



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SECRETARIA DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA
INSTITUTO FEDERAL GOIANO – CAMPUS URUTAÍ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROTEÇÃO DE PLANTAS

**Manejo de *Heterodera glycines* empregando enzimas hidrolíticas de
*Trichoderma asperellum***

Briza Volusia Schetini

MESTRADO PROFISSIONAL

Urutaí – Go

2017

BRIZA VOLUSIA SCHETINI

**MANEJO DE *Heterodera glycines* EMPREGANDO ENZIMAS
HIDROLÍTICAS DE *Trichoderma asperellum***

Orientador: Fernando Godinho de Araújo

Coorientadora: Kátia Flávia Fernandes Silva

Dissertação apresentada ao
Instituto Federal Goiano –
Campus Urutaí, como parte
das exigências do Programa de
Pós- Graduação em Proteção
de Plantas para obtenção do
título de MESTRE.

Urutaí - Go

2017

Schetini, Briza Volusia.

Manejo de *Heterodera glycines* empregando enzimas hidrolíticas de *Trichoderma asperellum*/ Briza Volusia Schetini. - 2017.

26 f. il.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Godinho de Araújo.

Dissertação (Mestrado) –Instituto Federal Goiano, 2017.
Bibliografia.

1. Atividade enzimática.2. Quitinase. 3. Nematóide de cisto.

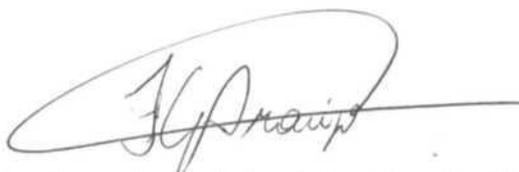
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: “Manejo de *Heterodera glycines* empregando enzimas hidrolíticas de *Trichoderma asperellum*”.

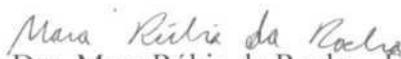
AUTORA: Briza Volusia Schetini

ORIENTADOR: Fernando Godinho de Araújo

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de **MESTRE EM PROTEÇÃO DE PLANTAS**, pela comissão examinadora:



Prof. Dr. Fernando Godinho de Araújo – Presidente
Instituto Federal Goiano – Campus Urutaí



Prof. Dra. Mara Rúbia da Rocha - Examinadora
Universidade Federal de Goiás– Campus Samambaia



Dr. Alexander Augusto da Silveira Examinador
Universidade Federal de Goiás– Campus Samambaia

Data da realização: 15 de março de 2017.

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me permitido chegar até aqui, e me dado sabedoria em todos os momentos.

Aos meus pais, Sheila Volusia Lopes e Hugo Schetini Junior, minha irmã Tauana Volusia Schetini e meus avós paternos e maternos.

Ao meu namorado, Nailor Prudente, pela paciência e amor em todos os momentos.

Ao professor e orientador Fernando Godinho de Araújo, por estar sempre disponível para me auxiliar, e me apoiar em todas as etapas.

À professora e coorientadora Kátia Flávia Fernandes, responsável pelo Laboratório de Química de Proteínas, pela parceria e disposição em todos os momentos.

Aos membros do laboratório de Química de Proteínas da Universidade Federal de Goiás, em especial professor Alexsander Augusto e Jackeline Santana que tanto me ensinaram.

Aos membros do laboratório de Fisiologia Vegetal e do Parasitismo do Instituto Federal Goiano – Campus Urutaí pelo auxílio no desenvolvimento dos projetos.

As minhas grandes companheiras de sala e amigas Dahís Ramalho, Vanessa Mendes e Monique Dias.

À primeira turma do Mestrado Profissional em Proteção de Plantas do Instituto Federal Goiano.

Aos meus professores.

Ao Instituto Federal Goiano pela concessão da bolsa de estudos.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	v
1. INTRODUÇÃO	01
2. OBJETIVOS	04
3. MATERIAIS E MÉTODOS	05
3.1 PRODUÇÃO DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS A PARTIR DE <i>T. asperellum</i>	05
3.2 ATIVIDADE ENZIMÁTICA	07
3.3 AVALIAÇÃO DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS NA DEGRADAÇÃO DE CISTOS E OVOS DE <i>H. glycines</i>	08
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	10
5. CONCLUSÃO	16
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	17

RESUMO

O nematoide de cisto da soja, *Heterodera glycines*, é considerado uma das principais doenças da cultura da soja devido aos sérios prejuízos que pode causar e por sua facilidade de disseminação. O objetivo deste trabalho foi determinar o potencial das enzimas hidrolíticas produzidas a partir de *Trichoderma asperellum* no manejo do nematoide de cisto da soja. O ensaio foi conduzido no Laboratório de Química de Proteínas da Universidade Federal de Goiás e o fungo utilizado foi o *Trichoderma asperellum* estirpe T00, fornecido pelo Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Goiás. Os esporos de *T. asperellum* foram inoculados em frascos contendo 100 mL de meio líquido TLE (Peptona bacteriológica, ureia, KH_2PO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $(\text{MgSO}_4)_7\text{H}_2\text{O}$, CaCl_2 –Anidro, Solução Elementos traços (0,01%), glicose e quitina) e as fontes de quitina do meio foram quitina triturada, quitina triturada juntamente com cistos de *H. glycines* e carrapato. Foi realizada a diálise e liofilização das amostras e foram separadas pequenas amostras para realização da atividade enzimática dos meios produzidos. Os testes com *H. glycines* foram realizados em placas de Petri com três repetições, e os cistos foram dispostos em papel filtro. A inoculação das enzimas foi realizada na dose de 10 microlitros por placa com os diferentes tratamentos (enzimas produzidas a partir de cistos de nematoide, quitina triturada e carrapato). As avaliações de cisto degradados foram feitas em 24, 48 e 72 horas após a inoculação e a contagem do número de ovos por cisto foi realizada 72 horas após a inoculação. A atividade específica das enzimas comprovam a presença de glucanase, nagase e quitinase no meio, e sua utilização promoveu uma degradação dos cistos do nematoide, e a concentração de 20 mg/mL reduziu o número de ovos de *H. glycines*.

Palavras chaves: Quitinases; atividade enzimática; nematoide de cisto.

