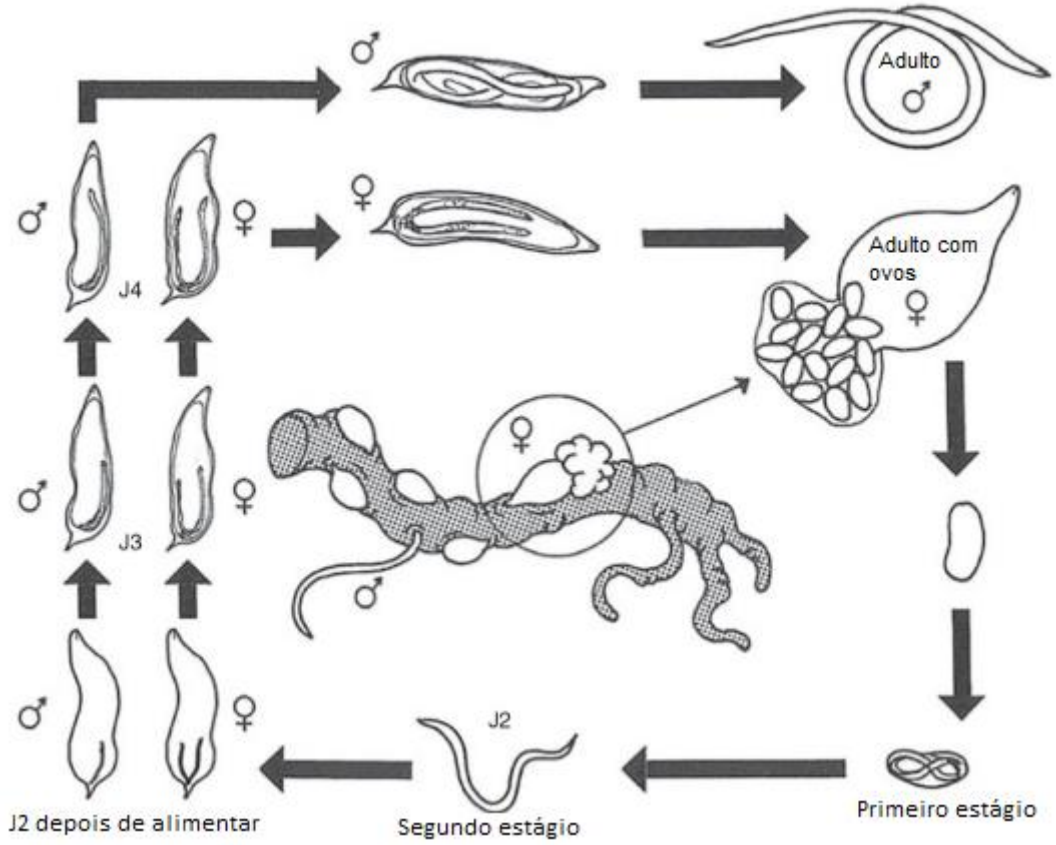
Dentro do ovo há uma ecdise e o juvenil eclode do ovo iniciando o estádio infectivo (J2) (MOENS et al., 2010). Conforme Pinheiro (2018), o juvenil pode se mover aleatoriamente dentro da massa de ovos ou migrar para o solo até encontrar uma ponta do sistema radicular, penetrando pela coifa. Dentro da raiz os juvenis migram intra e intercelularmente, tornam-se sedentários e com sua alimentação ocorre à formação de células gigantes multinucleadas ao redor do seu sítio de alimentação. Moens et al. (2010) e Eisenback e Triantaphyllou (1991) complementam que o J2 é primariamente dependente da temperatura e da umidade, embora outros fatores também modifiquem a resposta de eclosão. Para Pinheiro (2018) as temperaturas ótimas para *M. javanica* variam de 25ºC a 30ºC e existe pouca atividade para qualquer espécie de *Meloidogyne* acima de 40ºC ou abaixo de 5ºC.

Sob condições favoráveis, o estágio J2 converte para o terceiro estágio juvenil (J3), posteriormente para o estágio juvenil (J4) e, finalmente, para o estágio adulto. O tempo combinado para os estágios J3 e J4 é menor do que para o J2 ou o adulto (MOENS et al., 2010).

Logo após o último estágio, a fêmea adulta recomeça a alimentação e continua pelo resto de sua vida. Durante este desenvolvimento pós-embrionário, o sistema reprodutivo se desenvolve e cresce em gônadas funcionais. As fêmeas possuem duas gônadas e os machos geralmente apresentam apenas uma gônada. A mudança de forma do macho juvenil para o macho adulto vermiforme ocorre durante o J4. O macho adulto não se alimenta e ele deixará a raiz e se moverá livremente pelo solo. Dependendo do tipo de reprodução da espécie, o macho pode procurar uma fêmea ou permanecer no solo e finalmente morrer. A vida útil das fêmeas produtoras de ovos

pode se estender de 2 a 3 meses, mas a dos machos pode ser muito menor (EISENBACK; TRIANTAPHYLLOU, 1991).

Figura 4 - Ciclo de vida de *Meloidogyne* sp.



Fonte: Moens et al. (2010).

4.1.2 Danos ocasionados em cultivos agrícolas

Os gêneros de nematoides que mais causam danos em hortaliças no mundo são, respectivamente: *Meloidogyne*, *Pratylenchus, Heterodera*. *Ditylenchus*, *Globodera*, *Xiphinema*, *Radopholus*, *Rotylenchulus* e *Helicotylenchus* (RAVICHANDRA, 2014). De acordo com Bridge e Starr (2007) muitas das hortaliças como o tomate (*Lycopersicon esculentum*), a berinjela (*Solanum melongena*), o quiabo (*Hibiscus sabdariffa*), o pimentão (*Capsicum* spp.) e pepino (*Cucumis* spp.) são altamente suscetíveis ao ataque de *Meloidogyne*, sendo mais comumente encontradas nas hortaliças o *M. incognita* e *M. javanica*. Todavia, outros vegetais de

folhas e bulbos, como alface e cebola, também podem ser severamente danificados pelo nematoide, principalmente quando cultivadas em áreas temperadas.

Em hortaliças, as perdas estimadas em todo o mundo variam de 20 a 40%, devido à alta voracidade da espécie em estudo. Porém, as perdas de rendimento locais podem ser ainda maiores (BRIDGE; STARR, 2007). Ravichandra (2014) cita que as perdas globais de batata, berinjela, quiabo e tomate são, respectivamente, 12,2%, 16,9%, 20,4% e 20,6%.

Os danos causados por *Meloidogyne* é menor em pimentas, cebolas e legumes, o contrário em hortaliças. Devido aos danos causados no sistema radicular, as plantas afetadas pelo nematoide apresentam, acima do solo, os seguintes sintomas: crescimento atrofiado, redução do rendimento, clorose, murchamento e desfolha. Se a planta estiver sob estresse hídrico e de nutrientes, pode ocorrer a rachadura de frutos ou senescência precoce (BRIDGE; STARR, 2007).

4.2 CONTROLE BIOLÓGICO

Por se tratar de uma estratégia de grande importância para viabilizar a redução ou substituição do uso de agrotóxicos, o controle biológico de pragas e doenças é considerado peça chave para o desenvolvimento de sistemas de cultivos que garantam maior sustentabilidade através do manejo correto dos recursos naturais, de modo que satisfaça as necessidades humanas no que diz respeito à segurança fitossanitária do produto final.

Os estudos desenvolvidos por Parra (2006) destacam a importância e aplicabilidade do controle biológico e químico através de uma análise comparativa entre ambos métodos (Tabela 1). Uma das características mais evidentes é a especificidade dos produtos biológicos, pois para cada complexo ou espécie de praga, é necessária a escolha dos inimigos naturais específicos para tal controle de modo que não prejudique o desenvolvimento dos demais microrganismos benéficos presentes no ambiente.

Tabela 1 – Análise comparativa entre controle químico e controle biológico.

	Controle Químico	**Controle Biológico**
Número de ingredientes (agentes) testados	>1 milhão	2000
Taxa de sucesso	1: 200.000	1: 10
Custos para desenvolvimento	US$ 400 milhões	US$ 2 milhões
Tempo de desenvolvimento	10 anos	10 anos
Riscos de resistência	Grande	Pequeno
Especificidade	Muito pequena	Muito grande
Desequilíbrios	Muitos	Nenhum/poucos

Fonte: Parra (2006).

4.2.1 Conceito

Existe uma série de definições e conceitos, encontrados em diversas revisões de literatura, a respeito de controle biológico. Basicamente, trata-se do controle de um microrganismo por outro microrganismo, ou seja, é o resultado do mecanismo de densidade recíproca que consiste na regulagem de uma população por outra população (BUENO, 2000). DeBach (1968) descreveu sobre o conceito de controle biológico como “a ação de parasitóides, predadores e patógenos na manutenção da densidade de outro organismo a um nível mais baixo do que aquele que normalmente ocorreria nas suas ausências”. Posteriormente, Cook & Bakker (1983) complementaram e definiram o controle biológico por ser a redução da soma de inóculo ou das atividades determinantes da doença provocada por um patógeno, realizada por ou através de um ou mais organismo que não o homem.

Embora o controle biológico, segundo Chet e demais autores (1997), ser uma alternativa ecológica e natural que visa proteger a sanidade de plantas via substituição de métodos químicos pela utilização de microrganismos específicos, os quais interferem junto a organismos patogênicos e pragas causadoras de doenças, é recomendável o uso de bioprodutos juntamente com agrotóxicos, os quais sejam seletivos aos inimigos naturais, resultando na preservação dos agentes de controle biológico (PARRA; ZUCCHI, 2004).

4.2.2 Tipos de controle biológico

É importante ressaltar que existem dois tipos de biocontrole, o primeiro, denominado de controle biológico natural, envolve a manipulação do ambiente, visando o favorecimento da população composta por microrganismos benéficos (LUCON, 2008). Já o outro modo referente ao controle biológico aplicado, está relacionado com a introdução massal de antagonistas previamente selecionados.

4.2.2.1 Controle biológico natural

O biocontrole natural é um fenômeno que ocorre em todos os sistemas agrícolas e ecossistemas naturais, pois baseia-se em um conjunto de fatores abióticos e bióticos, os quais objetivam o equilíbrio natural das densidades populacionais no ambiente como um todo.

De acordo com DeBach e Rosen (1991) ao estudarem o controle biológico promovido por inimigos naturais, verificaram que 90% de todas as pragas agrícolas podem ser mantidas sob controle natural. Porém, devido ao uso contínuo e abusivo de agrotóxicos com baixa seletividade, os quais contribuem para o aumento da severidade de doenças e pragas, tanto as populações consideradas pragas quanto os inimigos naturais acabam sendo extintas (CRUZ et al., 2011).

4.2.2.2 Controle biológico aplicado

O biocontrole aplicado implica na manipulação de inimigos naturais introduzidos de forma inundativa no ambiente a fim de promover maior antagonismo entre as populações presentes no ambiente, e consequentemente, reduzir a população de espécies fitopatogênicas (GALLO et al., 2002). São reconhecidas três formas de aplicação deste tipo de controle, as quais podem ser clássico, conservativo e aumentativo, sendo distinguidas através do modo em que os inimigos naturais são manipulados.

4.2.2.2.1 Controle biológico aplicado - clássico

O biocontrole clássico segundo Cruz et al. (2011) é uma estratégia contínua e realizada em larga escala que implica na introdução de agentes de controle exóticos para determinada região nativa a fim de estabilizar o desenvolvimento de determinada população de praga. Embora seja um método que apresente muitos riscos em relação à segurança e efetividade, pois a implementação da espécie exótica em competição com o ambiente nativo pode resultar na exclusão de espécies nativas de seus habitats naturais ou até mesmo sua extinção, existem laboratórios de quarentena que minimizam estes riscos através de procedimentos regulados relacionados ao trabalho de quarentena, introdução de agentes de biocontrole e coleta de informações a respeito das espécies exóticas inseridas em determinado ambiente nativo (SCOPEL; ROZA GOMES, 2012). Há registros na literatura sobre resultados positivos a respeito da instalação desse programa, destacando-se o marco inicial em 1888 com a introdução da joaninha australiana *Rodolia cardinalis* (Coleoptera: Coccinellidae) para o controle do pulgão-branco-dos citros, *Icerya purchasi* (Hemiptera: Margarodidae) na Califórnia, EUA durante dois anos de estabelecimento da espécie exótica.

4.2.2.2.2 Controle biológico aplicado - conservativo

Cruz et al. (2011) definiu como o método de biocontrole de maior importância por ser imprescindível para o estabelecimento do equilíbrio ecológico, além de complementar qualquer método, seja o clássico ou o aumentativo. Portanto, referem-se a um conjunto de medidas que visam à conservação dos inimigos naturais presentes no ecossistema através de técnicas de manejo como o uso de produtos fitossanitários seletivos e preservação do habitat, com o intuito de promover uma maior diversidade de espécies benéficas para combater as pragas-alvo (BUENO, 2000).

4.2.2.2.3 Controle biológico aplicado - aumentativo

Com enfoque no aumento populacional de inimigos naturais em determinados habitats, este método se dá através de introduções e liberações periódicas de inimigos naturais, diferentemente do biocontrole clássico, o qual é realizado liberação continua

de inimigos naturais, sejam espécies exóticas ou nativas. (CRUZ et al., 2011). Perante isso, este programa é viável quando a população de inimigos naturais não possui número suficiente de indivíduos para controle da praga, mesmo que colonizado no período mais apropriado ou quando não se coloniza anualmente o habitat da praga.

Van Lenteren (2000) afirma que mais de 125 espécies de inimigos naturais são voltados para o biocontrole aumentativo estão disponibilizadas para comercialização a nível mundial., sendo obtidas após produção massal em laboratório. Todavia, perante ao potencial de escala de produção e número de espécies existentes, a viabilidade é considera baixa devido a diversos entraves como tempo de prateleira, armazenamento e logística de modo que evite-se exposição ao calor e raios ultravioletas, além das técnicas de aplicação e estabilidade do ingrediente ativo (microrganismo) sob variáveis condições ambientais. Assim, o desenvolvimento de novas formulações como o uso de enzimas degradantes de parede celular podem solucionar tais problemas e serem eficazes como nova ferramenta de manejo biológico.

4.3 ENZIMAS E SUAS PECULIARIDADES

As enzimas são proteínas que atuam como catalisadoras de reações químicas, podendo interferir em diversos processos celulares. Devido a sua especificidade e poder catalítico estão entre as biomoléculas mais notáveis (LEHNINGER et al., 1995; SCHMIDT; PENNACCHIOTTI, 2001). São constituídas principalmente por uma parte proteica que pode estar integrada a outras moléculas, como carboidratos e lipídeos (HARTMEIER, 1988). Esses heteropolímeros são formados por aminoácidos ligados covalentemente por ligações peptídicas. A estrutura primária das enzimas corresponde à sequência de seus aminoácidos; sua estrutura secundária corresponde à interação desses aminoácidos com aminoácidos adjacentes, formando arranjos espaciais do tipo α-hélice ou folha β. A estrutura terciária corresponde às interações entre aminoácidos não sequencialmente próximos, o que provoca torções e dobramentos; esta estrutura configura o sítio catalítico da enzima, o que é determinante para sua atividade biológica. Já a estrutura quaternária das enzimas corresponde à interação entre cadeias polipeptídicas (SANT'ANNA, 2001), essas características conferem as enzimas formas e características específicas.

Esta complexidade em sua estrutura molecular lhe conferem formas e características exclusivas, porém pode causar impedimentos para seu uso, devido a sua labilidade (SCHMIDT; PENNACCHIOTTI, 2001). Desta forma, para manter a estabilidade e a atividade requerida da enzima é preciso levar em conta fatores externos como a temperatura e a presença de compostos químicos os quais podem ativar ou inibir suas funções. Assim, quando uma enzima é considerada apropriada, esta precisa apresentar-se estável a uma determinada aplicação. Além disso, podem ser consideradas importantes em processos de visam a degradação de componentes tóxicos, principalmente em processos microbianos (XIA et al., 2017). Durante a fase de crescimento do microrganismo a síntese de enzimas é menor, pois são acumulados muitos compostos durante a fase de latência (RAJASEKARAN et al., 2008).

4.4 PROCESSAMENTO PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS MICROBIANAS

A produção artificial de enzimas é realizada principalmente mediante dois processos: extração de tecidos de plantas e animais ou mediante fermentações. A produção de enzimas microbianas por fermentação é maior devido às vantagens que esse processo oferece como baixo custo e produção em menor tempo (SCHMIDT; PENNACCHIOTTI, 2001).

4.4.1 Escolha do inóculo

A seleção do inóculo para os processos de fermentação passam por vários estágios, desde a pesquisa do microrganismo adequado até, às vezes, a modificação genética deste visando acrescentar a produção ou obter outros produtos desejados. O preparo do inóculo pode variar dependendo do processo, mas geralmente visa primeiramente, estabelecer condições ideais de desenvolvimento da cepa e adaptação ás condições requeridas do processo.