ABSTRACT

The soybean cyst nematode (SCN), *Heterodera glycines*, is considered one of the major diseases of soybean crop due to the serious damage it can cause and its ease of dissemination. The objective of this work was to determine the potential of the hydrolytic enzymes produced by *Trichoderma asperellum* in the management of the SCN. The assay was carried out in the Laboratory of Protein Chemistry of the Federal University of Goiás and the fungus used was *Trichoderma asperellum* strain T00, provided by the Department of Biochemistry and Molecular Biology of the Federal University of Goiás. The *T. asperellum* spores were inoculated into flasks containing 100 mL of TLE liquid medium (Bacteriological peptone, urea, KH₂PO₄, (NH₄)₂SO₄, (MgSO₄)₇H₂O, CaCl₂-Anhydrous, Trace Elements Solution (0.01%), glucose, and chitin) and the chitin sources of the medium were ground chitin, ground chitin with *H. glycines* cysts and ticks. After the dialysis and lyophilization, small samples were separated to perform the enzymatic activity of the media produced. Tests with *H. glycines* were performed on Petri dishes with three replicates, and the cysts were put on filter paper. The inoculation of the enzymes was made at a dose of 10 microliters per plate, with the different treatments: enzymes produced from nematode cysts, ground chitin, and tick. The degraded cyst evaluations were done at 24-, 48-, and 72-hours after inoculation and counting the number of eggs per cyst was performed 72-hours after inoculation. The specific activity of the enzymes confirms the presence of glucanase, nagase and chitinase in the medium, and its use promoted a degradation of the nematode cysts, and the concentration of 20 mg / mL reduced the number of eggs of *H. glycines*.

Keywords: Chitinases; enzymatic activity; Cyst nematode.

INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max*) é uma leguminosa originária da China e pertence à família Fabaceae (SEDIYAMA et al., 2009). Este grão, rico em proteínas, tem uma ampla participação do complexo agroindustrial, sendo hoje produzida e negociada por produtores de diversos países (HIRAKURI et al., 2011). Segundo a Conab (2016) a estimativa para a produção de grãos para a safra 2016/2017 é de 213,1 milhões de toneladas, e estima-se para a soja uma projeção de crescimento de 7,3 % na produção, atingindo 102,4 milhões de toneladas.

Com o aumento do potencial produtivo da cultura juntamente com o seu cultivo em diversos ambientes, as doenças surgem como um fator restritivo para a produção deste grão, necessitando assim de uma maior atenção principalmente em medidas de controle (MEYER et al., 2014). Já foram identificadas aproximadamente 40 doenças na cultura, causadas por fungos, bactérias, nematoides e vírus no Brasil (EMBRAPA, 2003).

O nematoide de cisto da soja, *Heterodera glycines* Ichinohe (1952), é considerado uma das principais doenças da cultura da soja devido aos sérios prejuízos que pode causar e por sua facilidade de disseminação (EMBRAPA, 2011). Foi detectado no Brasil pela primeira vez na safra de 1991/92 (LIMA et al., 1992; LORDELLO et al., 1992; MONTEIRO & MORAIS, 1992), e hoje está presente em cerca de 10 Estados, incluindo Goiás (EMBRAPA, 2003). A partir da sua detecção, sua disseminação foi rápida e os danos foram muito graves à produção de soja, especialmente no cerrado brasileiro (DIAS et al., 2009).

A presença deste nematoide na lavoura dificulta a absorção de água e nutrientes pela planta devido a sua penetração direta nas raízes da soja, resultando em um porte reduzido das plantas e clorose na parte aérea, que pode chegar a ocasionar a morte do vegetal. Os sintomas geralmente se apresentam em forma de reboleiras, e a doença é conhecida como nanismo amarelo da soja (GRIGOLLI & ASMUS, 2014).

Pertence à família *Heteroderidae*, o *H. glycines* é uma das espécies capazes de formarem cistos. A forma infectante do nematoide são os juvenis de segundo estágio (J2), logo após sua eclosão. Eles penetram nas raízes e vão se nutrindo e se tornando cada vez mais robustos para então sofrerem mais duas ecdises (J3 e J4). Com a realização da quarta e última ecdise, os machos param de se alimentar e deixam as raízes, e as fêmeas se fixam as raízes e adquirem um formato de limão, e retém a maioria dos ovos no interior dos úteros e estes podem ser liberados para fora para então iniciar um novo ciclo (FILHO et al, 1995). O ciclo de vida varia

de 21 a 24 dias com temperaturas de 23°C a 25°C, sendo assim possível 4 a 5 gerações em apenas um ciclo de soja (TIHOHOD, 2000).

Os juvenis de *H.glycines* são capazes de se movimentarem no solo apenas alguns centímetros por ano. Sendo assim, o homem é o principal disseminador deste nematoide para áreas até então livres, através do transporte de plantas infestadas e solo aderido a sementes e implementos agrícolas (TIHOHOD, 2000).

Áreas onde há a detecção da infestação de *H. glycines* surge uma necessidade do produtor conviver com o mesmo, pois as chances de erradicação são quase nulas. Por isso, devem ser adotadas práticas que minimizem as perdas, como rotação de culturas com plantas não hospedeiras e uso de cultivares resistentes (DIAS et al., 2010). Dependendo da infestação da área, é recomendado utilizar o plantio de culturas como arroz, algodão, sorgo, milho, mamona e girassol durante a safra, eliminando a cultura da soja por um ano, com o intuito de reduzir a população do nematoide (GRIGOLLI & ASMUS, 2014).

O uso de cultivares resistentes é o método de controle mais aceito pelo produtor (DIAS et al, 2010). O grande problema é que o patógeno apresenta uma enorme variabilidade genética, fato que diminui a vida útil das cultivares resistentes (DIAS et al, 2010). Para evitar a perda da resistência, as variedades com essa característica devem ser utilizadas juntamente com a rotação com plantas não hospedeiras e variedades de soja suscetível ao nematoide a fim de reduzir a pressão de seleção devido a variabilidade genética (CAVINESS, 1992).

Outras alternativas de controle que se destaca é o biológico, de suma importância devido à ausência de um controle químico eficiente (ARAUJO et al., 2002). O controle biológico tem se destacado como uma alternativa mais viável financeiramente e ambientalmente quando comparado ao controle químico (ARAUJO & MARCHESI, 2009). O gênero *Trichoderma* abrange espécies de fungos que possuem a capacidade de parasitar outros fungos, e não são parasitas de plantas pelo fato de apresentarem compostos que induzem resistência localizada ou sistêmica (HARMAN et. al, 2004). Sendo assim, os fungos deste gênero se tornaram o agente de biocontrole mais estudado e mais utilizado (BETTIOL, 2009).

Algumas linhagens possuem a capacidade de produzir enzimas que degradam paredes celulares de outros organismos, garantindo um biocontrole em diversas doenças (SILVA et al, 2011). A sua atividade de biocontrole está relacionada a síntese de enzimas hidrolíticas tais como: quitinases, glucanases, proteases e nagases que degradam a parede celular de outros organismos (SILVA et al, 2011). No geral, a parede celular dos microorganismos é composta

de glucanase que fazem ligação cruzada com quitina. Devido a essa composição, essa degradação da parede celular dos fitopatógenos são realizadas principalmente por β - 1,3-glicanases, quitinases e proteases, chamadas enzimas hidrolíticas (SIQUEIRA, 2012).

As quitinases são enzimas hidrolíticas que são responsáveis pela degradação da quitina (Henrissat & Bairoch, 1993). A quitina é um componente estrutural presente em uma grande quantidade de organismos, incluindo fungos, insetos, crustáceos e ovos de nematoides (COHEN, 1993).

Gan et.al, (2007), estudando o potencial da quitinase e seu papel no biocontrole de *Meloidogyne incognita*, observaram em três dias de incubação de ovos de nematoide com quitinase LPCHI1 que 38,2% dos óvulos imaturos não se desenvolveram em ovos ou juvenis, em contraste com o controle em que apenas 19,8% não conseguiram se desenvolver. A incubação com protease purificada fez com que 45,9% dos ovos não eclodissem, e o tratamento combinando quitinase e protease diminuiu a taxa de incubação em 56,5%. Os ovos tratados com enzima apresentaram um aspecto inchado, e a casca dos ovos perderam a suas estruturas originais, apresentando ovos deformados e casca degradada.

Os nematoides apresentam a quitina como um componente estrutural da casca do ovo. São proteínas extracelulares porém apresentam um papel biológico na eclosão dos ovos (GAOA, 2002). Por apresentarem quitina, os estudos entre as enzimas hidrolíticas de *Trichoderma asperellum* para controlar os nematoides são promissores e de grande importância.

OBJETIVO

O presente trabalho teve como objetivo determinar o potencial das enzimas hidrolíticas produzidas a partir de *Trichoderma asperellum* no manejo do nematoide de cisto da soja.

MATERIAL E MÉTODOS

O ensaio foi conduzido no Laboratório de Química de Proteínas da Universidade Federal de Goiás e as enzimas produzidas a partir da utilização do fungo *Trichoderma asperellum*, na presença do meio líquido TLE, a partir de diferentes fontes de quitinas. Todo o meio líquido passou por processo de diálise, quantificação enzimática e liofilização das amostras.

Produção de enzimas hidrolíticas a partir de *T. asperellum*

O fungo utilizado foi o *Trichoderma asperellum* estirpe T00 fornecido pelo Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Goiás. Foram retirados 100 μ L da solução de esporos do fungo e adicionados a uma placa de Petri contendo meio MEA (Ágar Extraído de Malte para Microbiologia) para crescimento, por um período de 7 dias.

Para o preparo da suspensão de esporos, foi acrescentado na câmara de fluxo laminar 10 mL de solução salina na placa de Petri que houve o crescimento do fungo *Trichoderma asperellum*. Com a utilização de uma alça de Drigalski foi feita uma raspagem na mesma placa contendo o micélio do fungo, e este material foi recolhido e adicionado em um tubo tipo Falcon, ficando com 10 mL de solução fúngica (Falcon 1). No tubo Falcon 2 e 3 foram adicionados 9 mL de solução salina em cada. Do tubo Falcon 1 contendo 10 mL de solução fúngica foi retirado 1 mL e adicionado ao segundo tubo Falcon, contendo apenas solução salina (10^{-2} de solução de esporos). Do tubo Falcon 2 foi retirado 1 mL de solução fúngica com salina e adicionado ao tubo Falcon 3 (10^{-3} de solução de esporos). Foi realizada a leitura a fim de confirmar a solução de esporos em câmara de Neubauer em microscópio óptico com aumento de 40 vezes.

Os esporos de *T. asperellum* foram inoculados em frascos contendo 100 mL do meio líquido TLE, com a composição de sais descrita na Tabela 1. Os sais que compõem o meio TLE foram devidamente pesados e depositados em um Erlenmeyer juntamente com 1 litro de água destilada para o preparo do meio líquido para produção das enzimas.

Tabela 1. Composição do meio líquido TLE utilizado para a produção das enzimas a partir de *T. asperellum*. Goiânia-GO, 2017.

Composição	Quantidade
Peptona bacteriológica	1 g
Ureia	0,3 g
KH ₂ PO ₄	2 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,4 g
(MgSO ₄) ₇ H ₂ O	0,3 g
CaCl ₂ –Anidro	0,15 g
Solução Elementos traços (0,01%)	4 mL
Glicose	0,2 g
Quitina	5 g

KH₂PO₄: Fosfato monopotássico; (NH₄)₂SO₄: Sulfato de amônio; (MgSO₄)₇H₂O: Sulfato de magnésio heptahidratado; CaCl₂: Cloreto de cálcio.

O líquido foi colocado em um agitador magnético para solubilização completa dos sais. Foram preparados 5 Erlenmeyer de 500 mL, com as soluções descritas na Tabela 2. Os Erlenmeyer contavam com diferentes fontes de quitina, sendo que para o Erlenmeyer 1, foi utilizado para a produção de enzimas quitina triturada como fonte de quitina. No Erlenmeyer de número 2, foi utilizado cistos de nematoides juntamente com quitina triturada como fonte de quitina. O Erlenmeyer de número 3 foi utilizado para a produção de enzimas a partir de carrapatos, sendo os crustáceos como fonte de quitina. O Erlenmeyer de número 4 foi realizado para o controle de crescimento, e o de número 5 para o controle de contaminação.

Tabela 2. Composição dos substratos utilizados como fonte de quitina para produção de enzimas, Goiânia-GO, 2017.

Erlenmeyer	TLE (mL)	Solução de esporos (mL)	Aminoácidos (g)	Fonte de Quitina
1	100,00	1,00	0,01	0,5 g de QT
2	100,00	1,00	0,01	0,4513 g de QT + 0,0487 g de CN
3	100,00	1,00	0,01	0,5 g de carrapato
4*	100,00	1,00	0,01	0,5 g de glicose
5**	100,00	0,00	0,01	0,5 g de QT

QT: Quitina triturada; CN: cistos de *H. glycines*; *Controle de crescimento; **Controle de contaminação.

O erlenmeyers foram tampados com esponjas e folhas de papel, e levados para autoclave até atingir a temperatura de 120°C. Após a autoclavagem do meio, é que foram adicionados 1 mL de solução de esporos de *Trichoderma asperellum* em cada frasco de 500 mL na câmara de fluxo, e incubados em um agitador rotativo (180 rpm), durante o período de 6 dias.

Após o período de 6 dias, a solução foi filtrada utilizando papel filtro, com a finalidade de descartar a parte sólida e recolher apenas o sobrenadante. Após a filtragem, a diálise foi

realizada para a remoção de sais da amostra para posterior liofilização. Para este procedimento, foram utilizadas membranas de diálise cortadas em pedaços que foram hidratados com água destilada. A solução foi colocada dentro da membrana, que foi tampada e colocada no agitador magnético por 30 minutos em água destilada. Após este tempo, a água destilada do frasco foi trocada e colocada no agitador por um período de 1 hora. Este processo de troca de água foi repetido por mais 2 vezes, e depois da última troca foi deixado 24 horas no agitador.

Após o período de 24 horas, o meio foi separado para a determinação da atividade enzimática, e em seguida as amostras foram liofilizadas com o auxílio de um Liofilizador Liotop 101, por um período de 4 dias, e o material obtido foi colocado em tubos do tipo Falcon.