4.4.2 Processos fermentativos

Dentre os fatores que influenciam os processos de fermentação para a obtenção de enzimas, as características biológicas, químicas e físicas dos materiais

a serem utilizados nas reações, são muito importantes para garantir a viabilidade do processo (SHANMUGAM et al., 2008). Para a composição dos meios biológicos, deve haver uma adequada esterilização de todos os materiais utilizados, evitando-se assim qualquer tipo de contaminação externa, mantendo somente o inóculo do organismos de interesse. A composição química do meio de cultura, onde deverá ser inoculado o microrganismo em questão, deve conter níveis de concentrações adequada dos substratos utilizados, bem como os valores de pH e a comprovação da ausência de substâncias que possam inibir o processo de fermentação. Já para o meio físico, considera-se favorável quando permite o controle adequado de todas as condições de cultivo em fermentador, como a temperatura e agitação (MALAJOVICH, 2009). A final da fermentação separa-se a biomassa produzida por meio de filtração ou centrifugação. O liquido obtido já pode ser usado como preparado enzimático (SCHMIDT; PENNACCHIOTTI, 2001).

4.4.2.1 Fermentação em meio sólido

A fermentação em estado sólido (FES) pode ser definida como aquela que ocorre em substratos sólidos na ausência ou quase ausência de água. Porém, para que possa ocorrer o crescimento do microrganismo os substratos devem conter umidade suficiente (PANDEV; SOCCOL, 2001).

Entre os microrganismos que mais se adaptam a esse tipo de fermentação estão os fungos, os quais são mais favoráveis à alta produção de enzimas (OKAFOR, 2007). Entre as enzimas que podem ser produzidas em FES destacam-se amilases, proteases, xilanases, celulases e pectinases (KRISHNA, 2005). Estas são produzidas pelos fungos diretamente sobre substratos insolúveis em água, como cereais ou derivados de cereais, na presença de quantidades variáveis de água livre (MITCHELL; LONSANE, 1992).

Os substratos para a fermentação em estado sólido são, em geral, resíduos ou subprodutos da agroindústria (PANDEV, 2003; PATEL et al., 2017). Dentre estes se destacam: arroz, trigo, cevada, milho e soja, cana-de-açúcar, sabugo de milho, farelo de trigo e palha de arroz e outros são materiais considerados viáveis para a biotransformação (BON; PEREIRA, 1999; PINTO et al., 2005; PARIS, 2008). A estrutura desses materiais utilizados tem como seus principais componentes celulose, hemicelulose, lignina, amido, pectina e proteínas, o que os caracteriza como materiais

extremamente heterogêneos, e que servem tanto como fonte de carbono e energia quanto de suporte para o crescimento microbiano (PANDEV, 2003).

A fermentação em estado sólido apresenta vantagens como: a utilização de substratos com baixo valor agregado (meio de cultura simples), volume do meio reduzido, menor investimento em biorreatores, os esporos dos fungos podem ser usados diretamente na inoculação, não necessitando de etapas prévias de pré-cultivo, o crescimento dos fungos ocorre em condições semelhantes ao seu habitat natural, diminuição do risco de contaminação do meio, aeração facilitada, baixa demanda de energia, altos rendimentos na formação de metabólitos e facilidade nas etapas de purificação (PALMA et al., 2000; PANDEV; SOCCOL, 2001; GERVAIS; MOLIN, 2003).

Por outro lado, esse tipo de fermentação apresenta restrições quanto a sua aplicação como: restrição a microrganismos que são capazes de crescer em sistemas com baixa umidade, dificuldade no controle dos parâmetros da fermentação (risco de elevação excessiva da temperatura, regulação dos parâmetros pH e umidade), devidos, na maioria dos casos, à dificuldade de homogeneização do meio reacional e também pelos problemas difusionais (SATO; SUDO, 1999; PANDEV; SOCCOL, 2001; VON MEIEN; MITCHELL, 2002).

4.5 REAÇÕES ENZIMÁTICAS DESENCADEADAS NA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA DE PLANTAS AO ATAQUE DE PRAGAS/DOENÇAS

A riqueza e biodiversidade da fauna presente nos ecossistemas naturais reflete em um grande número de inimigos potencialmente prejudiciais às plantas, como bactérias, vírus, fungos, nematoides, ácaros, insetos, mamíferos e demais herbívoros. Assim, são necessários práticas e estratégias de manejo eficientes para controle de agentes causadores de pragas e doenças.

Em virtude disso, a inexistência de sistema imunológico associado à imobilidade das plantas através da ocorrência de estresses bióticos ocasionados por insetos, promovem alterações fisiológicas em processos bioquímicos conferindo-lhe proteção através dos mecanismos indutores de resistência em plantas (HILDEBRAND et al., 1986; RAMAMOORTHY et al., 2001; FERRY et al., 2004; HOWE; JANDER, 2008; MITHÖFER; MAFFEI, 2016). Dentre as adaptações em células vegetais desencadeadas por ataque de patógenos e pragas, podem ocorrem a ativação de dois tipos de mecanismos de defesa: passiva ou pré-existente e ativa ou induzida

(MITHÖFER; BOLAND, 2012). A defesa passiva ou pré-existente ocorre independentemente do ataque ou não realizado por determinado herbívoro e é definida pela presença permanente de dispositivos de proteção, tais como, barreiras físicas que compõem a estrutura de plantas, além de compostos tóxicos sintetizados, como proteínas, metabólitos secundários e peptídeos, os quais previnem a infecção dos tecidos vegetais (HEATH, 2000; RIZZARDI et al., 2003). Já a defesa ativa ou induzida ocorre em consequência ao ataque dos insetos, cujos hábitos alimentares podem induzir alterações em suas plantas hospedeiras, incluindo mudanças morfológicas e sintomas como clorose, necrose, má formação de novos ramos e uma senescência acelerada (GOGGIN, 2007).

A maioria das respostas que ocorrem nas plantas devido ao ataque de insetos, acontecem na parede celular, como morte das células, produção de fitoalexinas, acúmulo de proteínas e caloses relacionadas à defesa da planta através do fortalecimento e lignificação da camada cuticular e liberação de compostos voláteis e fluxo de íons via membrana plasmática (PARANIDHARAN et al., 2003; GOGGIN, 2007; ALMAGRO et al., 2009).

Tanto os fitopatógenos, como os insetos quando atacam as plantas provocam uma resposta rápida com uma “explosão oxidativa”, nesta ocorre a produção de espécies reativas de nitrogênio (ERNs) e, em destaque na próxima seção do capítulo, as espécies reativas de oxigênio (EROs), principalmente radicais hidroxila (OH-), ânion superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H2O2) (BOWLER; FLUHR, 2000; HU et al., 2009).

O H_2O_2 é a principal espécie reativa de oxigênio, esta causa a indução de genes de defesa e a polimerização de proteínas que compõe a parede celular, além de estimular a produção de enzimas antioxidativas ou de limpeza (LUKASIK, 2012). Já o ânion superóxido (O2-), segundo HALLIWELL (2006) é considerado mais reativo que OH- e, apesar da possibilidade das células sofrerem danos oxidativos de acordo com os níveis de O2- presentes nos tecidos vegetais, esta ERO pode impedir diretamente a infestação subsequente de pragas, corrobora (VRANOVÁ, 2002).

Diante disso, a reação de enzimas como oxidases e peroxidases presentes na membrana plasmática associada à produção de EROs resultam em danos celulares e consequentemente morte da células indesejadas (RIZZARDI et al., 2003). Porém, o excesso de produção de EROs, especificamente radicais hidroxila (OH-), podem gerar morte das células vegetais das plantas ou cultivos agrícolas em interesse devido à

alta reatividade com moléculas e demais constituintes das células, além da dificuldade de excreção por processos enzimáticos (VRANOVÁ, 2002; GILL; TUTEJA, 2010).

Essas formas de defesa tem sugerido que a síntese ou o aumento da expressão de enzimas específicas nas plantas podem auxiliar no aumento de resistência delas aos insetos (FELTON et al., 1994; NASCIMENTO; BARRIGOSSI, 2014).

4.6 APLICABILIDADE DE ENZIMAS MICROBIANAS EM SISTEMAS AGRÍCOLAS

Alguns tipos de enzimas tem capacidade de auxiliar no controle de pragas agrícolas, podendo apresentar capacidade degradativa da parede celular de patógenos (BAR-SHIMON et al., 2004; FLEURI; SATO, 2008; IORIO et al., 2008).

4.6.1 β-1,3-glucanases

A β-1,3-glucanase atua em substratos com sequências lineares de glucose, tais sequências possuem ligações glicosídicas tipo β-1,3 (BARSANTI et al., 2001). Elas atuam por meio de hidrólises sucessivas no extremo não-redutor da glucana resultando na formação de oligossacarídeos e glucose (SUTHERLAND, 1999). A enzima β-1,3-glucanases é importante para atrasar o crescimento de fungos patogênicos e diminuir os danos provocados de doenças em frutos. A aplicação dessa enzima é possível devido a composição da parede celular de certos microrganismos que contém especialmente β-glucanas (FLEURI; SATO, 2008; IORIO et al., 2008).

Senthilraja et al. (2013) avaliaram o efeito da interação de rizobactérias promotoras de crescimento vegetal e fungos entomopatogênicos sob diferentes formulações através da expressão de enzimas indutoras de defesa para combate de patogênese em amendoim. Estes autores observaram índices mais elevados de β-1,3-glucanases sintetizadas por inseto minador (*Aproaerema modicella*) e agente causador da podridão do colo (*Aspergillus niger*) quando as plantas foram inoculadas com formulações à base de células de *Beauveria bassiana* e *Pseudomonas fluorescens*. Assim, o acúmulo de enzimas sintetizadas em plantas podem aumentar os níveis de resistência em confronto com pragas e/ou agentes fitopatogênicos através da produção de anticorpos e maior vigor de plantas devido à maior sanidade nutricional e fitossanitária.

4.6.2 Lipases

As lipases catalisam as reações de hidrólise de ligações éster de lipídeos, resultando em álcoois e ácidos graxos (JAEGER; EGGERT, 2002). As lipases são aplicadas no processamento de produtos químicos orgânicos, no processamento de detergentes, na síntese de biosurfactantes, na indústria oleoquímica, na indústria de laticínios, na indústria agroquímica e no processamento farmacêutico. As características quiral e anti-inflamatória das lipases aumentaram a importância e a demanda dessas enzimas em métodos eficientes de atividade biológica (UNDURRAGA et al., 2001; XIN et al., 2001).

As lipases microbianas são o principal tipo de lipases produzidas comercialmente, dentre estas destacam-se os fungos, os quais são mais utilizados, pois geralmente as enzimas fúngicas são secretadas extracelularmente, simplificando a extração nos meios de fermentação (PANDEY et al., 1999). Entre os fungos, *M. anisopliae* é o entomopatógeno filamentos mais estudado, por vários tipos de pragas ter sido controlado extensivamente pela lipase produzida pelo mesmo (SIEROTZKI et al, 2000).

“As lipases podem ser consideradas como enzimas de maior importância na fisiologia e patogênese de *Beauveria bassiana*”. Mediante hipótese citada por Dhawan; Joshi (2017), o estudo refere-se ao uso de quatro isolados de *Beauveria bassiana* para o controle de *Pieris brassicae L*. em fase larval (3º ínstar), a qual é voraz na alimentação de folhas, gerando prejuízos econômicos na cultura das brassicas. Ao compararem os efeitos de patogenicidade das atividades enzimáticas, os autores obteram diferenças significativas nos valores médios referentes aos níveis de lipase e o efeito da enzima em diferentes dias de incubação, onde a estirpe de MTCC 4495 apresentou-se como mais patogênica devido a maior atividade média da lipase. Sanchez-Perez et al. (2016) comprovaram a possibilidade de uso, como agentes de biocontrole na área agrícola, a partir de mistura de extratos enzimáticos (lipase, protease e quitinase) com conídios de *Beauveria bassiana* em *Metamasius spinolae* (inclui-se entre as principais pragas de cactos) e *Cyclocephala lunulata*, praga de importância agrícola em inúmeras culturas (cana de açúcar, milho, alfafa, café, batata, alface e cebola). Demais autores corroboram com o pressuposto destacando o modo de ação desta enzima, onde atuam nas etapas de penetração e

adesão da cutícula através da hidrólise de ligações éster de lipídios presentes no interior do tegumento de insetos (ALI et al., 2009; SILVA et al., 2010)

4.6.3 Pectinases

As pectinases são caracterizadas por atuarem através de reações de desesterificação e despolimerização, estando entre as mais estudadas as que são capazes de degradar cadeias de homogalaturonana da pectina (JARAMILLO, 2014).

Esse tipo de enzima é de grande importância em plantas pois atua no amolecimento de certos tipos de tecidos vegetais durante o amadurecimento e armazenagem além de auxiliar na extensão da parede celular vegetal (MURAD; AZZAZ, 2011).

Vatanparast et al. (2014) avaliaram as condições ótimas sob efeito do pH (perfil e estabilidade) e temperatura na atividade enzimática de pectinases e celulases, as quais ampliam a susceptibilidade de plantas para atividade das demais enzimas através da degradação de componentes da parede celular como a hemicelulose (CALDERÓN-CORTÉS et al., 2012), justificando-se a presença de pectinases e celulases no sistema digestivo de *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Curculionidae), cujo gorgulho é uma das principais pragas das palmeiras. Os resultados obtidos demonstram maior ação das enzimas na parte intermediária do intestino na fase larval do inseto. Todavia, as melhores condições estáveis de pH para pectinases variam de 6.0 (acidificado) a 8.0 (alcalino), sendo o pH 7.0 mais estável de acordo com a variação do tempo de incubação, já para temperatura, ambas enzimas apresentam máxima ação à 50ºC. Assim, a partir de uso de tecnologias voltadas para a agricultura, baseadas na área na genética vegetal, é possível introduzir novas variedades de palmeiras resistentes através do extrato enzimático obtido na seção intermediária intestinal do gorgulho, e consequentemente, amplia-se o leque de estratégias para o manejo de pragas.

4.6.4 Proteases

As proteases são as enzimas importantes do ponto de vista comercial devido às suas múltiplas utilizações na indústria (FEIJOO-SIOTA; VILLA, 2011). Caracterizam-se pela hidrólise de ligações peptídicas em proteínas e peptídeos,

podendo atuar perto das extremidades das cadeias polipeptídicas (exopeptidases) ou dentro delas (endopeptidases) (PALMA et al., 2002). São enzimas que realizam modificações extremamente específicas e seletivas em proteínas e participam de processos metabólicos (RAO et al., 1998), são encontradas em animais e plantas, bem como em microrganismos (SHARMA et al., 2006). Baseado em estudos sobre biossíntese e fisiologia em plantas associado à regulação de compostos metabólicos gerados em resposta ao ataque de herbívoros (RYAN, 1990; DANG; VAN DAMME, 2015), as proteases, enzimas indutoras de resistência, são de suma importância pela abrangência em combater patógenos e pragas de relevância agrícola (MACEDO et al., 2003; HAQ et al., 2004; MITTAL et al., 2014; JALALI et al., 2015; KEPPANAN et al., 2017). São classificadas de acordo com o seu mecanismo catalítico, que atua especificamente no sítio ativo da enzima. O banco de dados MEROPS considera sete famílias de proteases: aspártica, cisteína, glutâmica, metalona, asparagina, serina e treonina respectivamente. Em plantas, foram descritas cinco classes de endoproteases: serina, cisteína, aspártica, metalona e treonina protease (AKO; NIP, 2007). Segundo Dang; Van damme (2015), a maioria das inibidores de proteases em plantas pertencem à classe das serinas.

Keppanan et al. (2017) avaliaram o efeito tóxico da enzima protease extracelular extraída e purificada a partir de três isolados de *Metarhizium anisopliae* sobre o inseto *Galleria mellonella*, popularmente conhecida como traça da cera devido seu hábito alimentar, pois tem preferência por favos de mel, sendo uma das principais pragas da apicultura. Todos os isolados (Tk6, Tk29 e Tk37) ao serem confrontados com lagartas de *Galleria mellonella* em 5º estágio de desenvolvimento larval, apresentam ação inseticida no controle da praga, onde Tk6 obteve maiores níveis de mortalidade da praga em interesse no estudo. Tais resultados justificam a eficácia tóxica da protease extracelular em pragas, podendo ser considerada ferramenta útil para novas estratégias de manejo.