Atividade enzimática

A atividade de quitinase foi analisada pela incubação de 250 μL de quitina coloidal juntamente com 250 μL do meio preparado com TLE e esporos de *T. asperellum* em banho maria a 37°C por 1 hora. Em seguida, o meio foi centrifugado (4000 rpm) por 5 minutos. Após a centrifugação, foi retirado 125 μL do meio juntamente com 25 μL de tetraborato de potássio deixando ferver por 3 minutos. Em seguida, foi adicionado 750 μL de reagente DMAB (dimetil aminobenzaldeído) e incubado a 37°C por 10 minutos. A leitura foi feita espectrofotometricamente a 585 nm (MOLANO et al, 1977).

A atividade de protease foi determinada pela incubação de 100 μL do meio, 400 μL de tampão fosfato de sódio 0,1 mol/L e 500 μL de caseína 1% (m/v) a 37°C por um período de 20 minutos. A reação foi interrompida com 1,0 mL de solução de ácido tricloroacético (TCA) 10%, e centrifugado durante 5 minutos. A leitura foi feita espectrofotometricamente a 280 nm (ARNON, 1970).

A atividade de β -1,3-glucanase foi analisada como descrito por Noronha e Ulhoa (2000). Foi incubado 50 μL do meio líquido juntamente com 100 μL de Laminarina 0,25%, a 40°C por 60 minutos. Foi adicionado 900 μL de ácido 3,5-dinitrosalicílico (ADNS) e fervido por 5 minutos. A leitura foi feita espectrofotometricamente a 550 nm (BARA, LIMA E ULHOA, 2003).

Para a atividade de N-acetilglicosaminidase foi retirado 50 μL da amostra juntamente com 100 μL de p-nitrofenol-N-acetilglicosamina 0,005 mol L⁻¹ (PNP -NAG) e 350 μL de

Tampão Acetato de sódio e incubado a 37°C por 15 minutos. A solução foi parada com a adição de 1 mL de Na₂CO₃ e a leitura foi feita espectrofotometricamente a 405 nm (YABUKI et al., 1986).

Avaliação de enzimas hidrolíticas na degradação de cistos e ovos de *H. glycines*

Para extração dos cistos, foi coletado 100 cm³ de solo dos inóculos provenientes da casa-de-vegetação do IF Goiano – Campus Urutaí. O solo foi retirado e colocado em um Becker de 2 litros de capacidade. No Becker, foi adicionado água, e a suspensão foi deixada decantar por 30 segundos, e em seguida, o material foi vertido em uma peneira de 20 mesh sobre 60 mesh. O processo foi repetido por três vezes, e o material retido na peneira de 60 mesh foi filtrado em um papel de filtro sobre uma calha telada (ANDRADE et al., 1995).

Os testes foram realizados com todos os tratamentos em triplicata, onde os cistos foram dispostos em papel filtro em placas de petri. As aplicações das enzimas preparadas foram realizadas apenas no primeiro dia, com a dose de 10 microlitros em todas as placas. As placas foram deixadas em temperatura ambiente (25°C) e as avaliações dos cistos foram feitas em 24 horas, 48 horas e 72 horas após a aplicação. Foram realizados dois ensaios, com os tratamentos apresentados na tabela 3.

Após 72 horas, os cistos tratados com as enzimas foram retirados das placas de Petri e rompidos em uma peneira de 100 mesh sobre uma peneira de 400 mesh. Os ovos foram retidos na peneira de 400 mesh e vertidos em um becker de 50 mL. A suspensão foi homogeneizada e os ovos foram quantificados com o auxílio de um microscópio óptico com aumento de 50 vezes em câmara de Peters, seguindo a metodologia descrita por Tihohod (1993).

Tabela 3. Tratamentos e soluções correspondentes aos ensaios realizados juntamente com as concentrações enzimáticas. Goiânia-GO, 2017.

ENSAIO 1	
Tratamentos	Concentração
Controle - tampão acetato de sódio	
Controle – gel	
Enzimas - nematoides T	
Enzimas - carrapatos G	10 mg/mL
Enzimas - carrapatos T	
Enzimas - Quitina triturada T	
Enzimas - Quitina triturada G	
ENSAIO 2	
Tratamentos	Concentração
Controle - tampão acetato de sódio	
Controle – gel	
Enzimas - nematoides T	10 mg/mL
Enzimas - quitina triturada T	
Enzimas - quitina triturada G	
Controle - tampão acetato de sódio	
Controle – gel	
Enzimas - nematoides T	20 mg/mL
Enzimas - quitina triturada T	
Enzimas - quitina triturada G	

T: Enzimas ressuspensas em tampão acetato de sódio; G: enzimas ressuspensas em gel

Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando o programa SISVAR 5.6. Os dados que não apresentaram normalidade foram transformados. Todas as transformações seguiram $\sqrt{x + 1}$ para a realização da ANOVA. O teste utilizado foi o Teste de Tukey à 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A utilização de *T. asperellum* em meio TLE combinada com quitina triturada, e cistos de *H. glycines* levaram a produção de enzimas como quitinase, β -1,3-glucanase e N-acetilglicosaminidase (Tabela 4), confirmando assim que foram produzidas enzimas nos meios que foram preparados. Nota-se que as enzimas produzidas com *H. glycines* apresentaram uma quantidade de enzimas considerável, assim como as produzidas apenas com quitina triturada, sendo assim houve uma semelhança na produção de enzimas de ambos os meios. Dessa forma, a quitina triturada pode ser utilizada em substituição aos cistos de *H. glycines* para o preparo das enzimas, resultando assim em um processo viável de produção.

Silva e Ulhoa caracterizando bioquimicamente β -1,3-glucanase produzida por *T. asperellum*, observaram que o fungo apresentou atividade de glucanase em todas as fontes de carbono utilizadas, porém a maior quantidade estava presente no meio contendo quitina triturada como fonte de carbono. Sendo assim, a produção de enzima é dependente da fonte de carbono utilizada. Alguns fatores podem alterar a produção de enzimas, como aeração, pH, cepa utilizada e temperatura de incubação (DAHYIA et al, 2006).

Tabela 4. Concentração de enzimas obtidas de *Trichoderma asperellum* utilizando quitina triturada e cistos de nematoides. Goiânia – GO, 2017.

Meios	Enzima	Atividade ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Atividade específica (U mg^{-1} proteína)
Quitina triturada	β -1,3-glucanase	4900	261,11
	NAGase	5790	30,85
	Quitinase	1960	10,44
Quitina triturada e <i>H. glycines</i>	β -1,3-glucanase	4960	29,29
	NAGase	33300	196,65
	Quitinase	1500	8,85

O número de cistos degradados em 24, 48 e 72 horas de avaliação diferiram em função dos diferentes tratamentos empregando ou não enzimas hidrolíticas (Tabela 5). As 24 horas após a instalação do ensaio, observou-se um maior número de cistos degradados nos tratamentos: controle gel, enzimas nematoides, enzimas carrapato gel e enzima carrapato tampão. Já nas avaliações as 48 h e 72 h todos os tratamentos diferiram do controle tampão. O número de cistos degradados aumentou em função do tempo de avaliação, com exceção do controle utilizando tampão que quando comparado as enzimas não apresentou degradação dos

cistos (Figura 1). O número de ovos por cisto foi menor nos tratamentos controle gel, enzimas nematoides, enzima carrapato tampão e quitina gel (Tabela 5).

Tabela 5. Cistos degradados de *Heterodera glycines* a cada 24 horas e contagem de ovos de cistos submetidos às enzimas do primeiro ensaio, utilizando a concentração de 10 mg/mL. Goiânia – GO, 2017.

Tratamentos	Cistos degradados*			Número de ovos por cisto*
	24 horas	48 horas	72 horas	
Controle Tampão	0,33 bA	0,33 bA	0,33 bA	57,48 a
Controle gel	2,33 aB	5,33 aB	11,33 aA	24,26 b
Enzimas nematoides	2,00 aB	6,33 aAB	10,00 aA	22,04 b
Enzima carrapato gel	2,66 aA	3,33 aA	5,66 aA	72,75 a
Enzima carrapato tampão	1,33 aB	3,33 aAB	7,00 aA	35,55 b
Quitina tampão	0,33 bB	5,66 aA	9,00 aA	66,35 a
Quitina gel	0,66 bB	6,33 aA	10,66 aA	33,20 b
CV %	27,97	24,75	28,18	20,46

Médias seguidas de mesma letra minúscula dentro de cada coluna, e maiúscula dentro de cada linha não diferem entre si pelo Teste de Tukey. *Os dados apresentados são originais. Análise feita a partir de dados transformados.

Quanto a interação dos diferentes períodos de avaliação (24, 48 e 72 horas) dentro de cada tratamento, pode-se observar que apenas para o controle tampão e para o tratamento enzima carrapato gel, os resultados não diferiram estatisticamente. Resultados diferente foi encontrado para os demais tratamentos, onde pode ser observado que o aumento do período de permanência dos cistos nos tratamentos acaba por implicar num maior número de cistos degradados (Tabela 5).

Os resultados encontrados concordam com o observado na literatura para *Meloidogyne javanica*, em que observou-se a redução da reprodução do nematoide e do número de ovos e juvenis por grama de raiz com a aplicação de quitina no solo, e quitina no solo juntamente com quitosana via foliar (MOTA & SANTOS, 2016).

Tikhonov et. al (2002), estudando o efeito das quitinases purificadas em *Globodera pallida* (nematoides formadores de cisto) observaram que as cutículas dos ovos não tratados com enzimas apresentavam um aspecto suave. Com o tratamento com quitinases purificadas e produzidas a partir dos fungos *Verticillium chlamyosporium* e *Verticillium suchlasporium* houve danos na cutícula de ovos de *Globodera pallida*.

Bactérias produtoras de quitinase também influenciaram na eclosão de ovos do nematoide de cisto da batata *Globodera rostochiensis*. Segundo Cronin et.al, (1997), a presença da quitinase purificada inibiu significativamente a eclosão dos ovos quando comparado com o

controle. Foram testadas 39 bactérias produtoras de quitinase, e todas elas inibiram a eclosão dos ovos, mesmo que em graus diferentes. Esses resultados corroboram com os observados por Tian et. al, 2000, que estudando diferentes níveis de quitina em substrato para controle de *Heterodera glycines* relataram que houve uma diminuição do número de nematoide para todos os isolados bacterianos testados com o aumento do nível de quitina.

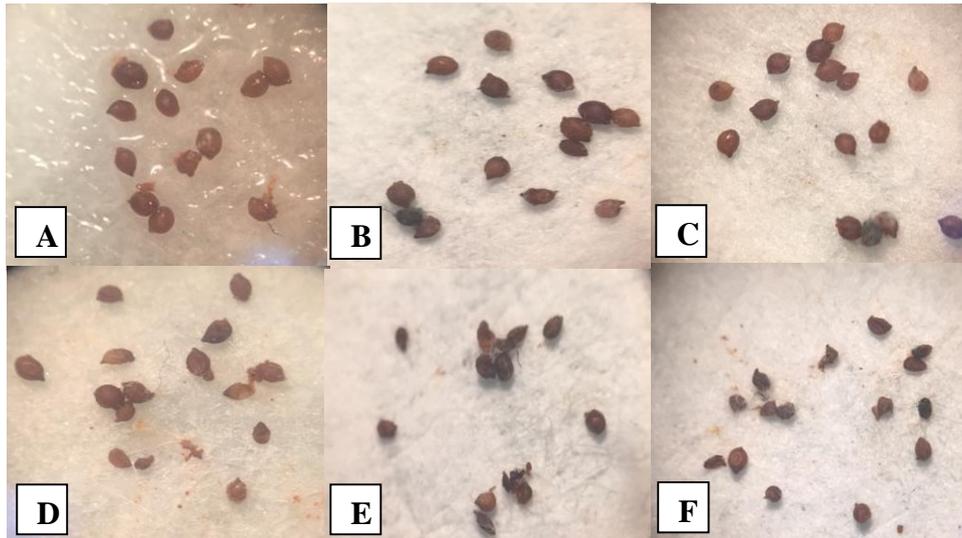


Figura 1. Cistos de *H. glycines* dispostos em placas de Petri, contendo os tratamentos: controle utilizando tampão, e enzimas de *T. asperellum* utilizando cistos de nematoides, em 24, 48 e 72 horas de avaliação. A (Tampão 24 horas); B (Tampão 48 horas); C (Tampão 72 horas); D (Enzimas nematoides 24 horas); E (Enzimas nematoides 48 horas); F (Enzimas nematoides 72 horas).

Levando em consideração o segundo ensaio, onde foi avaliada a relação de diferentes concentrações, com diferentes períodos de avaliação em função de diferentes tratamentos, não observaram-se diferenças significativas quando comparadas as médias de cistos degradados para as concentrações estudadas (Tabela 7).

Avaliando as diferentes concentrações das enzimas hidrolíticas (10 e 20 mg/mL), os resultados demonstram que todos os tratamentos diferiram do controle tampão as 24, 48 e 72 horas (Tabela 7). Já em relação as análises dos diferentes tempos de avaliação em função de cada tratamento, para o segundo ensaio, observou-se que apenas o tratamento com enzimas nematoides na concentração de 20 mg/mL, apresentou resultados estatisticamente significantes, diferindo dos demais tratamentos, evidenciando que o aumento do tempo de exposição dos cistos ao tratamento promove aumento no número de cistos degradados (Tabela 7). Os resultados da concentração de 10 mg/mL não apresentaram diferença significativa entre os períodos de avaliação dentro de cada tratamento (Tabela 7).

Tabela 7. Cistos degradados de *Heterodera glycines* submetidos à enzimas utilizando diferentes concentrações e diferentes períodos de avaliação. Goiânia – GO, 2017.