Demais estudos demonstram a eficiência de extratos proteicos inibidores da tripsina em sistema digestivo dos insetos. Mittal et al. (2014) avaliaram extratos potencialmente inibidores de tripsina e de proteases presentes em dez variedades de *Phaseolus vulgaris* (feijão-rim) para verificação do efeito inseticida em *Helicoverpa armigera* e *Spodoptera Litura*, pragas altamente polífagas em diversas culturas agrícolas e extremamente vorazes e danosas. Os resultados obtidos, in vitro, demonstram que a cultivar IC-260299 apresentou o maior índice de inibição de tripsina

e protease presentes no intestino em *Helicoverpa armigera* com 91,7% e em *Spodoptera Litura* com 29,0%, não diferindo significativamente da cultivar IC-260307 com 29,2%. Ademais, em bioensaios in vivo com os insetos, houve maior eficácia da protease inibidora de tripsina em *H. armigera* com 46,7% de mortalidade e 13,3% em *S. litura*, além de gerar outras interferências nos ciclos de vida, como redução no crescimento dos insetos na fase larval (40% em *H. armigera* e 22% *S. litura*) e atraso na fase de pupa (3 e 2 dias respectivamente). Ratificando o estudo precedente, Jalali e demais autores (2015) avaliaram o potencial inibitório por enzimas proteases extraídas de sementes de *Cassia Angustifolia* (Sene) e *Trigonella foenum-graecum* (feno-grego) sobre *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae), espécie polífaga causadora de perdas em grãos e cereais. Os resultados deste estudo mostrou altos índices de bloqueio de ação da tripsina no sistema digestivo em larvas de *P. interpunctella* através do substrato proteico Nα-benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide, sendo 99.79% ± 7.5% de inibição por *Cassia Angustifolia* e 61.29 ± 2.2% de inibição por *Trigonella foenum-graecum*.

4.6.5 Quitinases

A quitinase é caracterizada pela clivagem de ligações entre C1 e C4 de duas N-acetil D-glicosaminas (CLARKE; TRACEY, 1956), são enzimas que degradam a quitina quer aos seus oligómeros (endoquitinases) quer aos dímeros e monómeros (exoquitinases) (HAMID et al., 2013) e possuem diferentes funções em diversos organismos, podendo ser encontrada em plantas, insetos, leveduras, sendo principalmente isoladas de fontes bacteriana e fúngica.

As enzimas quitinolíticas apresentam aplicação no ramo da indústria e agricultura, com ênfase no controle de fungos patogênicos e insetos, sendo geralmente sugeridos para a proteção biológica de culturas, podendo ser usadas como complementos aos pesticidas para aumentar a sua eficácia contra agentes patogênicos e reduzir as concentrações dos produtos químicos (PATIL et al., 2000; LI, 2006; SEIDL, 2008). Estes efeitos relacionam-se com a hidrólise de quitina na parede celular fúngica e carapaça de inseto, respectivamente (FLEURI; SATO, 2005).

Convém ressaltar que a quitina é o maior componente estrutural da parede celular da maioria dos fungos, sendo, susceptível a inúmeras espécies de bactérias, actinomicetos e fungos que podem agir como antagonistas devido à produção de

enzimas quitinolíticas (SAHAI; MANOCHA, 1993). As quitinases possuem uma dupla função durante a colonização dos fungos (COLLINGE et al., 1993). Apresentam a capacidade de ataque direto à parede celular dos fungos, estas permitindo a libertação de oligo-N-acetilglucosaminas que funcionam como eliciadores na ativação de respostas relacionadas com a defesa em células de plantas (GOHEL et al., 2006). Estudos a partir da quitinase vêm sendo realizados à algum tempo. Wiwat et al. (1999) produziram quitinase a partir de *Bacillus circulans* para uso como suplemento de bioinseticida de *B. thuringiensis* para controle de larvas de lepidópteras. Zhang e Yuen (1999) utilizaram um sistema lítico composto por quitinase, protease, b-1,3 glucanase e lipase para controle de manchas nas folhas de centeio, causadas por *Biopolaris sorokiniana*. Shaukat et al., (2010) avaliaram a eficácia do filtrado de isolados de *Isaria fumosorosea* contra *Plutella xylostella*, a qual foi cultivada sob condição estabelecidas e o filtrado de cultura foi analisado para protease (Pr1,Pr2), quitinases, quitosanase e lipase, onde os resultados obtidos foram potentes reduzindo a taxa de alimentação e alterações no peso corporal das larvas também foi obsevado. Justificando assim o desenvolvimento de biopesticidas à base de enzimas contra *P. xylostella*.

Chandrasekaran et al., (2014) relataram bons resultados ao utilizar a enzima quitinase para o controle de *Spodoptera litura*. A quitinase isolada de *B. subtilis* reduziu eficazmente a atividade da enzima do intestino e o crescimento de *S. Litura*, quando estas foram alimentadas com folhas tratadas om quitinase.

Ray et al., (2016) relatou em seu estudo que duas quitinases produzidas da larva de *Spodoptera frugiperda* eliminam as defesas dos herbívoros enquanto induzindo simultaneamente à defesas patogênicas no milho (*Zea mays*). Quando aplicaram as quitinases ao milho às folhas induziram a expressão do marcador do gene de defesa do patógeno.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 ENSAIOS PRELIMINARES

Os experimentos relacionados à produção dos extratos enzimáticos fúngicos e determinação das atividades enzimáticas presentes no meio fermentativo foram conduzidos no laboratório de Bioprocessos da Universidade Federal de Santa Maria – Rio Grande do Sul.

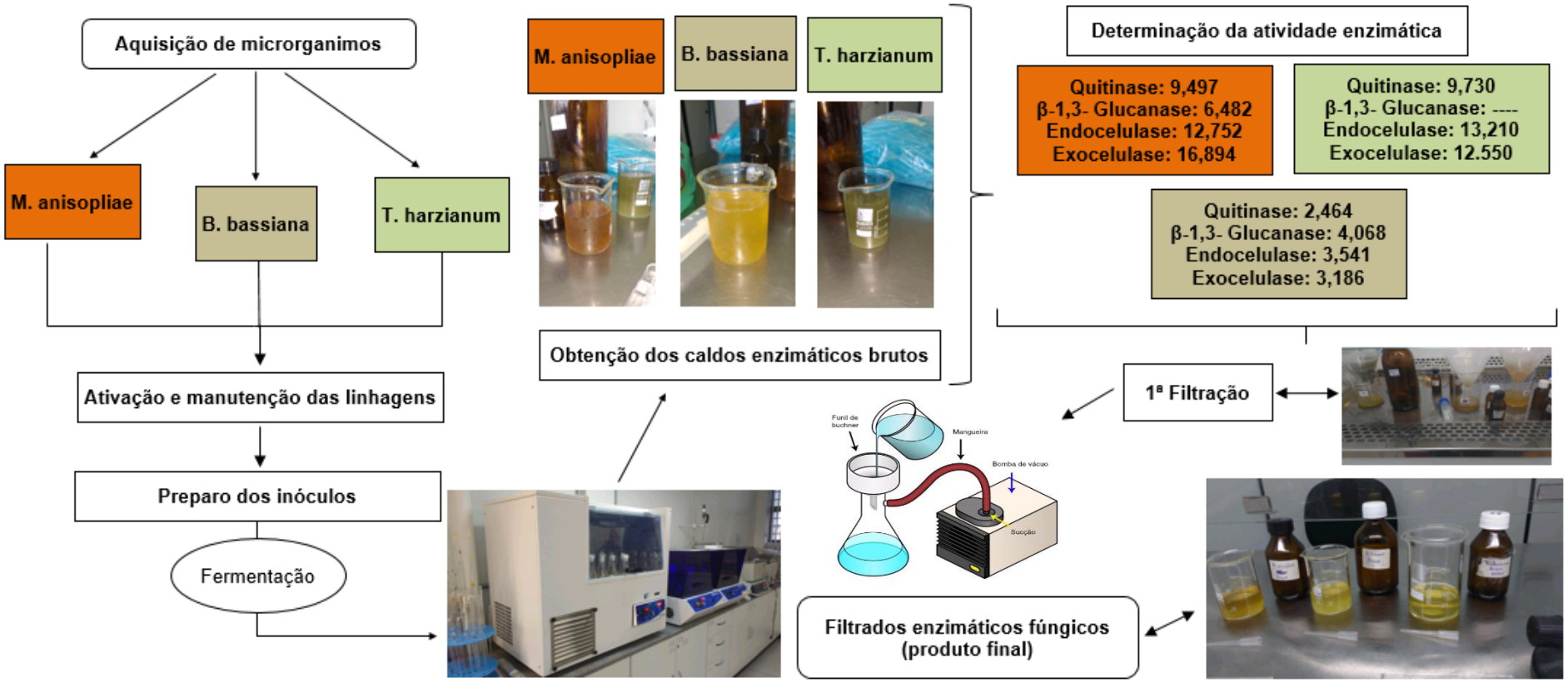
A seguir, na Figura 5, explica-se através do fluxograma, de forma objetiva e sucinta, todas as atividades realizadas desde a aquisição dos microrganismos em estudo até a obtenção dos produtos finais desejados. Para a realização dos ensaios nematológicos, três cepas foram adquiridas do banco de fungos do Instituto Biológico, localizado em Campinas, SP. São elas: *Metarhizium anisopliae* (IBCB 425), *Beauveria bassiana* (IBCB 66) e *Trichoderma harzianum* (MMBF 58/09).

Foram realizados os processos de ativação e manutenção das linhagens em meio BDA (batata, dextrose e ágar) em placas de Petri. Para o pré-inóculo, um tubo Falcon de 15 mL foi armazenado em estufa a 28ºC por 24 horas. Na sequência, o fungo previamente inoculado em meio BDA foi transferido para um tubo Falcon de 50 mL contendo 10 mL de meio BD (batata e dextrose) e solução de nutrientes (2 g.L-1 de (NH4)2SO4, 1 g.L-1 de FeSO4•7H2O, 1 g.L-1 de MnSO4•H2O, 0,5 g.L-1 MgSO4•7H2O e 1 g.L-1 de K2HPO4), sendo armazenado em estufa a 28ºC durante 24 horas. Posteriormente, este volume foi transferido a um Erlenmeyer de 250 mL contendo 90 mL do mesmo meio, completando assim, 100 mL de solução de BD, nutrientes e células dos microrganismos. O pré-inóculo foi incubado em agitador orbital (New Brunswick, modelo Innova 44) a 120 rpm e 28ºC por três dias.

Os caldos enzimáticos fúngicos foram produzidos em Erlenmeyers de 250 mL, durante sete dias, em agitador orbital (New Brunswick, modelo Innova 44). via fermentações em estado sólido e submersa utilizando diversos substratos como sacarose, bagaço de malte, farelo de arroz, quitina de caranguejo moída e água de maceração de milho. Fixou-se um pH inicial de 7,0 (nível dentro da faixa do ótimo desenvolvimento para todos os microrganismos), agitação de 150 rpm e temperatura de 28ºC. Foram inoculados 10 mL de pré inóculo em 90 mL do substrato correspondente em todos os Erlenmeyers. Para obtenção dos filtrados, o procedimento foi feito à vácuo, com papel filtro qualitativo, marca Quanty, Cinza-007,

diâmetro de 11cm para retirada da biomassa contendo esporos, micélio e células microbianas, os quais são materiais indesejáveis de acordo com a finalidade do presente estudo. Vale ressaltar também que as atividades enzimáticas são referentes a uma única amostra representativa (Tabela 1), mas, para os ensaios posteriores envolvendo aplicação dos extratos enzimáticos, esta amostra somada as demais referentes a um determinado isolado fúngico foram misturadas. Portanto, não sabe-se a concentração exata dos caldos enzimáticos posteriormente aplicados nos ensaios, pois entende-se que por serem microrganismos recém adquiridos pelo banco de fungos do laboratório e a pesquisa científica em si apresentar caráter inovador na área de biotecnologia agrícola em âmbito nacional, é fundamental conhecermos a viabilidade e funcionalidade básica dos extratos enzimáticos no controle de fitonematóides como pilar para novos estudos específicos.

Figura 5 – Fluxograma dos processos realizados para obtenção dos extratos.



5.2 ENSAIOS NEMATOLÓGICOS

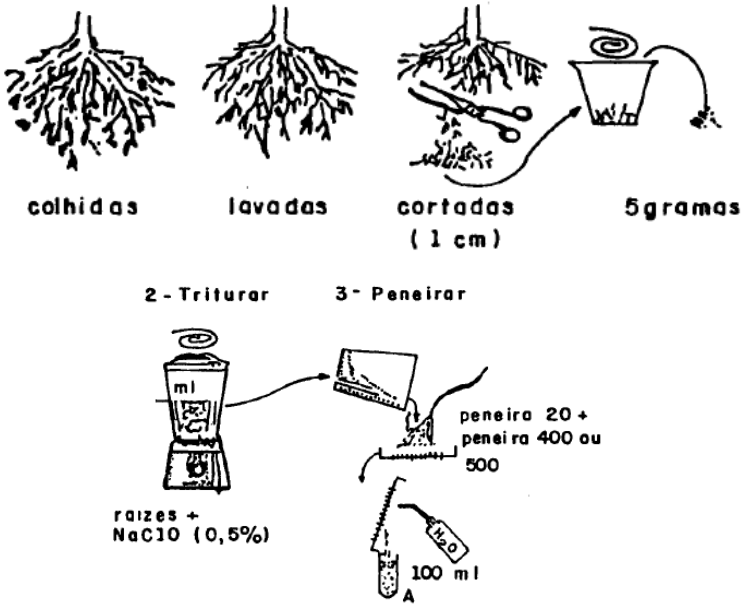
Os ensaios para seleção e avaliação do efeito nematicida em decorrência da aplicação de caldos enzimáticos fúngicos no controle de ovos e juvenis de *M. javanica* in vitro e in vivo sob culturas de alface e tomate em estágios iniciais de desenvolvimento foram conduzidos, em parceria no laboratório de defesa fitossanitária do Instituto Federal Farroupilha localizado em São Vicente do Sul, RS, a qual cedeu toda a infraestrutura necessária, além do nematoides extraídos pertencentes ao banco de inóculo (Figura 6).

Figura 6 – Banco de inóculo mantido em sala de cultivo sob temperatura, umidade e luz controladas.

5.2.1 Extração de ovos e juvenis de *M. javanica* via raízes

A suspensão de ovos foi obtida pelo método proposto por HUSSEY & BARKER (1973) conforme demonstra a Figura 7.

Figura 7 – Método de extração via raízes de massa de ovos de nematóides.



Fonte: HUSSEY & BARKER (1973).

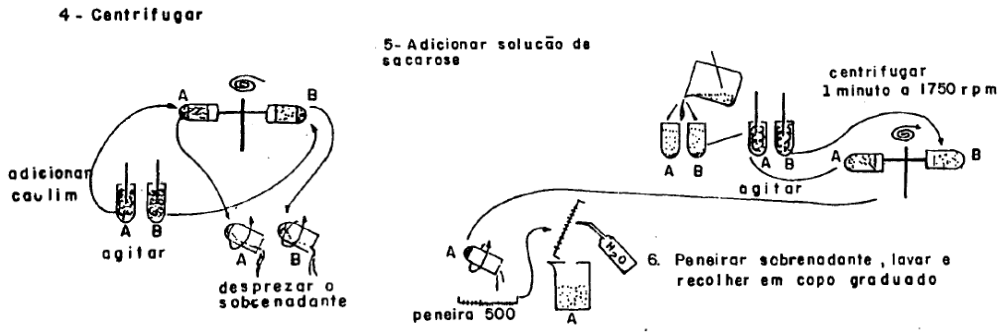
Primeiramente, lavou-se as raízes em água corrente e são cortados pedaços de 1cm de comprimento. Misturou-se bem e foi separada uma amostra de 5g de raízes. Em seguida, triturou-se a amostra em liquidificador contendo 250mL de água destilada e 2mL de hipoclorito de sódio a 0,1% por 30 a 45 segundos.

Na sequência, a suspensão foi vertida através de peneiras de malhas 20 e 400 mash, recuperando o retido na peneira de 400 mash em água destilada com auxílio de uma pisseta, transferindo-o para um béquer.

Colocou-se a suspensão em tubo de centrifuga, adicionando uma colher de chá de Caulin, e agitou-se bem. Os tubos foram centrifugados durante cinco minutos na faixa de 1800 a 2000 rpm. Após o processo de centrifugação, o sobrenadante foi eliminado, limpando os bordos do tubo com papel toalha (Figura 8). Posto a isto, adicionou-se sacarose e homogeneizou-se bem a amostra. Novamente, a amostra é

centrifugada durante um minuto. Ao término do período, os tubos são retirados é retidada rapidamente e verteu-se a amostra sobre uma peneira de 500 mash lavando em seguida com água destilada para eliminar resíduos de sacarose. Com auxílio de uma pisseta, recuperou-se material sedimentado na peneira, depositando em recipiente (béquer) conforme a Figura 8.

Figura 8 – Etapas finais do processo de extração de nematoides via raízes.



Fonte: HUSSEY & BARKER (1973).

Para obtenção de juvenis (J2) via eclosão de ovos da suspensão, utilizou-se o método de funil de Baermann modificado (PITCHER; FLEGG, 1968), onde faz-se o mesmo processo anterior, lavando as raízes em água corrente e cortando-as em pedaços de 1cm de comprimento obtendo5g de amostra. Colocou-se em um liquidificador e bateu-as somente com água destilada durante cinco minutos. Posteriormente, limpou-se as bordas e tampa do recipiente com auxílio de uma pisseta e bate-se por mais três minutos.

O material obtido foi retido em um funil de Baermann modificado, com folha dupla de lenço Kleenex® e incubado em BOD a 28°C por 48 horas (Figura 9).

Figura 8 – Funis instalados para eclosão de juvenis (J2) de *M. javanica*.

5.3 AVALIAÇÃO IN VITRO DO EFEITO NEMATICIDA PROVENIENTE DOS CALDOS ENZIMÁTICOS SOBRE O ÍNDICE DE INIBIÇÃO DE ECLOSÃO DE OVOS DE *M. JAVANICA*

Neste ensaio, o delineamento estatístico utilizado foi inteiramente casualizado com oito repetições por tratamento em três períodos de incubação. Os tratamentos (Figura 9), ao todo dezessete, foram dispostos em placas de Elisa onde, cada cavidade, aplicou-se 100µL de suspensão de *M. javanica*, previamente quantificada sem quaisquer aplicações dos caldos (Anexo A), e posteriormente, insere-se 100µL dos caldos enzimáticos fúngicos formado por diversas proporções consorciadas de cada espécie conforme o Quadro 1, totalizando 136 unidades experimentais.

Figura 9 – Croqui referente à disposição dos tratamentos (a) nas placas de Elisa (b).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	T1	T16	T12	T7	T3	T6	T10	T17	T2	T8	T14	T11
B	T1	T16	T12	T7	T3	T6	T10	T17	T2	T8	T14	T11
C	T1	T16	T12	T7	T3	T6	T10	T17	T2	T8	T14	T11
D	T1	T16	T12	T7	T3	T6	T10	T17	T2	T8	T14	T11
E	T1	T16	T12	T7	T3	T6	T10	T17	T2	T8	T14	T11
F	T1	T16	T12	T7	T3	T6	T10	T17	T2	T8	T14	T11
G	T1	T16	T12	T7	T3	T6	T10	T17	T2	T8	T14	T11
H	T1	T16	T12	T7	T3	T6	T10	T17	T2	T8	T14	T11

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A				T15	T9	T5	T13	T4				
B				T15	T9	T5	T13	T4				
C				T15	T9	T5	T13	T4				
D				T15	T9	T5	T13	T4				
E				T15	T9	T5	T13	T4				
F				T15	T9	T5	T13	T4				
G				T15	T9	T5	T13	T4				
H				T15	T9	T5	T13	T4				

a

b

Quadro 1 – Descrição dos tratamentos aplicados nos ensaios de índice de inibição de eclosão de ovos de *M. javanica* e índice de mortalidade em juvenis de *M. javanica* (J2).

T1	100 microlitros nematóides (ovos) + 100 microlitros água destilada estéril
T2	100 microlitros nematóides (ovos) + 100 microlitros caldo *M.anisopliae*
T3	100 microlitros nematóides (ovos) + 100 microlitros caldo *B.bassiana*
T4	100 microlitros nematóides (ovos) + 100 microlitros caldo *T.harzianum*
T5	100 microlitros nematóides (ovos) + 75 microlitros caldo *M.anisopliae* + 25 microlitros caldo *B.bassiana*
T6	100 microlitros nematóides (ovos) + 50 microlitros caldo *M.anisopliae* + 50 microlitros caldo *B.bassiana*
T7	100 microlitros nematóides (ovos) + 25 microlitros caldo *M.anisopliae* + 75 microlitros caldo *B.bassiana*
T8	100 microlitros nematóides (ovos) + 75 microlitros caldo *B.bassiana* + 25 microlitros caldo *T.harzianum*
T9	100 microlitros nematóides (ovos) + 50 microlitros caldo *B.bassiana* + 50 microlitros caldo *T.harzianum*
T10	100 microlitros nematóides (ovos) + 25 microlitros caldo *B.bassiana* + 75 microlitros caldo *T.harzianum*
T11	100 microlitros nematóides (ovos) + 75 microlitros caldo *M.anisopliae* + 25 microlitros caldo *T.harzianum*
T12	100 microlitros nematóides (ovos) + 50 microlitros caldo *M.anisopliae* + 50 microlitros caldo *T.harzianum*
T13	100 microlitros nematóides (ovos) + 25 microlitros caldo *M.anisopliae* + 75 microlitros caldo *T.harzianum*
T14	100 microlitros nematóides (ovos) + 50 microlitros caldo *M.anisopliae* + 25 microlitros caldo *B.bassiana* +25 microlitros caldo *T.harzianum*
T15	100 microlitros nematóides (ovos) + 25 microlitros caldo *M.anisopliae* + 50 microlitros caldo *B.bassiana* +25 microlitros caldo *T.harzianum*
T16	100 microlitros nematóides (ovos) + 25 microlitros caldo *M.anisopliae* + 25 microlitros caldo *B.bassiana* + 50 microlitros caldo *T.harzianum*
T17	100 microlitros nematóides (ovos) + 33 microlitros caldo *M.anisopliae* + 33 microlitros caldo *B.bassiana* + 33 microlitros caldo *T.harzianum*

Por conseguinte, as placas foram mantidas fechadas com papel alumínio e colocadas em BOD a 25ºC, no escuro. A avaliação do índice inibitório dos ovos foi feita, adaptadamente, após 24, 48 e 72 horas (SILVA et al., 2002) através da seguinte equação:

$$IC = (ONe/T)*100 \qquad (1)$$

Onde:

IC = Índice de inibição de ovos (%);

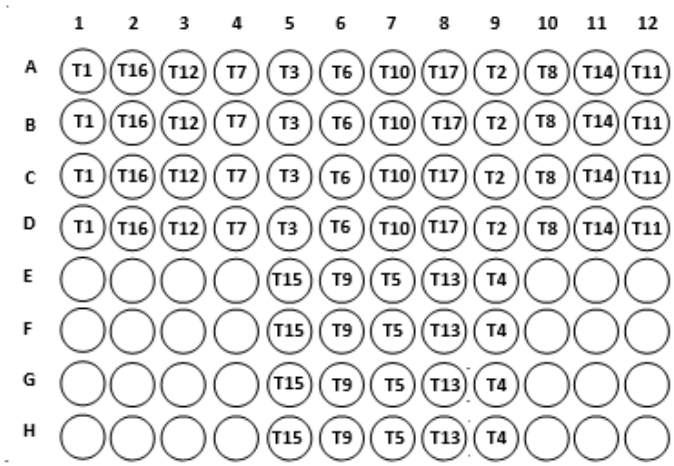
ONe = número de ovos não eclodidos;

T = número total de ovos na contagem inicial.

5.4 AVALIAÇÃO IN VITRO DO EFEITO NEMATICIDA PROVENIENTE DOS CALDOS ENZIMÁTICOS SOBRE O ÍNDICE DE MORTALIDADE DE JUVENIS (J2) DE *M. JAVANICA*

Neste ensaio, o delineamento estatístico utilizado foi inteiramente casualizado com quatro repetições por tratamento em três períodos de incubação. Os tratamentos (Figura 10), ao todo dezessete, são dispostos em placas de Elisa onde, cada cavidade, aplicou-se 100µL de suspensão de *M. javanica*, previamente quantificada, contendo 15 juvenis por tratamento contabilizados em câmara de Peters, sem quaisquer aplicações dos caldos (Anexos B, C e D), e posteriormente, insere-se 100µL dos caldos enzimáticos fúngicos formado por diversas proporções consorciadas de cada espécie conforme o Quadro 1 exposto anteriormente, totalizando 68 unidades experimentais.

Figura 10 – Croqui referente à disposição dos tratamentos (a) nas placas de Elisa (b).



a

b

Em vista disso, as placas foram mantidas fechadas com papel alumínio e colocadas em BOD a 25ºC, no escuro. A avaliação de mortalidade foi adaptada após 8, 16 e 24 horas (SILVA et al., 2002) através da aplicação de 10µL de NaOH 0,1% em cada cavidade da placa e, pela seguinte equação:

$$IC = (Ni - TNin)/(TNa)*100 \quad (2)$$

Onde:

IC = Índice de mortalidade de juvenis (%);

Ni = número de juvenis inativos;

TNin = número de juvenis inativos na contagem inicial;

TNa = número de juvenis ativos na contagem inicial.

5.5 AVALIAÇÃO DE DANOS OCASIONADOS POR *M. JAVANICA* SOB CONTROLE APLICADO DE EXTRATOS ENZIMÁTICOS EM ESTÁGIO INICIAL DE DESENVOLVIMENTO DA CULTURA DA ALFACE

Neste ensaio, realizado na sala de cultivo do laboratório de defesa fitossanitária do IFFar, o delineamento estatístico utilizado foi inteiramente casualizado com 10 repetições por tratamento. Os tratamentos (Quadro 2), ao todo quatro, foram considerados os três melhores tratamentos obtidos nos ensaios in vitro somado a testemunha (controle) para a realização do estudo. Por se tratar de um ensaio de maior escala e necessidade de maior volume de extratos enzimáticos, aplicou-se a quantidade proporcional ao utilizado nas placas de Elisa, cuja área de trabalho foi de 200µL.

Foram utilizados copos plásticos de 550cm^3 com areia pré-lavada como substrato. Em maio, implantou-se as mudas da cultivar Irene (altamente suscetível ao ataque de *M. javanica*), as quais foram mantidas sob condições hídricas e nutricionais recomendáveis para a cultura através do uso de água morna e solução nutritiva completa (macro e micronutrientes). Todavia, observa-se na Figura 11 que o ensaio foi transferido para a sala de cultivo devido à más condições de clima e temperatura.

Figura 11 – Mudas da cultivar Irene implantadas.

Quadro 2 – Descrição dos tratamentos aplicados nos ensaios de danos ocasionados por *M. javanica* no estágio de desenvolvimento inicial da cultura da alface.

T1	20mL da suspensão nematóides + 20mL água destilada estéril
T2	20mL da suspensão nematóides + 15,0mL caldo *B.bassiana* + 5,0mL caldo *M.anisopliae*
T3	20mL da suspensão nematóides + 15,0mL caldo *B.bassiana* + 5,0mL caldo *T.harzianum*
T4	20mL da suspensão nematóides + 20,0mL caldo *B.bassiana*

Após 7 dias pós-transplante, inoculou-se 800ml suspensão de nematóides com água destilada em todos os tratamentos. Através da visualização em microscópio, após análise de duas amostras (1mL) em câmara de Peters, obteve-se a estimativa de 4290 ovos e 825 juvenis ao total da suspensão, a qual 107 ovos e 20 juvenis de *M. javanica* foram inoculados, inicialmente, por tratamento. Em decorrência disso, após três dias, houve a inoculação dos filtrados enzimáticos fúngicos (Figura 12).

Figura 12 – Ensaio de alface pós aplicação dos caldos enzimáticos

Após 25 dias do inoculação, foram avaliados os seguintes parâmetros de interesse comercial: número de folhas, peso matéria fresca folhas, peso matéria fresca caule, peso matéria seca folhas, população final de nematoides (ovos e juvenis) e taxa de eclosão de ovos.

Ressalta-se que os valores obtidos do peso de matéria seca das folhas foram coletados após secagem do material por 72 horas em estufa a 75ºC. Para variável referente a taxa de eclosão de ovos, resultou-se da seguinte equação:

$$TAXA = (Pf*100)/(Oin) \quad (3)$$

Onde:

TAXA= Índice de eclosão de ovos (%);

Pf = população final de juvenis (J2);

Oin = número inicial de ovos inoculados.

Para a contagem da população final, verificou-se a existência ou não de galhas visíveis. Em consequência disso, fez-se todo o processo de extração de raízes proposto por Hussey e Barker (1973) e, posteriormente, em câmara de Peters, realizou-se a contagem de ovos e juvenis presentes, as quais foram atribuídas notas de acordo com a escala sugerida por Taylor & Sasser (1978) (Tabela 6).

Tabela 6 – Escala para avaliação do número de massa de ovos da população final de *M. javanica*.

Índice	**Nº de galhas e/ou massa de ovos**
0	0
1	1-2
2	3-10
3	11-30
4	31-100
5	>100

Fonte: HUSSEY & BARKER (1973).

5.6 AVALIAÇÃO DA PENETRAÇÃO RADICULAR POR JUVENIS DE M. JAVANICA SOB CONTROLE APLICADO DE EXTRATOS ENZIMÁTICOS EM ESTÁGIO INICIAL DE DESENVOLVIMENTO DA CULTURA DO TOMATE

Neste ensaio, realizado na sala de cultivo do laboratório de defesa fitossanitária do IFFar, o delineamento estatístico utilizado foi inteiramente casualizado com 10 repetições por tratamento. Os tratamentos utilizados foram os mesmos citados no Quadro 2, totalizando 40 unidades experimentais.

Inicialmente, preencheu-se copos plásticos de 550cm^3 com areia pré-lavada como substrato e implantou-se as mudas da cultivar Santa Clara (suscetível ao ataque de *M. javanica*) obtidas via semeadura em bandejas, as quais foram mantidas sob condições hídricas e nutricionais recomendáveis para a cultura através do uso de água morna e solução nutritiva completa (macro e micronutrientes) (Figura 13).

Figura 13 – Mudas transplantadas para realização dos ensaios de penetração de juvenis *M. javanica*.

Após 7 dias pós-transplante, inoculou-se os extratos enzimáticos conforme o volume descrito no Quadro 2. Logo, em 24 horas após aplicação do filtrados fúngicos (Figura 14), inoculou-se 348mL suspensão concentrada de nematóides em todos os tratamentos. Através da visualização em microscópio, após análise de oito amostras (1ml cada) em câmara de Peters, obteve-se a estimativa de 38 juvenis ao total da suspensão. Assim, foram inoculados 8,7 mL da suspensão e 41 juvenis de *M. javanica* respectivamente em cada tratamento.

Figura 14 – Aplicação do filtrados enzimáticos fúngicos

Para avaliação dos tratamentos, foi utilizado o método de coloração de nematóides em raízes (BYRD; KIRKPATRICK; BARKER, 1983), o qual auxilia na visualização de ovos e J2. Assim, foram separadas a parte aérea do sistema radicular, onde as raízes foram lavadas em água corrente e cortadas em pedaços de aproximadamente 1cm e colocadas em recipiente calibrado com 50 mL de água destilada e 30 mL de hipoclorito de sódio a 2,5%. Após 8 minutos, os fragmentos de raízes foram enxaguados em água corrente, cujo objetivo foi retirar o excesso de hipoclorito. Posteriormente, foram dispostas em caixas gerbox contendo água destilada durante 15 minutos. Na sequência, transferiu-se as raízes para béquer com solução composta por 30 mL de água destilada e 1 mL da solução corante (75 mL de água destilada, 25 mL de ácido acético glacial e 350 mg de fucsina ácida). Imediatamente, ferve-se as raízes na solução corante por 25 segundos através do micro-ondas. Aguarda-se o resfriamento da amostra até atingir temperatura ambiente e lava-se em água corrente. Por fim, armazena-se as raízes em tubos com tampa-rosca contendo 5 ml de glicerina para conservação do material. A contagem de juvenis penetrados foi observada em microscópio com lente de aumento de 10x.

A avaliação da taxa de penetração, após 48 horas, foi dada pela seguinte equação:

$$Tp = (J2p*100)/(J2in) \quad (4)$$

Onde:

Tp= Taxa de penetração (%);

J2p = número de juvenis penetrados nas raízes;

J2in = número inicial de juvenis inoculados.

5.7 ANALISE ESTATÍSTICA

Para análise dos dados de laboratório e sala de cultivo, procedeu-se a análise de variância (ANOVA). Quando o teste F foi significativo, a discriminação entre as médias dos tratamentos (caldos enzimáticos) para as variáveis: índice de inibição de ovos, índice de mortalidade de juvenis (J2) de *M. javanica*, número de folhas, peso de matéria fresca (folhas), peso matéria fresca (caule), peso matéria seca (folhas), número de massa de ovos e juvenis e taxa de penetração, foi realizada pelo teste de Scott-Knott com 5% de probabilidade de erro. Para tanto, utilizou-se o software estatístico SISVAR, desenvolvido pela Universidade Federal de Lavras (FERREIRA, 2014).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 AVALIAÇÃO IN VITRO DO EFEITO NEMATICIDA PROVENIENTE DOS CALDOS ENZIMÁTICOS SOBRE O ÍNDICE DE INIBIÇÃO DE OVOS DE *M. JAVANICA*

Neste ensaio houveram resultados expressivos à respeito do efeito nematicida produzido pelos caldos enzimático, os quais foram essenciais para tomada de decisão dos tratamentos a serem utilizados nos ensaios *in vivo*.