Tratamentos	Cistos degradados					
	10 mg/mL			20 mg/mL		
	24 horas	48 horas	72 horas	24 horas*	48 horas	72 horas
Controle Tampão	0,33 ^{bA}	1,00 ^{bA}	1,00 ^{bA}	0,33 ^{bA}	1,00 ^{bA}	1,00 ^{bA}
Controle gel	8,66 ^{aA}	9,66 ^{aA}	10,00 ^{aA}	8,66 ^{aA}	9,66 ^{aA}	10,00 ^{aA}
Enzimas nematoides	6,33 ^{aA}	7,33 ^{aA}	8,66 ^{aA}	6,33 ^{aB}	7,00 ^{aAB}	9,00 ^{aA}
Quitina tampão	7,33 ^{aA}	7,66 ^{aA}	9,00 ^{aA}	6,00 ^{aA}	7,00 ^{aA}	8,33 ^{aA}
Quitina gel	8,00 ^{aA}	8,33 ^{aA}	8,66 ^{aA}	8,00 ^{aA}	8,33 ^{aA}	9,66 ^{aA}
Média	6,13A	6,79 A	7,46 A	5,86 A	6,59A	7,59 A
CV %	24,27	13,82	10,8	15,61	22,3	11,52

Médias seguidas de mesma letra minúscula dentro de cada coluna, e maiúscula dentro de cada linha para as diferentes concentrações, não diferem entre si pelo Teste de Tukey.

*Os dados apresentados são originais. Análise feita a partir de dados transformados.

Com relação ao número de ovos por cisto, no ensaio com concentração de 10 mg/mL não foi detectada diferença significativas entre os tratamentos (Figura 3). No entanto, na concentração de 20 mg/mL os tratamentos empregando enzimas de nematoides, quitina tampão e quitina gel tiveram um menor número de ovos por cistos quando comparado aos tratamentos controle tampão e gel (Figura 3). O número de ovos foi comparado entre as diferentes concentrações (10 e 20 mg/mL), apresentando significativa redução do número de ovos por cisto na concentração de 20 mg/mL para os tratamentos enzimas nematoides, quitina tampão e quitina triturada (Figura 3).

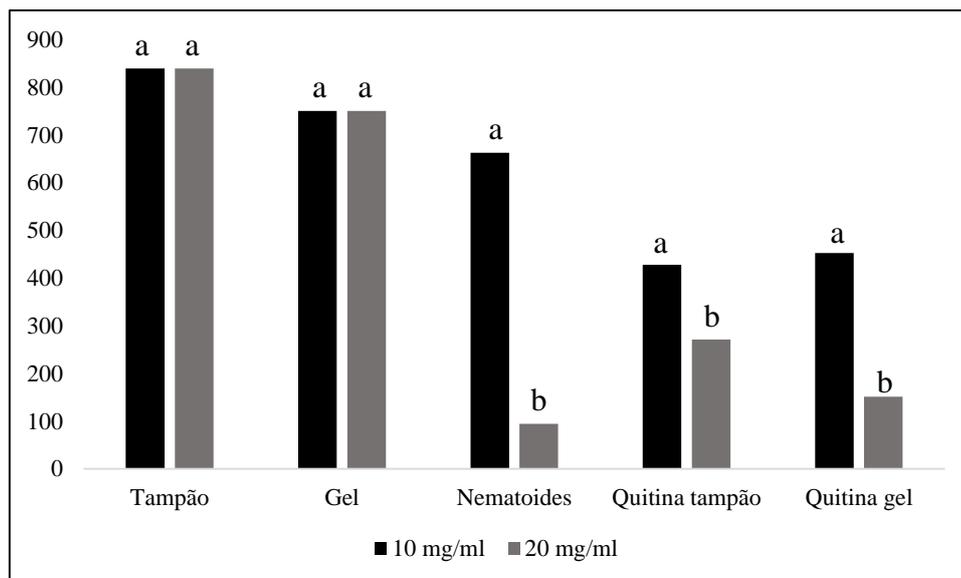


Figura 3. Comparação das médias de número de ovos dos diferentes tratamentos em função da concentração enzimática.

Nos três ensaios realizados, o controle diferenciou dos demais tratamentos em relação ao número de cistos degradados ao longo das avaliações. Zhang e outros colaboradores (2014), estudando o efeito de *Trichoderma longibrachiatum* em *Heterodera avanae*, relataram em ensaios in vitro que concentrações $1,5 \times 10^4$ a $1,5 \times 10^8$ esporos/mL tiveram um efeito forte e letal sobre os cistos do nematoide. No mesmo trabalho, a quitina coloidal e os cistos de nematoides induziram a produção de quitinase de *T. longibrachiatum*. A ação inibidora do *Trichoderma* em outros patógenos se dá principalmente pela ação combinada de enzimas que degradam parede celular juntamente com diferentes metabólitos secundários que o mesmo produz (REINO et.al, 2008).

A cutícula do ovo de *Heterodera glycines* apresenta uma camada vitelina exterior, uma camada média de quitina, e uma interior de lipídeo (BURGWYN et.al, 2003). A redução do número de ovos nos tratamentos contendo as enzimas pode ser explicada pelo fato da quitina ser um componente estrutural das paredes celulares, sendo assim as quitinases contribuem para o micoparasitismo. (KARLSSON et.al, 2016). Graminha et. al (2001) citado por Santin (2008), relata que um grande número de microorganismos contam com a presença de atividade quitinolíticas, sendo assim os fungos que são produtores de quitinase são eficientes no parasitismo de ovos.

O fungo *Paecilomyces lilacinus* em estudos de protease e quitinase e seus efeitos sobre os ovos de nematoides, apresentou capacidade de através de suas serino proteases de reduzir o número de juvenil, e também interromper o desenvolvimento de *Meloidogyne javanica* (KHAN et al, 2004). Os mesmos autores observaram mudanças nas estruturas da casca de ovo e na eclosão de juvenis de *Meloidogyne javanica* utilizando protease e quitinase de *Paecilomyces lilacinus* aplicadas individualmente ou em combinação. A eclosão dos juvenis foi menor quando os ovos foram expostos a protease e a combinação de protease com quitinase.

Outros fungos também foram relatados no controle de fitonematoides. Sabe-se que o fungo *Purpureocillium lilacinum* parasita ovos de *Meloidogyne* spp. O fungo se alimenta de quitina, que é encontrada em quantidade apreciável em uma das camadas dos ovos, sendo assim o parasitismo se concentra na parte externa das raízes, nas massas de ovos formadas pelo fitonematoide (FERRAZ & BROWN, 2016). Segundo Soares, (2014), os Fungos *Monacrosporium thaumasium* e *Monacrosporium sinense* mostraram que suas enzimas

extracelulares apresentam atividade nematicida sobre diferentes nematoides, em seus estudos sobre produção, purificação e identificação de enzimas extracelulares de fungos nematófagos.