Houve diferença significativa entre os tratamentos, pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$), onde todos os filtrados fúngicos, independente do isolado matriz biológica, apresentaram maiores índices de inibição de ovos (66,67-87,04%).Os tratamentos T3, T7 e T8 (caldos com *B. bassiana* em sua predominância) obtiveram os maiores valores, respectivamente, em todos os períodos de incubação (Tabela 7). Todavia, não podemos descartar os bons valores dos demais tratamentos e nem afirmamos que estes tratamentos são os melhores, pois o ensaio foi realizado em condições ótimas, sem interferência de qualquer outro fator abiótico e biótico.

Tabela 7 – Índice de inibição de ovos (%) obtidos no ensaio *in vitro.*

Tratamentos	Índice de inibição de ovos (%)		
	24 horas	**48 horas**	**72 horas**
T1	20,00 b	15,00 c	0,00 c
T2	75,00 a	66,67 b	66,67 b
T3	88,89 a	87,04 a	87,04 a
T4	77,14 a	71,43 b	71,43 b
T5	76,32 a	71,05 b	71,05 b
T6	80,56 a	77,78 b	77,78 b
T7	86,05 a	86,05 a	86,05 a
T8	89,19 a	86,49 a	86,49 a
T9	84,38 a	81,25 a	81,25 a
T10	82,93 a	78,05 a	78,05 a
T11	75,76 a	66,67 b	66,67 b
T12	80,39 a	76,47 a	76,47 a
T13	78,05 a	73,17 a	73,17 a
T14	75,86 a	72,41 a	72,41 a
T15	85,71 a	82,14 a	82,14 a
T16	78,95 a	73,68 a	73,68 a
T17	81,58 a	76,32 a	76,32 a
CV (%)	41,59	34,94	31,49

Médias seguidas por letras iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p<0,05$). T1 - 100 microlitros nematóides (ovos) + 100 microlitros água destilada estéril. T2 - 100 microlitros nematóides (ovos) + 100 microlitros caldo *M.anisopliae.* T3100 microlitros nematóides (ovos) + 100 microlitros caldo *B.bassiana.* T4 - 100 microlitros nematóides (ovos) + 100 microlitros caldo *T.harzianum.* T5 - 100 microlitros nematóides (ovos) + 75 microlitros caldo *M.anisopliae* + 25 microlitros caldo *B.bassiana.* T6 - 100 microlitros nematóides (ovos) + 50 microlitros caldo *M.anisopliae* + 50 microlitros caldo *B.bassiana.* T7 - 100 microlitros nematóides (ovos) + 25 microlitros caldo *M.anisopliae* + 75 microlitros caldo *B.bassiana*. T8 - 100 microlitros nematóides (ovos) + 75 microlitros caldo *B.bassiana* + 25 microlitros caldo *T.harzianum*. T9- 100 microlitros nematóides (ovos) + 50 microlitros caldo *B.bassiana* + 50 microlitros caldo *T.harzianum*. T10 - 100 microlitros nematóides (ovos) + 25 microlitros caldo *B.bassiana* + 75 microlitros caldo *T.harzianum*. T11- 100 microlitros nematóides (ovos) + 75 microlitros caldo *M.anisopliae* + 25 microlitros caldo *T.harzianum*. T12 - 100 microlitros nematóides (ovos) + 50 microlitros caldo *M.anisopliae* + 50 microlitros caldo *T.harzianum*. T13 - 100 microlitros nematóides (ovos) + 25 microlitros caldo *M.anisopliae* + 75 microlitros caldo *T.harzianum*. T14 - 100 microlitros nematóides (ovos) + 50 microlitros caldo *M.anisopliae* + 25 microlitros caldo *B.bassiana* +25 microlitros caldo *T.harzianum*. T15 - 100 microlitros nematóides (ovos) + 25 microlitros caldo *M.anisopliae* + 50 microlitros caldo *B.bassiana* +25 microlitros caldo *T.harzianum*. T16 - 100 microlitros nematóides (ovos) + 25 microlitros caldo *M.anisopliae* + 25 microlitros caldo *B.bassiana* + 50 microlitros caldo *T.harzianum*. T17 - 100 microlitros nematóides (ovos) + 33 microlitros caldo *M.anisopliae* + 33 microlitros caldo *B.bassiana* + 33 microlitros caldo *T.harzianum.*

Uma das variáveis contabilizadas por microscópico em todos os períodos de incubação foi o número de ovos não-eclodidos (Tabela 8), elemento que compõem a equação do índice de inibição de ovos. Mediante os resultados obtidos, percebemos a estabilização de valores entre os períodos de incubação 48 e 72 horas, a qual não foi constatado o aumento progressivo do efeito nematicida sob a inibição de ovos. Pode-se deduzir que tais extratos enzimáticos apresentam ação e efeito imediato nas

primeiras horas de contato sob os ovos, onde o índice de inibição dos tratamentos em relação a testemunha aumentam significativamente em apenas 24 horas. Esta variável resposta foi considerada para a elaboração do ensaios in vitro no controle de juvenis (J2) de *M. javanica*, onde os períodos de incubação foram reduzidos para 8, 16 e 24 horas.

Tabela 8 – Contagem de número total de ovos não eclodidos presentes nas cavidades das placas de Elisa durante os três períodos de incubação (24, 48 e 72 horas)

Tratamentos	**Número de ovos não eclodidos**		
	TOTAL	**TOTAL**	**TOTAL**
	24 horas	**48 horas**	**72 horas**
T1	8	6	0
T2	27	24	24
T3	48	47	47
T4	27	25	25
T5	29	27	27
T6	29	28	28
T7	37	37	37
T8	33	32	32
T9	27	26	26
T10	34	32	32
T11	25	22	22
T12	41	39	39
T13	32	30	30
T14	22	21	21
T15	24	23	23
T16	30	28	28
T17	31	29	29

T1 - 100 microlitros nematóides (ovos) + 100 microlitros água destilada estéril. T2 - 100 microlitros nematóides (ovos) + 100 microlitros caldo *M.anisopliae.* T3100 microlitros nematóides (ovos) + 100 microlitros caldo *B.bassiana.* T4 - 100 microlitros nematóides (ovos) + 100 microlitros caldo *T.harzianum.* T5 - 100 microlitros nematóides (ovos) + 75 microlitros caldo *M.anisopliae* + 25 microlitros caldo *B.bassiana.* T6 - 100 microlitros nematóides (ovos) + 50 microlitros caldo *M.anisopliae* + 50 microlitros caldo *B.bassiana.* T7 - 100 microlitros nematóides (ovos) + 25 microlitros caldo *M.anisopliae* + 75 microlitros caldo *B.bassiana*. T8 - 100 microlitros nematóides (ovos) + 75 microlitros caldo *B.bassiana* + 25 microlitros caldo *T.harzianum*. T9- 100 microlitros nematóides (ovos) + 50 microlitros caldo *B.bassiana* + 50 microlitros caldo *T.harzianum*. T10 - 100 microlitros nematóides (ovos) + 25 microlitros caldo *B.bassiana* + 75 microlitros caldo *T.harzianum*. T11- 100 microlitros nematóides (ovos) + 75 microlitros caldo *M.anisopliae* + 25 microlitros caldo *T.harzianum*. T12 - 100 microlitros nematóides (ovos) + 50 microlitros caldo *M.anisopliae* + 50 microlitros caldo *T.harzianum*. T13 - 100 microlitros nematóides (ovos) + 25 microlitros caldo *M.anisopliae* + 75 microlitros caldo *T.harzianum*. T14 - 100 microlitros nematóides (ovos) + 50 microlitros caldo *M.anisopliae* + 25 microlitros caldo *B.bassiana* +25 microlitros caldo *T.harzianum*. T15 - 100 microlitros nematóides (ovos) + 25 microlitros caldo *M.anisopliae* + 50 microlitros caldo *B.bassiana* +25 microlitros caldo *T.harzianum*. T16 - 100 microlitros nematóides (ovos) + 25 microlitros caldo *M.anisopliae* + 25 microlitros caldo *B.bassiana* + 50 microlitros caldo *T.harzianum*. T17 - 100 microlitros nematóides (ovos) + 33 microlitros caldo *M.anisopliae* + 33 microlitros caldo *B.bassiana* + 33 microlitros caldo *T.harzianum.*

6.2 AVALIAÇÃO IN VITRO DO EFEITO NEMATICIDA PROVENIENTE DOS CALDOS ENZIMÁTICOS SOBRE O ÍNDICE DE MORTALIDADE DE JUVENIS (J2) DE *M. JAVANICA*

Os resultados produzidos neste ensaio foram de extrema importância e fundamentais, pois corroborou com os melhores índices de controle obtidos para inibição da eclosão de ovos. Uma das variáveis foi o número final de juvenis inativos (Tabela 9), elemento que compõem a equação do índice de mortalidade. Mediante os resultados obtidos, percebemos o crescimento progressivo de valores de mortalidade entre os períodos de incubação 8 a 24 horas. Isto indica, considerando os resultados obtidos em inibição de ovos, que acima de 24 horas, possivelmente haverá aumento gradativo do potencial nematicida dos caldos enzimáticos com tendência de estabilização de valores até 48 horas.

Tabela 9 – Contagem de número total de juvenis inativos presentes nas cavidades das placas de Elisa durante os três períodos de incubação (8, 16 e 24 horas).

Tratamentos	**Número de ovos não eclodidos**		
	TOTAL	**TOTAL**	**TOTAL**
	8 horas	**16 horas**	**24 horas**
T1	5	3	7
T2	11	12	12
T3	14	14	14
T4	12	13	12
T5	9	12	11
T6	10	11	11
T7	13	13	14
T8	14	13	13
T9	12	13	14
T10	12	11	12
T11	9	9	10
T12	10	11	10
T13	11	11	12
T14	10	12	12
T15	12	13	13
T16	9	12	12
T17	10	11	12

T1 - 100 microlitros nematóides (ovos) + 100 microlitros água destilada estéril. T2 - 100 microlitros nematóides (ovos) + 100 microlitros caldo *M.anisopliae.* T3100 microlitros nematóides (ovos) + 100 microlitros caldo *B.bassiana.* T4 - 100 microlitros nematóides (ovos) + 100 microlitros caldo *T.harzianum.* T5 - 100 microlitros nematóides (ovos) + 75 microlitros caldo *M.anisopliae* + 25 microlitros caldo *B.bassiana.* T6 - 100 microlitros nematóides (ovos) + 50 microlitros caldo *M.anisopliae* + 50 microlitros caldo *B.bassiana.* T7 - 100 microlitros nematóides (ovos) + 25 microlitros caldo *M.anisopliae* + 75 microlitros caldo *B.bassiana*. T8 - 100 microlitros nematóides (ovos) + 75 microlitros caldo *B.bassiana* + 25 microlitros caldo *T.harzianum*. T9- 100 microlitros nematóides (ovos) + 50 microlitros caldo *B.bassiana* + 50 microlitros caldo *T.harzianum*. T10 - 100 microlitros nematóides (ovos) + 25 microlitros caldo *B.bassiana* + 75 microlitros caldo *T.harzianum*. T11- 100 microlitros nematóides (ovos) + 75 microlitros caldo *M.anisopliae* + 25 microlitros caldo *T.harzianum*. T12 - 100 microlitros nematóides (ovos) + 50 microlitros caldo *M.anisopliae* + 50 microlitros caldo *T.harzianum*. T13 - 100 microlitros nematóides (ovos) + 25 microlitros caldo *M.anisopliae* + 75 microlitros caldo *T.harzianum*. T14 - 100 microlitros nematóides (ovos) + 50 microlitros caldo *M.anisopliae* + 25 microlitros caldo *B.bassiana* +25 microlitros caldo *T.harzianum*. T15 - 100 microlitros nematóides (ovos) + 25 microlitros caldo *M.anisopliae* + 50 microlitros caldo *B.bassiana* +25 microlitros caldo *T.harzianum*. T16 - 100 microlitros nematóides (ovos) + 25 microlitros caldo *M.anisopliae* + 25 microlitros caldo *B.bassiana* + 50 microlitros caldo *T.harzianum*. T17 - 100 microlitros nematóides (ovos) + 33 microlitros caldo *M.anisopliae* + 33 microlitros caldo *B.bassiana* + 33 microlitros caldo *T.harzianum.*

Houve diferença significativa entre os tratamentos, pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$), onde todos os filtrados fúngicos, independente dos isolados, apresentaram maiores índices de mortalidade de J2 (44,44-90,00%) em relação à testemunha. Os tratamentos T3, T7 e T8 (caldos com *B. bassiana* em sua predominância) obtiveram os maiores valores, respectivamente, em todos os períodos de incubação. (Tabela

10). Assim, conforme os dois ensaios realizados *in vitro*, percebe-se que todos os caldos enzimáticos apresentam alto potencial nematicida, tanto para controle de ovos quanto para controle de juvenis de *M. javanica*.

Tabela 10 – Índice de mortalidade (%) de juvenis obtidos no ensaio *in vitro.*

Tratamentos	**Índice de mortalidade (%)**		
	8 horas	**16 horas**	**24 horas**
T1	0,00 c	0,00 c	0,00 c
T2	50,00 b	57,14 b	62,50 b
T3	80,00 a	83,33 a	90,00 a
T4	62,50 b	66,67 b	66,67 b
T5	25,00 b	57,14 b	60,00 b
T6	44,44 b	55,56 b	55,56 b
T7	75,00 a	77,78 a	87,50 a
T8	75,00 a	75,00 a	84,62 a
T9	50,00 a	71,43 a	83,33 a
T10	50,00 b	55,56 b	57,14 b
T11	33,33 b	40,00 b	44,44 b
T12	44,44 b	50,00 b	54,55 b
T13	50,00 b	55,56 b	57,14 b
T14	50,00 b	57,14 b	62,50 b
T15	66,67 a	75,00 a	80,00 a
T16	40,00 b	50,00 b	57,14 b
T17	44,44 b	55,56 b	57,14 b
CV (%)	37,28	26,16	22,51

Médias seguidas por letras iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p<0,05$). T1 - 100 microlitros nematóides (ovos) + 100 microlitros água destilada estéril. T2 - 100 microlitros nematóides (ovos) + 100 microlitros caldo *M.anisopliae.* T3100 microlitros nematóides (ovos) + 100 microlitros caldo *B.bassiana.* T4 - 100 microlitros nematóides (ovos) + 100 microlitros caldo *T.harzianum.* T5 - 100 microlitros nematóides (ovos) + 75 microlitros caldo *M.anisopliae* + 25 microlitros caldo *B.bassiana.* T6 - 100 microlitros nematóides (ovos) + 50 microlitros caldo *M.anisopliae* + 50 microlitros caldo *B.bassiana.* T7 - 100 microlitros nematóides (ovos) + 25 microlitros caldo *M.anisopliae* + 75 microlitros caldo *B.bassiana*. T8 - 100 microlitros nematóides (ovos) + 75 microlitros caldo *B.bassiana* + 25 microlitros caldo *T.harzianum*. T9- 100 microlitros nematóides (ovos) + 50 microlitros caldo *B.bassiana* + 50 microlitros caldo *T.harzianum*. T10 - 100 microlitros nematóides (ovos) + 25 microlitros caldo *B.bassiana* + 75 microlitros caldo *T.harzianum*. T11- 100 microlitros nematóides (ovos) + 75 microlitros caldo *M.anisopliae* + 25 microlitros caldo *T.harzianum*. T12 - 100 microlitros nematóides (ovos) + 50 microlitros caldo *M.anisopliae* + 50 microlitros caldo *T.harzianum*. T13 - 100 microlitros nematóides (ovos) + 25 microlitros caldo *M.anisopliae* + 75 microlitros caldo *T.harzianum*. T14 - 100 microlitros nematóides (ovos) + 50 microlitros caldo *M.anisopliae* + 25 microlitros caldo *B.bassiana* +25 microlitros caldo *T.harzianum*. T15 - 100 microlitros nematóides (ovos) + 25 microlitros caldo *M.anisopliae* + 50 microlitros caldo *B.bassiana* +25 microlitros caldo *T.harzianum*. T16 - 100 microlitros nematóides (ovos) + 25 microlitros caldo *M.anisopliae* + 25 microlitros caldo *B.bassiana* + 50 microlitros caldo *T.harzianum*. T17 - 100 microlitros nematóides (ovos) + 33 microlitros caldo *M.anisopliae* + 33 microlitros caldo *B.bassiana* + 33 microlitros caldo *T.harzianum.*

De acordo com a composição enzimática, todos apresentam quitinases e glucanases, as quais são enzimas degradantes de parede celular, que agem na

cutícula de juvenis e na casca dos ovos dos nematóides (LUBECK et al, 2008; MUSTAFA; KAUR, 2009; BOLDO et al., 2009). Em virtude disso, optou-se para utilizarmos, em testes *in vivo*, os tratamentos com predominância de *Beauveria bassiana* (T3, T7 e T8), pois apresentou as menores atividades enzimáticas em β-1,3-glucanase e quitinases e obteve-se alto desempenho no controle do fitonematóide.

6.3 AVALIAÇÃO DE DANOS OCASIONADOS POR *M. JAVANICA* SOB CONTROLE APLICADO DE EXTRATOS ENZIMÁTICOS EM ESTÁGIO INICIAL DE DESENVOLVIMENTO DA CULTURA DA ALFACE

Mediante o exposto a seguir, este ensaio (Figura 16) demonstrou a real e potencial eficiência nematicida dos caldos enzimáticos selecionados diante dos parâmetros analisados (Tabela 11), visto que os nematóides foram controlados de modo eficaz em todos os ensaios em comparação com a testemunha. Porém, verificou-se em algumas unidades experimentais, sintomas fitotóxicos possivelmente ocasionados pelos extratos enzimáticos (Figura 17).

Tabela 11 – Médias dos tratamentos através da análise dos parâmetros comerciais escolhidos e escala de notas proposta por HUSSEY & BARKER (1973).

.

TRAT.	NF		PMF (g)		PC (g)		PMS (g)		PF (ovos)		PF (J2)		NOTAS
T1	5,20	b	1,62	b	0,21	c	0,25	b	169,20	a	49,60	a	4
T2	9,90	a	7,59	a	0,40	b	0,58	a	118,20	b	9,50	b	2
T3	9,30	a	7,45	a	0,44	a	0,56	a	120,10	b	10,90	b	3
T4	9,20	a	7,23	a	0,37	b	0,54	a	120,60	b	12,50	b	3
CV(%)	20,06		38,86		15,88		41,15		13,24		35,10		

Médias seguidas por letras iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p<0,05$). NF – Número de folhas. PMF - peso de matéria fresca de folhas. PC – Peso do caule. PMS - peso de matéria seca de folhas. PF – população final. T1 – 20 mililitros nematóides (ovos) + 20 mililitros água destilada estéril. T2 - 20 mililitros nematóides (ovos) + 15 mililitros caldo *B. bassiana* + 5 mililitros caldo *M.anisopliae.* T3 - 20 mililitros nematóides (ovos) + 15 mililitros caldo *B. bassiana* + 5 mililitros caldo *T. harzianum.* T4 - 20 mililitros nematóides (ovos) + 20 mililitros caldo *B.bassiana*.

Conforme os resultados demonstrados na Tabela 11, o aumento da população final de J2 acarretou prejuízos consideráveis na testemunha em relação aos demais tratamentos enzimáticos, onde houve redução no número de folhas (NF), no peso de matéria fresca de folhas (PMF), no peso de matéria seca de folhas (PMS). Consequentemente, este aumento resultou em maior número final de massa de ovos

na testemunha em relação a todos os tratamentos. Verifica-se que na variável peso da matéria fresca do caule, o tratamento de *Beauveria bassiana* + *Trichoderma harzianum* obteve maior valor em comparação aos demais tratamentos com extratos enzimáticos. Possivelmente este resultado está atrelado à capacidade de promoção de crescimento vegetal presente em compostos fúngicos (Figura 18). Segundo outros autores, esta indução de desenvolvimento vegetal se dá através da síntese de hormônios, do aumento na disponibilidade e no estímulo na absorção de nutrientes presentes no substrato, entre outros fatores (AVIS et al., 2008; FILHO et al., 2008; HOYOS-CARVAJAL et al., 2009).

Uma das variáveis contabilizadas por microscópico em câmara de Peters, após o método de extração de nematóides via raízes foi a estimativa da população final de juvenis (J2) em cada tratamento, elemento que compõem a equação para determinação da taxa média de eclosão de ovos (Tabela 12). Nota-se que todos os tratamentos à base de extratos enzimáticos apresentaram bons níveis de controle, corroborando com os ensaios obtidos *in vitro* nesse presente estudo. Além disso, é importante destacar que todas as plantas de alface não apresentam aceitação comercial, a qual toleram com, no mínimo, 200 gramas. Justifica-se tais valores pela finalidade do estudo, onde almejou avaliar até próximo de 30 dias pós-transplante. Também, a capacidade do vaso, em volume, prejudicou quaisquer avaliação referente à produtividade da cultura.

Tabela 12 – Taxa média de eclosão de ovos de *M. javanica* (%).

Tratamentos	**Taxa de eclosão de ovos**
T1	46,35 b
T2	8,88 a
T3	10,19 a
T4	11,68 a
CV(%)	35,10

Médias seguidas por letras iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p<0,05$). T1 – 20 mililitros nematóides (ovos) + 20 mililitros água destilada estéril. T2 - 20 mililitros nematóides (ovos) + 15 mililitros caldo *B. bassiana* + 5 mililitros caldo *M.anisopliae.* T3 - 20 mililitros nematóides (ovos) + 15 mililitros caldo *B. bassiana* + 5 mililitros caldo *T. harzianum.* T4 - 20 mililitros nematóides (ovos) + 20 mililitros caldo *B.bassiana*.

Figura 16 – Ensaio de danos sob alface 25 dias pós-transplante.

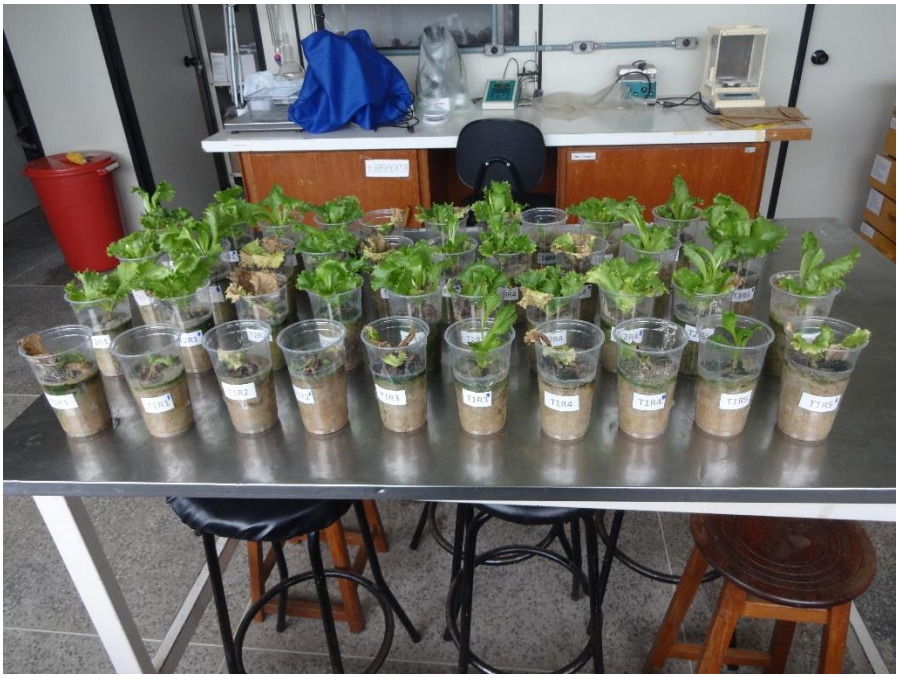


Figura 17 – Sintomas fitotóxicos presentes nas plantas de alface.

Figura 18 – Desenvolvimento vegetal e radicular sob aplicação dos extratos enzimáticos no controle de *M. javanica*; a) T1 (testemunha); b) T2 (*B. bassiana* + *M. anisopliae*); c) T3 (*B. bassiana* + *T. harzianum*); T4 (*B. bassiana*).

6.4 AVALIAÇÃO DA PENETRAÇÃO RADICULAR POR JUVENIS DE M. JAVANICA SOB CONTROLE APLICADO DE EXTRATOS ENZIMÁTICOS EM ESTÁGIO INICIAL DE DESENVOLVIMENTO DA CULTURA DO TOMATE

O presente ensaio propõem corroborar com os resultados obtidos anteriormente na cultura da alface pela implantação da cultura do tomate, a qual é suscetível e apresenta melhor fonte de inóculo para o estabelecimento de nematoides (Figura 19). Com base na metodologia descrita, novamente verificou-se diferença significativa em relação a testemunha através da obtenção de menores números populacionais de juvenis penetrados nas raízes e menor taxa de penetração em tratamentos inoculados pelos extratos fúngicos, os quais não diferiram estaticamente entre si conforme a Tabela 13.

Uma das variáveis contabilizadas por microscópico em lamínulas de vidro, após o método de coloração de nematóides nas raízes foi a quantificação da média da população de juvenis (J2) penetrados em cada tratamento (Tabela 13), elemento que compõem a equação para determinação da taxa média de penetração J2. Nota-se, através da Figura 20, que a técnica de coloração de nematoides obteve-se êxito, onde pode-se observar nitidamente a presença de juvenis penetrados.

Entretanto, foram avaliados apenas seis dos dez tratamentos instalados. Isto ocorreu, devido à um problema fitotóxico severo em plântulas de tomate pertencentes ao tratamento 4 (*Beauveria bassiana*) como demonstra a Figura 21.

Tabela 13 – Valores médios da quantificação de juvenis penetrados e taxa de penetração de J2 de *M. javanica* em raízes de tomateiro (%).

Tratamentos	**J2 penetração**		**Taxa de penetração**	
T1	14,50	a	35,37	a
T2	4,00	b	8,94	b
T3	4,17	b	10,16	b
T4	4,67	b	11,38	b
CV(%)	30,18		30,18	

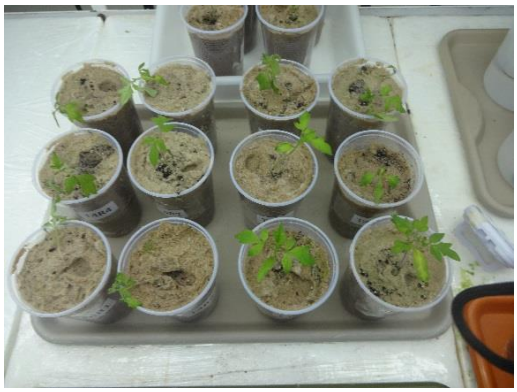
Médias seguidas por letras iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p<0,05$). T1 – 20 mililitros nematóides (ovos) + 20 mililitros água destilada estéril. T2 - 20 mililitros nematóides (ovos) + 15 mililitros caldo *B. bassiana* + 5 mililitros caldo *M.anisopliae.* T3 - 20 mililitros nematóides (ovos) + 15 mililitros caldo *B. bassiana* + 5 mililitros caldo *T. harzianum.* T4 - 20 mililitros nematóides (ovos) + 20 mililitros caldo *B.bassiana*.

Figura 19 – Plântulas de tomate inoculadas com juvenis de M. javanica e caldos enzimáticos fúngicos antes da iniciação do método de coloração de raízes; a) T1 (testemunha); b) T2 (*B. bassiana* + *M. anisopliae*); c) T3 (*B. bassiana* + *T. harzianum*); T4 (*B. bassiana*).

a

b

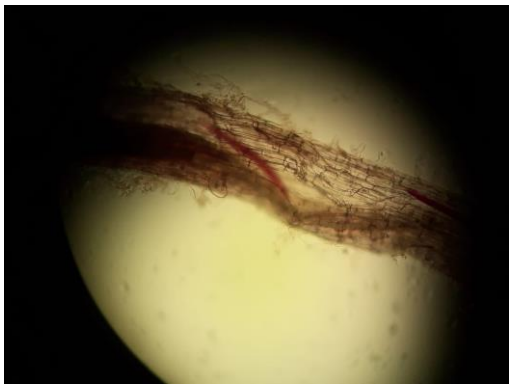
c



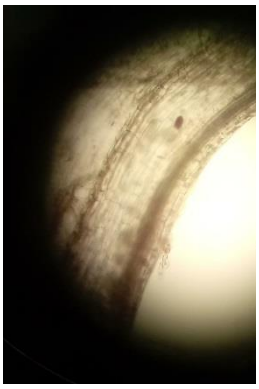
d

Figura 20 – Quantificação de J2 de *M. javanica* em amostras de raízes de tomateiro após o emprego do método de colorimento de raízes; a, b) juvenis (J2) (testemunha); c) ovos de *M. javanica* aderidos nas raízes.

a



b



c

Figura 21 – Plântulas de tomate pertencentes ao tratamento 4 (*B. bassiana*); a, b) Fitotoxicidade nas unidades experimentais.

a

b

Possivelmente este resultado de fitotoxicidade está atrelado à produção de metabólitos secundários específicos (YANG et al. 2013), os quais são prejudiciais às plântulas do tomateiro inibindo seu pleno desenvolvimento vegetal pela interferência em processos metabólicos e fisiológicos. Segundo Strasser; Vey; Butt (2000), fungos entomopatogênicos como *Beauveria bassiana* produzem 5 metabólitos: basianinas, beauvericinas, basianolidas, beauverolidas e Tenellinas. Outro fungo entomopatogênico como *Metarhizium anisopliae* possui 28 tipos de destruxinas. Segundo Annarita Cito e demais colaboradores (2016), ambas espécies apresentam mesmos tipos de proteases devido à similaridade nas estruturas genéticas. Há relatos na literatura em que algumas destruxinas como a destruxina B isolada e purificada podem gerar compostos peptídeos indesejáveis que causam clorose e necrose das folhas de canola, a qual produz, tal destruxina, em seu complexo enzimático (BAINS; TEWARI, 1987; AGARWALL et al., 1994). Porém a mesma enzima, quando isolada de outra espécie e aplicada em outras culturas não apresentou efeito fitotóxico (VENKATASUBBAIAH et al., 1994). Pode-se aferir que a cultura do tomate é muito mais sensível do que a alface, pois os mesmos caldos enzimáticos não geraram fitotoxicidade a ponto de ocasionar necrose da parte aérea, assim como a amostra de *B. bassiana* aplicada neste tratamento em específico pode apresentar desequilíbrios enzimáticos, onde o excesso de algum composto pode induzir a formação de anticorpos como resposta fisiológica da planta. Existem uma série de estudos, as quais comprovam o efeito benéfico de aplicação enzimática em processos biotecnológicos agrícolas, principalmente para controle de pragas e doenças, porém

há necessidade de realizar maiores estudos relacionados à segurança alimentar e humana, pois há pouca informação e, em alguns casos, inexiste à respeito dos efeitos colaterais.

Ressalta-se que este trabalho voltado para o controle de *M. javanica* em hortaliças consorciando três extratos enzimáticos oriundos de matrizes fúngicas sem quaisquer estrutura reprodutiva em sua composição é de caráter inédito e será primordial para futuras novas pesquisas científicas. Além disso, em relação ao nível biotecnológico, nenhum produto nematicida registrado comercialmente no Brasil dispõem para uso agrícola são necessários maiores estudos e obtenção de informações básicas sobre biologia, fisiologia, nutrição, relações hospedeiro/inimigo natural, simbiontes e análises de impacto ambiental. Estes fatores são primordiais para bioformulação de um produto final de grande qualidade e eficaz. Diante disso, é fundamental dominarmos processos que envolvam desde a produção dos caldos enzimáticos até o produto propriamente dito. No que diz respeito à otimização de processos fermentativos é importante buscar fontes de inóculo que proporcionam aumento na produtividade do metabolismo microbiano, através da manipulação dos parâmetros físico-químicos e nutricionais que podem alterar significativamente o rendimento do produto/enzima de interesse.

A utilização de bioformulados enzimáticos trata-se de uma mudança mais profunda que abrange todo um contexto de manejo integrado, a qual devemos considerarmos como parte de um pacote tecnológico, isto é, em consórcio com outros métodos de controle, como o químico. Para isto, há necessidade de estudar a compatibilidade dos presentes caldos enzimáticos com defensivos agrícolas, além das possíveis interações com outros organismos vivos presentes na microbiota no solo.

Um dos grandes entraves dos produtos biológicos a base de organismos vivos é sua eficiência aplicada a campo diante de fatores bióticos e abióticos, pois são extremamente dependentes de matéria orgânica para reprodução. Todavia, muitos sistemas de produção, principalmente monocultivos, não apresentam boa palhada e consequentemente torna-se menos eficaz o controle de fitonematóides, abrindo-se um nicho de mercado interessante para os bioformulados enzimáticos.

7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, é viável o uso de caldos enzimáticos oriundos de matrizes fúngicas e obtidos, via processos fermentativos, no controle de *Meloidogyne javanica*. Destaca-se que todos os tratamentos propostos no ensaios in vitro apresentaram altos índices de atividade inibitória de eclosão de ovos e mortalidade de juvenis do nematóide. Por conseguinte, nos ensaios in vivo com as culturas do tomate e alface em estágios iniciais de desenvolvimento vegetal, demonstraram ótimos níveis de controle em relação à testemunha, onde a consorciação entre caldos enzimáticos provenientes de diferentes espécies fúngicas como *Beauveria bassiana* + *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* + *Trichoderma harzianum* apresentaram-se melhores resultados, de modo que não houve fitotoxicidade às plantas, diferentemente do tratamento com somente caldo enzimático oriundo de *Beauveria bassiana*.