Os ovos do nematoide apresentam estrutura biológica bem resistente, porém são suscetíveis de serem atacados por fungos. A quitinase entra com a importância de romper ou causar ruptura nas cascas de ovos (GORTARI & HOURS, 2008). Isso explica a menor quantidade de ovos encontrada em cistos tratados com enzimas a partir de *T. asperellum*.

CONCLUSÃO

Existe a presença de enzimas hidrolíticas nos meios preparados a partir de quitina triturada, tanto com e sem a adição de cistos de *H. glycines*, comprovado pela atividade específica da β -1,3-glucanase, NAGase, e Quitinase.

A utilização de enzimas hidrolíticas produzidas a partir de substrato de quitina triturada com ou sem a adição de cistos de *H. glycines* promovem uma degradação dos cistos desse nematoide.

Os estudos realizados nos ensaios laboratoriais de contagem de ovos demonstraram que houve uma diminuição do número de ovos de *H. glycines* tratados com enzimas de *T. asperellum* na concentração de 20 mg/mL.

Devem ser conduzidos mais estudos com as enzimas produzidas a partir de *T. asperellum* no sentido de otimizar a aplicação das mesmas no solo, objetivando o manejo de *H. glycines*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Araujo, F.F.; Marchesi, G.V.P. Uso de *Bacillus subtilis* no controle da meloidoginose e na promoção do crescimento do tomateiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n.5, p.1558-1561, ago, 2009.
- Araujo, F.F., Silva, J.F.V., Araujo, A.S.F. Influência de *Bacillus subtilis* na eclosão, orientação e infecção de *Heterodera glycines* em soja. **Ciência Rural**, vol. 32, no.2, Santa Maria Apr, 2002.
- Andrade, P.J.M; Asmus, G.L.; Silva, J.F.V. Um novo sistema para detecção e contagem de cistos de *Heterodera glycines* recuperados de amostras de solo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 20 (supl.), p. 358, 1995.
- Arnon, R. Papain. In: Perlmann, G.; Lorand, L. (orgs). *Methods in Enzimology*. New York: Academic Press, p. 226-244, 1970.
- Bara, M.T.F.; Lima, A.L.; Ulhoa, C.J. Purification and characterization of na a exo-b-1,3-glucanase produced by *Trichoderma asperellum*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 219, p. 81-85. 2003.
- Bettiol, W. Biocontrole de doenças de plantas: Uso e perspectivas. Embrapa Meio Ambiente. Jaguariúna, SP. 341 p. 2009.
- Burgwyn, B.; Nagel, B.; Ryerse, J.; Bolla, R.I. *Heterodera glycines*: eggshell ultrastructure and histochemical localization of chitinous componentes. **Experimental Parasitology** 104 (2003) 47–53.
- Cohen, E. Chitin synthesis and degradation as targets for pesticide action. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 22:245-261, 1993.
- Cronin, D.; Loccoz, Y. M.; Dunne, C.; O’Gara, F. *European Journal of Plant Pathology* 103: 433–440, 1997. 433 c 1997 Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands. Inhibition of egg hatch of the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis* by chitinase-producing bacteria.
- CONAB, Companhia Nacional Abastecimento. Observatório Agrícola, Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos, V.4, SAFRA 2016/2017, n. 3, Terceiro Levantamento, dez. 2016. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_12_22_12_08_27_boletim_graos_d_ezembro_2016.pdf. Acessado em 06/02/2017.
- Caviness, C.E. Breeding for resistance to soybean cyst nematode. In: RIGGS, R.D.; WRATHER, J.A. (Eds.) *Biology and management of the soybean cyst nematode*, Saint Paul: **The American Phytopathological Society**, 1992. p.143-156.
- Dias, W.P.; Silva, J. F.V.; Carneiro, G. E. s.; Garcia, A.; Arias, C.A.A. Nematode de cisto da Soja: Biologia e Manejo pelo Uso da Resistência Genética. Embrapa Soja, Londrina PR. *Nematologia Brasileira*, Piracicaba SP, 2009.
- Dahiya, N.; Tewari, R.; Hoondal, G.S. Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. **Applied Microbiology Biotechnologu**, v. 71, p. 773-782, 2006.

Dias, W.P.; Silva, J.F.V.; Carneiro, G.E.S.; Garcia, A.; Arias, C.A.A. Nematóides de Cisto da Soja: Biologia e Manejo pelo Uso da Resistência Genética. Embrapa Soja, Londrina (PR), Brasil. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, Sp, v.33, 2009.

Filho, A.B; Kimati, H; Amorim, L. Manual de Fitopatologia. Volume 1: Princípios e conceitos, 3ª Edição, 1995.

Dias, W. P; Garcia, A; Silva, J.FV; Carneiro, G. E.S. Nematóides em Soja: Identificação e Controle. Circular Técnica ISSN 2176. Londrina, 2010. Disponível em: http://www.cnpso.embrapa.br/download/CT76_eletronica.pdf. Acessado em: 30/05/2016.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Tecnologias de produção de soja – Região Central do Brasil – 2012 e 2013. Londrina: Embrapa Soja. 261 p. 2011.

Embrapa Soja. Ensaio cooperativos de controle químico de mofo branco na cultura da soja: safras 2009 a 2012. Documentos 345, Março, 2014. Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/101371/1/Ensaio-cooperativos-de-controle-quimico-de-mofo-branco-na-cultura-da-soja-safras-2009-a-2012.pdf>. Acessado em 06/02/2017.

Embrapa Soja. Tecnologias de Produção de Soja, Região Central do Brasil. Sistema de Produção 1, versão eletrônica, Jan, 2003. Disponível em: <https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Soja/SojaCentralBrasil2003/doenca.htm>. Acessado em 06/02/2017.

Embrapa. Nematóides em Soja: Identificação e Controle. Circular Técnica 76, Londrina, PR, Abril, 2010. Disponível em: http://www.cnpso.embrapa.br/download/CT76_eletronica.pdf. Acessado em 06/02/2017.

Ferraz, L.C.C.B.; Brown, D.J.F. Nematologia de plantas: fundamentos e importância. L.C.C.B. Ferraz e D.J.F. Brown (Orgs.). Manaus: NORMA EDITORA, 2016.

Gan, Z.; Yang, J.; Tao, N.; Liang, L.; Mi, Q.; Li, J.; Zhang, K.Q. Cloning of the gene *Lecanicillium psalliotae* chitinase *Lpch1* and identification of its potential role in the biocontrol of root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. BIOTECHNOLOGICALLY RELEVANT ENZYMES AND PROTEINS. Appl Microbiol Biotechnol. 76:1309–1317, 2007.

Gortari, M.C. and Hours, R.A. (2008). Fungal chitinases and their biological role in the antagonism onto nematode eggs. A review. *Mycological Progress*, vol. 7, no. 4, p. 221-238.