Este estudo serve como base para realização de ensaios a campo sob diferentes cenários e níveis tecnológicos empregados nas lavouras com duração de mais de dois anos para agregarmos maior credibilidade e confiabilidade nos resultados e domínio da tecnologia, a qual apresenta potencial para tornar-se produto comercial detentor de patente exclusiva. Assim, colocará à disposição de gestores agrícolas, uma nova estratégia para o manejo integrado de fitonematóides, em busca da otimização da produção agrícola aliada a maior sustentabilidade dos recursos naturais.

REFERÊNCIAS

AGARWALL, A., et al. Detection and role of chlorotic toxin and phytohormones in the pathogenesis of Alternaria blight in Brassica napus. **Current Science**, v.66, p. 442-443, 1994.

AKO, H.; NIP, W.K. “Food Biochemistry and Food Processing. Chapter 6. Enzyme Classification and Nomenclature.” **Wiley Online Library**. p. 135-154, 2007.

ALI, S.; HUANG, Z.; REN, S. “Shunxiang Ren Production of cuticle degrading enzymes by Isaria fumosorosea and their evaluation as a biocontrol agent against diamondback moth.” **Journal of Pest Science**. v. 83, p. 361–370, 2010.

ALI, S.; HUANG, Z.; REN, S. “Production and extraction of extracellular lipase from the entomopathogenic fungus Isaria fumosoroseus (Cordycipitaceae; Hypocreales).” **Biocontrol Science and Technology**. v. 19, nº. 1, p. 81-89, 2009.

ALMAGRO, L., et al. “Class III peroxidases in plant defence reactions.” **Journal of Experimental Botany**. v. 60, pp. 377-390, 2009.

ALMEIDA, W. K. D. da S. Antagonismo de Trichoderma viride sobre fungos fitopatogênicos Colletotrichum spp., Cercospora musae e Asperisporium caricae em fruteiras tropicais. **Revista Brasileira de Agroecologia**. v. 4, p. 1374-1378, 2008.

AMARAL, M. F. Z. J.; BARA, M. T. F. Avaliação da atividade antifúngica de extratos de plantas sobre o crescimento de fitopatógenos. **Revista eletrônica de farmácia**, v. 2, n. 2, p. 5-8, 2005.

ÁVILA, Z. R., et al. **Seleção de isolados de Trichoderma spp. antagônicos a Sclerotium rolfsi e Sclerotinia sclerotiorum**. Embrapa Recursos Genéticos, Brasília. Boletim Técnico de Desenvolvimento e Pesquisa. v. 177, 30 p., 2005.

AVIS, T. J., et al. Multifaceted beneficial effects of rhizosphere microorganisms on plant health and productivity. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, n. 7, p. 1733-1740, 2008.

BAINS, P.; TEWARI, J. P. Purification, chemical characterization and host specificity of the toxin produced by Alternaria brassicae. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. v.30, p.259-271, 1987.

BARSANTI, L., et al. “Paramylon (β-1, 3-glucan) content in wild type and WZSL mutant of Euglena gracilis: Effects of growth conditions.” **Journal of applied phycology**. v. 13, n. 1, pp. 59-65, 2001.

BAR-SHIMON, M., et al. “Characterization of extracellular lytic enzymes produced by the yeast biocontrol agent Candida oleophila.” **Current genetics**. v. 45, n. 3, pp. 140-148, 2004.

BENÍTEZ, T.; et al. Biocontrol mechanisms of Trichoderma strains. **International Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 249-260, 2004.

BOLDO, J.T., et al. Endochitinase CHI2 of the Biocontrol Fungus Metarhizium anisopliae Affects Its Virulence toward the Cotton Stainer Bug Dysdercus Peruvians. **Current Genetics**, v. 55, p. 551-560., 2009.

BON, E. P. S.; PEREIRA JR., N. **"Tecnologia Enzimática."** Editora Monteiro - Rio de Janeiro – RJ, 1999.

BOWLER, C.; FLUHR, R. "The role of calcium and activated oxygens as signals for controlling cross-tolerance." **Trends in plant science**. v. 5, n. 6, p. 241-246, 2000.

BRAS, S. F. E.; VERONEZZE, N. C.; PACHECO, E. Aspectos biológicos do *Meloidogyne* spp. relevantes à cultura de café. **Revista científica eletrônica de agronomia**, n.14, p.1-7, 2008.

BRIDGE, J.; STARR, J. L. **Plant Nematodes of Agricultural Importance**: A Color Handbook. Boston: Academic Press, 2007. 152 p.

BUENO, V.H.P. **Controle biológico de pragas: produção massal e controle de qualidade**. Editora UFLA, Lavras. 196p, 2000.

BYRD, D. W.; KIRKPATRICK, T.; BARKER, K. R. An improved technique for clearing and staining plant tissues for detection of nematodes. **J. Nematology**, v. 15, p. 142-143, 1983.

CALDERÓN-CORTÉS, N., et al. "Endogenous plant cell wall digestion: a key mechanism in insect evolution." **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**. v. 43, p. 45-71, 2012.

CHANDRASEKARAN, R., et al. "Bacillus subtilis chitinase identified by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of flight/time of flight mass spectrometry has insecticidal activity against Spodoptera litura Fab." **Pesticide Biochemistry and Physiology**. v. 116, p. 1 – 12, 2014.

CHET, I. et al. Fungal antagonists and mycoparasites. IN: WICKLOW, D. T.; SÖDERSTRÖM, B. (Org.). **The Mycota IV: Environmental and Microbial Relationships**. Berlin – Germany: Springer – Verlaz, p. 165-184, 1997.

CITO, A., et al. Cuticledegrading proteases and toxins as virulence markers of Beauveria bassiana (Balsamo) Vuillemin. **J. Basic Microbiol**. v.56, p.941-948, 2016.

CLARKE, P. H.; TRACEY, M. V. "The occurrence of chitinase in some bacteria." **Microbiology**. v. 14, nº. 1, p. 188-196, 1956.

COLLINGE, D. B. K. M., et al. "Plant chitinases." **The Plant Journal**. v. 3, p. 31-40, 1993.

COOK, R.J.; BAKER, K.F. **The Nature and Pratice of Biological Control of Plant Pathogens**.St. Paul. APS Press. 1983.

COSTA, L. B. **Efeito da radiação ultravioleta-B sobre Trichoderma spp. e Clonostachys rosea, agentes de biocontrole de fitopatógenos**. 2011. 80 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG, 2011.

COTO, G. R. **Conceptos Introductorios a la Fitopatología**. San José: EUNED. 346p. 2007.

CRUZ, I.; FIGUEIREDO, M. L. C.; SILVA, R. B. Controle biológico de pragas de milho. **Ciência & Ambiente**, Santa Maria, v. 42, p. 165- 190, 2011.

DANG, L.; VAN DAMME, E. J. M. “Toxic proteins in plants.” **Phytochemistry**. v. 117, pp. 51-64, 2015.

DE FARIA, M.R.; WRAIGHT, S.P. Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A Comprehensive List with Worldwide Coverage and International Classification of Formulation Types. **Biological Control**, v. 43, p. 237-256, 2007.

DEBACH, P. **Control biologico de las plagas de insetos y malas hierbas**. Editora Continental, S.A., México, 927p, 1968.

DEBACH, P.; ROSEN, D. **Biological control by natural enemies**. University Press, Cambridge. 440p, 1991.

DHAWAN, M.; JOSHI, N. “Enzymatic comparison and mortality of Beauveria bassiana against cabbage caterpillar Pieris brassicae LINN.” **Brazilian Journal of Microbiology**. 2017.

EISENBACK, J. D., H. H. TRIANTAPHYLLOU. Root-knot nematodes: Meloidogyne species and races. In: W. R. NICKLE (ed.). **Manual of Agricultural Nematology**. Marcell Dekker: New York. Cap.1, p. 191-274, 1991.

ETHUR, L. Z., et al. Seleção de antagonistas fúngicos a Fusarium solani e Fusarium oxysporum em substrato comercial para mudas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 6, p. 1794-1797, 2007.

FABRE, M. **Manejo permite convivência com nematoides**. Folha de Londrina/Agrolink On-line, 2011. Disponível em: http://www.cisoja.com.br/index.php?p=noticia&idN=8936>. Acesso em: 10 de julho de 2017.

FEIJOO-SIOTA, L.; VILLA, T.G. “Native and biotechnologically engineered plant proteases with industrial applications”. **Food Bioprocess Technol**. v.4, nº. 6, p.1066-1088, 2011.

FELTON, G. W., et al. “Potential role of lipoxygenases in defense against insect herbivory.”**Journal of Chemical Ecology**. v. 20, pp. 651-666, 1994.

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

FERREIRA, D. F. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e agrotecnologia**, v.38, n.2, 2014.

FERRY, N., et al. “Plant–insect interactions: molecular approaches to insect resistance.” **Current Opinion in Biotechnology**. v. 15, n. 2, p. 155-161, 2004.

FILHO, M. R. C., et al. **Avaliação de isolados de Trichoderma na promoção de crescimento, produção de ácido indolacético in vitro e colonização endofítica de mudas de eucalipto**. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, Brasília, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 226p. 2008.

FLEURI, L. F.; SATO, H. H. “β-1, 3 Glucanases e quitinases: aplicação na lise de leveduras e inibição de fungos.” **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras. v. 32, n. 4, p. 1224-1231, 2008.

FLEURI, L.F.; SATO, H.H. “Produção, purificação, clonagem e aplicação de enzimas líticas.” **Quim. Nova**. v. 28, nº5, p. 871-879, 2005.

GALLO, D., et al. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 920p., 2002.

GERVAIS, P.; MOLIN, P. “The role of water in solid-state fermentation.” **Biochem. Eng.J**. v. 13, p. 85-101, 2003.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. “Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants.” **Plant Physiology and Biochemistry**. v. 48, p. 909-930, 2010.

GOGGIN, F. L. “Plant-aphid interactions: molecular and ecological perspectives.” **Current Opinion in Plant Biology**. v. 10, p. 399-408, 2007.

GOHEL, V., et al. “Bioprospecting and antifungal potential of chitinolytic microorganisms. **African Journal of Biotechnology**. v. 5, nº 2, p. 54-72, 2006.

HALLIWELL, B. “Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life.” **Plant Physiology**. v. 141, nº 2, p. 312-322, 2006.

HAMID, R., et al. “Chitinases: an update.” **J Pharm Bioallied Sci**. v. 5, nº 1, p. 21–29, 2013.

HAQ, S. K.; ATIF, S. M.; KHAN, R. H. “Protein proteinase inhibitor genes in combat against insects, pests, and pathogens: natural and engineered phytoprotection.” **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 431, nº. 1, p. 145-159, 2004.

HARMAN, G. E. The nature and application of biocontrol microbes II: Trichoderma spp. Overview of mechanisms and uses of Trichoderma spp. **Phytopatology**, v. 96, p. 190-194, 2006.

HARMAN, G. E., et al. Trichoderma species - opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 1, p. 43-56, 2004.

HARTMEIER, W. "**Immobilized biocatalysts: an introduction**." Berlin: Springer Verlag. 212 p., 1988.

HEATH, M. C. "Nonhost resistance and nonspecific plant defenses." **Current opinion in plant biology**. v. 3, n. 4, p. 315-319, 2000.

HILDEBRAND, D. F., et al. "Peroxidative responses of leaves in two soybean genotypes injured by twospotted spider mites (Acari: Tetranychidae)." **Journal Economic Entomology**. v. 79, p. 1459-1465, 1986.

HOWE, G. A.; JANDER, G. "Plant immunity to insect herbivores."**Annu. Rev. Plant Biol**. v. 59, p. 41-66, 2008.

HOYOS-CARVAJAL, L.; ORDUZ, S.; BISSETT, J. Growth stimulation in bean (Phaseolus vulgaris L.) by Trichoderma. **Biological Control**, Montréal, v. 51, n. 3, p. 409–416, 2009.

HU, Z., et al. "Effects of feeding Clostera anachoreta on hydrogen peroxide accumulation and activities of peroxidase, catalase, and ascorbate peroxidase in Populus simonii x P. pyramidalis 'Opera 8277' leaves." **Acta Physiologiae Plantarum**. v. 31, p. 995-1002, 2009.

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

IORIO, E., et al. "Candida albicans cell wall comprises a branched β-d-(1→ 6)-glucan with β-d-(1→ 3)-side chains." **Carbohydrate research**. v. 343, n. 6, p. 1050-1061, 2008.

JAEGER, K.; EGGERT, T. "Lipases for biotechnology." **Current opinion in biotechnology**. v. 13, nº. 4, p. 390-397, 2002.

JALALI, M.; HOSSEININAVEH, V.; IMANI, S. "Inhibitory activity of proteinaceous inhibitors from Cassia angustifolia and Trigonella foenum-graecum seeds against Plodia interpunctella (Lepidoptera: Pyralidae): interaction of the inhibitors and the insect digestive enzymes." **Archives of Phytopathology and Plant Protection**. v. 48, nº. 3, p. 268-276, 2015.

JARAMILLO, P. M. D. **"Produção, caracterização e aplicação biotecnológica de pectinases produzidas pelo fungo Aspergillus oryzae cultivado em casca de maracujá-amarelo."** 2014. 165 f. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

KEPPANAN, R., et al. “Molecular docking of protease from Metarhiziumanisopliae and their toxic effect against model insect Galleriamellonella.” **Pesticide Biochemistry and Physiology**. 2017.

KERN, M. F., et al. Expression of a chitinase gene from Metarhizium anisopliae in tobacco plants confers resistance against Rhizoctonia solani. **Appl Biochem Biotechnol (in press)**, 2009.

KRISHNA, C. “Solid-State Fermentation Systems—An Overview”.**Crit. Rev. Biotechnol**. v. 25, p. 1- 30, 2005.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **“Princípios de Bioquímica”**. São Paulo, 1995.

LI, D. C. “Review of fungal chitinases.” **Mycopathologia**. v. 161, nº 6, p. 345–360, 2006.

LUBECK, I., et al. Evaluation of Metarhizium anisopliae Strains as Potential Biocontrol Agents of the Tick Rhipicephalus (Boophilus) microplus and the Cotton Stainer Dysdercus peruvianus. **Fungal Ecology**, v. 1, p. 78-88, 2008.

LUCON, C. M. M. **Trichoderma no controle de doenças de plantas causadas por patógenos de solo**. São Paulo: Instituto Biológico, 2008. Disponível em: <http://www.biologico.sp.gov.br/artigos_ok.php?id_artigo=77>. Acesso em: 04 de Novembro de 2017.

LUKASIK, I.; GOLAWSKA, S.; WÓJCICKA, A. “Effect of cereal aphid infestation on ascorbate content and ascorbate peroxidase activity in triticale.” **Polish Journal of Environmental Studies**. v. 21, p. 1937-1941, 2012.

MACEDO, M. L. R, et al. “A trypsin inhibitor from Peltophorum dubium seeds active against pest proteases and its effect on the survival of Anagasta kuehniella (Lepidoptera: Pyralidae).” **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**. v. 1621, nº. 2, p. 170-182, 2003.

MAI, V. C., et al. “Oxidative stress in pea seedling leaves in response to Acyrthosiphon pisum infestation.” **Phytochemistry**. v. 93, p. 49-62, 2013.

MALAJOVICH, M. A. **“Biotecnologia Fundamentos.”** Edições Biblioteca Max Feffer, RJ, Brasil. p. 110, 2009.

MITCHELL, D. A.; LONSANE, B. K. “Definition, characterization and economic evaluation.” In: **Solid Substrate Cultivation**, Elsevier, London, 1992.

MITHÖFER, A.; BOLAND, W. “Plant defense against herbivores: chemical aspects.” **Annual review of plant biology**. v. 63, p. 431-450, 2012.

MITHÖFER, A.; MAFFEI, M. E. “General Mechanisms of Plant Defense and Plant Toxins.” In: **Plant Toxins**. Springer, p. 1-22, 2016.

MITTAL, A., et al. “A kidney bean trypsin inhibitor with an insecticidal potential against Helicoverpa armigera and Spodoptera litura.” **Acta physiologiae plantarum**. v. 36, nº. 2, p. 525-539, 2014.

MOENS, M, PERRY, R. N, STARR, J. L. Meloidogyne species – a diverse group of novel and important plant parasites. In: PERRY, R. N.; MOENS, M.; STARR, J. L. **Root-knot nematodes**. Wallingford: CAB International, p. 1-17, 2009.

MONDAL, S., S.; KORIS, B. A.; G. VATAI. Journey of enzymes in entomopathogenic fungi. **Pac. Sci. Rev. A: Nat. Sci. Eng**., v.18: p. 85-99, 2016.

MURAD, H. A.; AZZAZ, H. H. “Microbial pectinases and ruminant nutrition.” **Research Journal of Microbiology**. v. 6, n. 3, p. 246- 269, 2011.