Grigolli, J. F. J; Asmus, G.L. Manejo de Nematóides na Cultura da Soja. Tecnologia e Produção: Soja 2013/2014. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/985986/1/cap.9.pdf>. Acessado em 30/05/2016.

Gaoa, B; Allena, R; Maierb, T; McDermottb, J.P; Davisc, E.L; Baumb, T.J; Hussey, R.S. Characterisation and developmental expression of a chitinase gene in *Heterodera glycines*. **International Journal for Parasitology** 32,1293–1300, 2002.

Harman, G.E; Howell, C. R; Viterbo, A. Chet, I; Lorito, M. Trichoderma species opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiology** 2, 43–56, 2004.

Hirakuri, M. H.; Lazzarotto, J. J. Evolução e perspectivas de desempenho econômico associadas com a produção de soja nos contextos mundial e brasileiro. 3. ed. – versão eletrônica. Londrina, EMBRAPASOJA, 2011. (Documentos, Embrapa Soja, n. 319).

Henrissat B, Bairoch A (1993). New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J* 293:781–788.

Hirakuri, M. H.; Lazzarotto, J. J. Evolução e perspectivas de desempenho econômico associadas com a produção de soja nos contextos mundial e brasileiro. 3. ed. – versão eletrônica. Londrina, EMBRAPASOJA, 2011. (Documentos, Embrapa Soja, n. 319).

Khan, A.; Williams, K.L.; Nevalainen, H.K.M. Effects of *Paecilomyces lilacinus* protease and chitinase on their eggshell structures and hatching of *Meloidogyne javanica* juveniles. **Biological Control** 31, p.346-352, 2004.

Karlsson, M.; Stenlid, J.; Lindahl, B. Functional differentiation of chitinases in the White-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Fungal Ecology**, v.22. p. 52-60, 2016.

Lima, R.D., S. Ferraz, S. & J.M. Santos. 1992. Ocorrência de *Heterodera* sp. em soja, no Triângulo Mineiro. **Nematologia Brasileira**, 16: 101-102.

Lordello, A.I., Lordello, R.R.A., Quaggio, J.A. (1992). *Heterodra* sp. reduz produção de soja no Brasil. In: Congresso Brasileiro de Nematologia, 16., Lavras. Resumos... Larvas: Sociedade Brasileira de Nematologia / Escola Superior de Agricultura de Lavras, 1992. p. 81.

Monteiro, A.R., Morais, S.R.A.C. (1992). Ocorrência do nematóide de cisto da soja, *Heterodera glycines*, Ichinohe, 1952, prejudicando a cultura da soja no Mato Grosso do Sul. In: Congresso Brasileiro de Nematologia, 16., Lavras. Resumos... Larvas: Sociedade Brasileira de Nematologia / Escola Superior de Agricultura de Lavras, 1992. p. 82.

Mota, L.C.B.; Santos, M.A.; Chitin and chitosan on *Meloidogyne javanica* management and on chitinase activity in tomato plants. *Trop. plant pathol.* (2016) 41:84–90.

Meyer, M.C.; Campos, H.D.; Godoy, C.V.; Utiamada, C.M. (Ed.). Ensaios cooperativos de controle químico de mofo-branco na cultura da soja: safras 2009 a 2012. Londrina: Embrapa Soja, 2014. 100p. (Embrapa Soja. Documentos, 345).

Molano, J.; Duram, A.; Cabib, E. A rapid and sensitive assay for chitinase using tritriated chitin. *Anal. Biochem.* 1977, 83, 648–656.

Noronha, E.F.; Ulhoa, C.J. Characterization of a 29-kDa β -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum*. **FEMS Microbiology Letters**, v.183, p. 199-23, 2000.

Reino, J.L; Guerrero, R.F; Galán, R.H; Collado, I. G. Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. **Phytochem Rev.** 7:89 -123, 2008.

Santin, R. C. M. Gortari, M.C. and Hours, R.A. (2008). Fungal chitinases and their biological role in the antagonism onto nematode eggs. A review. *Mycological Progress*, vol. 7, no. 4, p. 221-238. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia (tese). Programa de pós graduação em Fitotecnia, 2008.

Silva, J.C.O; Gonçalves, L. D; Barbosa, M.C.S; Barbosa, A.C; Malu, E.G.M; Lage, G.A. Biocontrole de doenças de plantas: Uso de *Trichoderma* spp na agricultura. IV Semana de Ciência e Tecnologia do IFMG - Campus Bambuí. IV Jornada Científica, 2011.

Silva, B. D.; Ulhoa, C. J.; Batista, K. A.; Yamashita, F.; Fernandes, K. F. Potential Fungal Inhibition by Immobilized Hydrolytic Enzymes from *Trichoderma asperellum*. **Journal of agricultural and food chemistry**, 59, 8148-8154, 2011.

Siqueira, S.J.L. (2012). Estudos bioquímicos e moleculares de genes de trichoderma envolvidos no mecanismo de micoparasitismo. Dissertação. Universidade Federal de Goiás. Goiânia. 123p.

Soares, F.E.D. Produção, purificação e identificação de enzimas extracelulares de fungos nematófagos e suas atividades nematocidas. Universidade Federal de Viçosa (tese). Minas Gerais, 2014.

Silva, R.C.; Ulhoa, C. J. CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DAS β -1,3-GLUCANASES PRODUZIDAS POR *Trichoderma asperellum*. Instituto de Ciências Biológicas-Laboratório de Enzimologia / UFG.

Sediyama, T.; Teixeira, R. de C.; Barros, H. B. Origem, evolução e importância econômica. In: SEDIYAMA, T. (Ed.). Tecnologias de produção e usos da soja. Londrina: Mecenas, 2009.

Tikhonov V. E, Lopez-Llorca L. V, Salinas J. J.H.B. Purification and characterization of chitinases from the nematophagous fungi *Verticillium chlamyosporium* and *Verticillium suchlasporium*. **Fungal Genet Biol.**35:6778, 2002.

Tihohod, D. Nematologia Agrícola Aplicada. 2ª Edição. Jaboticabal- SP, Funesp, 2000.

Tian, H.; Riggs, R.D.; Crippen, D.L. Control of Soybean Cyst Nematode by Chitinolytic Bacteria with Chitin Substrate. **Journal of Nematology** 32, p. 370-376, 2000.

Tihohod, D. Nematologia agrícola aplicada. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, 1993. 372p.

Yabuki, M.; Mizushima, K.; Amatatsu, T.; Ando, A.; Fujji, T.; Shimada, M.; YAMASHIDA, M. Purification and characterization of chitinase and chitobiase produced by *Aeromonas hydrophyla* subsp. *Anaerogenes*. **Applied Microbiology**, v.32, p. 25-32. 1986.

Zhang, S.; Gan, Y.; Xu, Bingliang.; Xue, Yingyu. The parasitic and lethal effects of *Trichoderma longibrachiatum* against *Heterodera avenae*. **Biological Control**, volume 72, May 2014, pages 1-8.