MUSTAFA, U.; KAUR, G. Extracellular Enzyme Production in Metarhizium anisopliae Isolates. **Folia Microbiologica**, v.54, p. 499-504, 2009.

NASCIMENTO, J. B.; BARRIGOSSI, J. A. F. “O papel das enzimas antioxidantes na defesa das plantas contra insetos herbívoros e fitopatógenos.” **Agrarian Academy**, Centro Científico Conhecer - Goiânia. v.1, n.1, p. 234- 250, 2014.

OKAFOR, N. **Modern Industrial Microbiology and Biotechnology**. New Hampshire, United States of America, 551 p., 2007.

PALMA, M.B., et al. “Lipase production by Penicillium restrictum using solid waste of industrial babassu oil production as substrate.” **Appl. Biochem. and Biotechnol**. v. 84, p. 1137 – 1145, 2000.

PALMA, J.M., et al. “Plant proteases, protein degradation, and oxidative stress: role of peroxisomes.” **Plant Physiology and Biochemistry**. v. 40, Issues 6–8, p. 521–530, 2002.

PANDEY, A., et al. “The realm of microbial lipases in biotechnology Biotechnol.” **Appl. Biochem**. v. 29, p. 119–131, 1999.

PANDEY, A. “Solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**. v.13, nº 2-3, p.81-84, 2003.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. “Solid state fermentation in biotechnology: fundamentals and applications.” **Asiatec Publishers**: Londres. p. 221, 2001.

PARANIDHARAN, V., et al. Induction of enzymatic scavengers of active oxygen species in rice in response to infection by Rhizoctonia solani.” **Acta Physiologiae Plantarum**. v. 25, p. 91-96, 2003.

PARIS, L. D. **“Produção de enzimas fúngicas por fermentação em estado sólido das sojas orgânica, transgênica e convencional.”** 2008. 115 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, p.115, 2008.

PARRA, J. R. P. A prática do controle biológico de pragas no Brasil. In: PINTO, A., et al. S. **Controle Biológico de pragas: na prática**. Piracicaba: CP 2, 2006.

PARRA, J. R. P; ZUCCHI, R. A. Trichogramma in Brazil: feasibility of use after twenty years of research. **Neotropical Entomolog**, v. 33, n. 3, p. 271-281, 2004.

PATEL, A. K.; SINGHANIA, R. R.; PANDEY, A. "Production, Purification, and Application of Microbial Enzymes", In: BRAHMACHARI, G.; DEMAIN A. L.; ADRIO J. L. **Biotechnology of Microbial Enzymes. Production, Biocatalysis and Industrial Applications**. Academic Press. 1st Edition. p, 13-41, 2017.

PATIL, R. S.; GHORMADE, V.; DESHPANDE, M. V. "Review: Chitinolytic enzymes: an exploration." **Enzyme and Microbial Technology**. v. 26, nº. 7, p. 473-483, 2000.

PÉREZ, C.R.; CARREÑO, F.G. Enzimas lipolíticas y su aplicación en la industria del aceite. BioTeconología.Vol. 11, n.2, pp. 37-45, 2007.

PINHEIRO, J. B. **Nematoide-das-galhas**. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cebola/arvore/CONT000gnnmwiki02wx5ok0cdjvscvuqw40o.html>. Acesso em 01 jul. 2018.

PINTO, G. A. S., et al. **Fermentação em Estado Sólido: Uma Alternativa para o Aproveitamento e Valorização de Resíduos Agroindustriais Tropicais** - Issn 1679-6535, Fortaleza, CE, 2005.

PITCHER, R.S.; FLEGG, J. J. M. An improved final separation sieve for the extraction of plant-parasitic nematodes from soil debris. **Nematologica**, v. 14, p. 123-127, 1968.

RAJASEKARAN, R.; CHANDRASEKARAN, R.; MUTHUSELVAM, M. "Microbial biotechnology, rapid advances in an area of massive impact." **Advanced Biotech**. v. 7, nº 6, p.19-25, 2008.

RAMAMOORTHY, V., et al. "Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases." **Crop protection**. v. 20, n. 1, p. 1-11.

RAO, M. B., et al. "Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases." **Microbiology and molecular biology reviews**. v. 62, nº. 3, p. 597-635, 1998.

RAVICHANDRA, N.G. **Horticultural Nematology**. New Delhi: Springer. 412p, 2014.

RAY, S., et al. "Turnabout Is Fair Play: Herbivory-Induced Plant Chitinases Excreted in Fall Armyworm Frass Suppress Herbivore Defenses in Maize". **Plant Physiology**. v. 171, p. 694-706, 2016.

RIZZARDI, M. A., et al. Ação de herbicidas sobre mecanismos de defesa das plantas aos patógenos. **Ciência Rural**. v. 33, n. 5, p. 957-965, 2003.

RYAN, C. A. “Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens.” **Annual review of phytopathology**. v. 28, nº. 1, p. 425-449, 1990.

SAHAI, A.S.; MANOCHA, M.S. “Chitinase of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and hostparasite interactions.” **FEMS Microbiol Ver**. v. 11, p. 317-338, 1993.

Sánchez-Pérez, L., et al. “Assessment of Beauveria bassiana and Their Enzymatic Extracts against Metamasius spinolae and Cyclocephala lunulata in Laboratory.” **Advances in Enzyme Research**. v. 4, nº. 3, p. 98-112, 2016.

SANT’ANNA JUNIOR, G. L. Produção de enzimas microbianas. In: LIMA, U. A., et al. **“Biotecnologia industrial - processos fermentativos e enzimáticos.”** São Paulo: Edgard Blücher Ltda., p. 351- 362, 2001.

SATO, K.; SUDO, S. **“Manual of industrial Microbiology and Biotechnology-Small- scale solid-state fermentations.”** 2 ed., Washington, 1999.

SCHMIDT, H.; PENNACCHIOTTI, I. **“Los enzimas en los alimentos, su importancia en la química y la tecnología de los alimentos.”** Biblioteca Digital de la Universidad de Chile. 93 p., 2001.

SCOPEL, W.; ROZA-GOMES, M. F. Programas de controle biológico no Brasil. **Unoesc & Ciência-ACET**, v. 2, n. 2, p. 215-223, 2012.

SEIDL, V. “Chitinases of filamentous fungi: a large group of diverse proteins with multiple physiological functions.” **Fungal Biol. Rev**. v. 22, p. 36–42, 2008.

SENTHILRAJA, G., et al. “Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) and entomopathogenic fungus bioformulation enhance the expression of defense enzymes and pathogenesis-related proteins in groundnut plants against leafminer insect and collar rot pathogen.” **Physiological and molecular plant pathology**. v. 82, p. 10-19, 2013.

SHANMUGAM, S.; RAJASEKARAN, P.; KUMAR, T. S. “Optimization of thermostable laccase production from Pleurotus eous using rice bran.” **Advanced Biotech**. v. 6, nº 7, p. 12-15, 2008.

SHARMA, J., et al. “Partial purification of an alkaline protease from a new strain of Aspergillus oryzae AWT 20 and its enhanced stabilization in entrapped Ca-alginate beads.” **The Internet J. Microbiol**. v. 2, nº 2, p. 1–9, 2006.

SIEROTZKI, H., et al. “Biological characteristics of selected Erynia neoaphidis isolates.” **Mycol. Res**. v. 104, p. 213–219, 2000.

SILVA, G. S.; SOUZA, I. M. R.; CUTRIM, F. A. Efeito da incorporação de sementes trituradas de feijão de porco ao solo sobre o parasitismo de Meloidogyne incognita em tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasilia, v. 27, p. 412-413, 2002.

SILVA, W. O. B., et al. “Metarhizium anisopliae lipolytic activity plays a pivotal role in Rhipicephalus (Boophilus) microplus infection.” **Fungal biology**. v. 114, nº. 1, p. 10-15, 2010.

STRASSER, H.; VEY, A.; BUTT, T. M. Are there any risks in using entomopathogenic fungi for pest control, with particular reference to the bioactive metabolites of Metarhiziaum, Tolypocladium and Beauveria species? **Bio. Sci. & Technol**. v.10, p.717–735, 2000.

SUTHERLAND, I. W. “Polysaccharases for microbial exopolysaccharides.” **Carbohydrate Polymers**. v. 38, n. 4, p. 319-328, 1999.

TAYLOR, A.L.; SASSER, J.N. Biology, identification and control of root-knot nematodes (Meloidogyne species). **Raleigh: International Meloidogyne Project, NCSU & USAID Coop. Publ.**, 111p., 1978.

TEN HAVE, A., et al. “The contribution of cell wall degrading enzymes to pathogenesis of fungal pathogens”. In: **The Mycota XI, Agricultural Applications** (Kempken, F., ed.), p. 341–358, SpringerVerlag, 2002.

UNDURRAGA, D.; MARKOVITS, A.; ERAZO, S. “Cocoa butter equivalent through enzymic interesterification of palm oil midfraction.” **Process Biochem**. v. 36, p. 933–939, 2001.

VAN BEILEN, J. B.; LI, Z. “Enzyme Technology: an overview.” **Current Opinion in Biotechnol**. v. 13, p. 338 – 344, 2002.

VAN LENTEREN, J. C. Critérios de seleção de inimigos naturais a serem usados em programas de controle biológico. p. 1-19. In: BUENO, V. H. P. (ed.), **Controle biológico de pragas: produção massal e controle de qualidade**. Editora UFLA, Lavras. 196p, 2000.

VATANPARAST, M., et al. “Plant cell wall degrading enzymes, pectinase and cellulase, in the digestive system of the red palm weevil, Rhynchophorus ferrugineus (Coleoptera: Curculionidae).” **Plant Protect. Sci**. v. 50, p. 190–198, 2014.

VENKATASUBBAIAH, P.; TISSERAT, N. A.; CHILTON, W. S. Metabolites of Ophiosphaerella herpotricha, a cause of spring dead spot of bermudagrass. **Mycopathologia**, v.128, p.155-159, 1994.

VINIEGRA-GONZÁLEZ, G., et al. “Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation system.” **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam. v.13, n. 2, p.157-167, 2003.

VON MEIEN, O. F.; MITCHELL, D. A. “A Two-Phase Model for Water and Heat Transfer Within an Intermittently-Mixed Solid-State Fermentation Bioreactor with Forced Aeration.” (2002). **Biotechnol. and Bioeng**. v. 79, p. 416-428, 2002.

VRANOVÁ, E., et al. “Comprehensive analysis of gene expression in Nicotiana tabacum leaves acclimated to oxidative stress.” **PNAS**. v. 99, p. 10870 -10875, 2002.

WIWAT, C., SIWAYAPRAHM, P.; BHUMIRATANA, A. “Purification and characterization of chitinase from Bacillus circulans No.4.1.” **Curr. Microbiol**. v. 39, nº 3, p. 134-140, 1999.

XIA, X., et al. “Isolation and characterization of a Bacillus subtilis strain with aflatoxin B1 biodegradation capability.” **Food Control**. v. 75, p. 92 – 98, 2017.

XIN, J.Y., et al. “Dynamic enzymatic resolution of naproxen methyl ester in a membrane bioreactor” **J. Chem. Technol. Biotechnol**. v. 76, p. 579–585, 2001.

YANG J, et al. Characterization and functional analyses of the chitinase-encoding genes in the nematode-trapping fungus Arthrobotrys oligospora. **Arch. Microbiol**. v.195, p.453-456, 2013.

ZHANG, Z.; YUEN, G. Y. “Biological Control of Bipolaris sorokiniana on Tall Fescue by Stenotrophomonas maltophilia Strain C3.” **Phytopathol**. v. 89, nº 9, p. 817-822, 1999.

ANEXO A – CONTAGEM INICIAL DE OVOS DE *M. JAVANICA* DAS PLACAS DE ELISA REFERENTE AOS TRÊS PERÍODOS DE INCUBAÇÃO (24, 48 E 72 HORAS).

Tratamentos	Repetições								
	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	TOTAL
T1	8	3	5	6	4	6	5	3	40
T2	3	5	3	4	5	7	6	3	36
T3	4	8	9	8	4	8	3	10	54
T4	4	3	6	4	5	4	5	4	35
T5	5	6	5	5	5	4	4	4	38
T6	4	3	4	3	8	5	5	4	36
T7	7	3	4	6	7	5	8	3	43
T8	3	4	2	6	4	7	4	7	37
T9	6	5	3	3	4	2	6	3	32
T10	10	4	6	5	2	4	5	5	41
T11	2	2	4	6	3	8	3	5	33
T12	3	3	1	9	5	9	10	11	51
T13	4	5	6	7	4	6	5	4	41
T14	5	6	5	2	2	5	1	3	29
T15	5	2	2	3	3	4	6	3	28
T16	4	5	5	1	5	3	12	3	38
T17	6	5	5	6	4	5	5	2	38

ANEXO B – CONTAGEM INICIAL DE JUVENIS (J2) DE *M. JAVANICA* DAS PLACAS DE ELISA REFERENTES AO PERÍODO DE 8 HORAS DE INCUBAÇÃO.

Tratamentos	Repetições									
	R1		R2		R3		R4		TOTAL	
	Ativos	Inativos	Ativos	Inativos	Ativos	Inativos	Ativos	Inativos	Ativos	Inativos
T1	2	0	4	2	2	1	2	2	10	5
T2	3	2	2	0	2	4	1	1	8	7
T3	2	4	1	2	1	4	1	0	5	10
T4	3	1	2	1	1	3	2	2	8	7
T5	4	0	1	4	1	3	2	0	8	7
T6	2	2	4	3	2	1	1	0	9	6
T7	4	2	1	1	2	3	1	1	8	7
T8	2	2	1	4	1	3	1	2	5	11
T9	2	3	1	2	2	0	1	4	6	9
T10	2	2	2	3	1	4	1	0	6	9
T11	3	3	2	3	2	0	2	0	9	6
T12	1	3	3	3	3	0	2	0	9	6
T13	1	1	3	4	2	0	2	2	8	7
T14	4	2	1	2	3	1	2	0	10	5
T15	2	3	3	1	3	1	1	1	9	6
T16	1	2	4	2	2	0	3	1	10	5
T17	3	0	2	1	3	2	1	3	9	6

ANEXO C – CONTAGEM INICIAL DE JUVENIS (J2) DE *M. JAVANICA* DAS PLACAS DE ELISA REFERENTES AO PERÍODO DE 16 HORAS DE INCUBAÇÃO.

Tratamentos	Repetições									
	R1		R2		R3		R4		TOTAL	
	Ativos	Inativos	Ativos	Inativos	Ativos	Inativos	Ativos	Inativos	Ativos	Inativos
T1	3	1	4	1	2	0	3	1	12	3
T2	2	2	2	3	1	2	2	1	7	8
T3	1	1	2	3	1	1	2	4	6	9
T4	1	2	1	3	2	2	2	2	6	9
T5	4	3	1	1	1	3	1	1	7	8
T6	4	1	2	1	2	1	1	3	9	6
T7	1	1	2	1	4	1	2	3	9	6
T8	4	2	2	1	1	2	1	2	8	7
T9	1	4	1	1	3	2	2	1	7	8
T10	4	1	1	0	2	2	2	3	9	6
T11	1	0	2	0	2	1	5	4	10	5
T12	3	1	2	1	1	3	2	2	8	7
T13	3	3	2	1	1	2	3	0	9	6
T14	2	3	2	0	1	3	2	2	7	8
T15	2	2	2	2	1	3	3	0	8	7
T16	2	3	1	2	2	0	1	4	6	9
T17	3	1	4	3	1	1	1	1	9	6

ANEXO D – CONTAGEM INICIAL DE JUVENIS (J2) DE *M. JAVANICA* DAS PLACAS DE ELISA REFERENTES AO PERÍODO DE 24 HORAS DE INCUBAÇÃO.

Tratamentos	Repetições									
	R1		R2		R3		R4		TOTAL	
	Ativos	Inativos	Ativos	Inativos	Ativos	Inativos	Ativos	Inativos	Ativos	Inativos
T1	2	1	1	2	2	3	3	1	8	7
T2	2	1	3	4	1	1	2	1	8	7
T3	3	1	3	2	2	1	2	1	10	5
T4	3	1	1	2	3	2	2	1	9	6
T5	3	1	2	1	2	2	3	1	10	5
T6	3	1	3	2	2	1	1	2	9	6
T7	2	1	4	1	1	2	1	3	8	7
T8	3	1	3	0	2	0	5	1	13	2
T9	1	2	3	2	1	3	1	2	6	9
T10	2	3	2	2	1	2	2	1	7	8
T11	2	1	2	1	1	2	4	2	9	6
T12	3	2	4	1	2	1	2	0	11	4
T13	1	3	2	2	3	2	1	1	7	8
T14	1	1	3	1	2	4	2	1	8	7
T15	3	1	3	1	2	1	2	2	10	5
T16	1	2	3	2	1	2	2	2	7	8
T17	2	1	2	1	1	4	2	2	7	8