

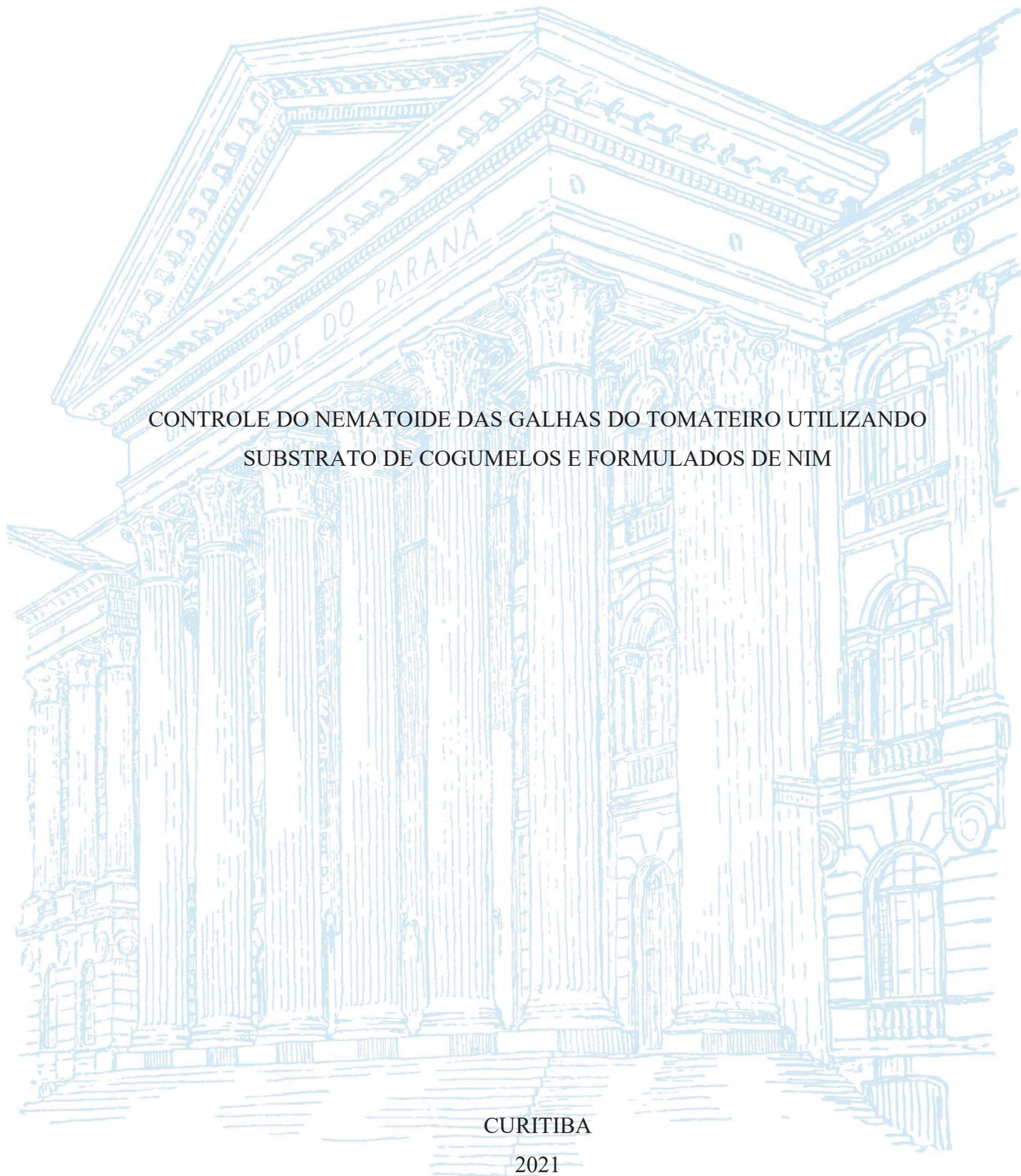
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARLON HENRIQUE HAHN

CONTROLE DO NEMATOIDE DAS GALHAS DO TOMATEIRO UTILIZANDO  
SUBSTRATO DE COGUMELOS E FORMULADOS DE NIM

CURITIBA

2021



MARLON HENRIQUE HAHN

CONTROLE DO NEMATOIDE DAS GALHAS DO TOMATEIRO UTILIZANDO  
SUBSTRATO DE COGUMELOS E FORMULADOS DE NIM

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientador: Dr. Henrique da Silva Silveira Duarte

Co-orientadores: Dr<sup>a</sup> Louise Larissa May De Mío  
Dr. Sérgio Miguel Mazaro

CURITIBA

2021

Hahn, Marlon Henrique

Controle do nematoide das galhas do tomateiro utilizando substrato de cogumelos e formulados de Nim. - Curitiba, 2021.

78f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia.

Orientador: Dr. Henrique da Silva Silveira Duarte

Coorientadora: Dra. Louise Larissa May De Mio

Coorientador: Dr. Sérgio Miguel Mazaro

1. Nematoides - controle. 2. Tomateiro. 3. *Meloidogyne javanica*.  
I. Duarte, Henrique da Silva Silveira. II. De Mio, Louise Larissa May. III.  
Mazaro, Sérgio Miguel. IV. Título V. Universidade Federal do Paraná.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO AGRONOMIA  
(PRODUÇÃO VEGETAL) - 40001016031P6

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em AGRONOMIA (PRODUÇÃO VEGETAL) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **MARLON HENRIQUE HAHN** intitulada: **CONTROLE DO NEMATOIDE DAS GALHAS EM TOMATEIRO UTILIZANDO O SUBSTRATO DE COGUMELOS E FORMULADOS DE NIM**, sob orientação do Prof. Dr. HENRIQUE DA SILVA SILVEIRA DUARTE, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 31 de Agosto de 2021.

Assinatura Eletrônica

31/08/2021 20:46:30.0

HENRIQUE DA SILVA SILVEIRA DUARTE

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

02/09/2021 10:52:19.0

RENATA FAIER CALEGARIO

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

01/09/2021 23:35:48.0

PAULO AFONSO FERREIRA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO)

Assinatura Eletrônica

31/08/2021 21:39:01.0

SERGIO MIGUEL MAZARO

Coorientador(a)

Rua dos Funcionários, 1540 - CURITIBA - Paraná - Brasil  
CEP 80035-050 - Tel: (41) 3350-5601 - E-mail: [pgapv@ufpr.br](mailto:pgapv@ufpr.br)

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 109058

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp>  
e insira o código 109058

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus familiares, especialmente minha mãe Marcia Maria Hahn Siqueira, minha avó Maria Nelsi Welter e minha bisavó Selma Machry (*in memoriam*), pela educação e incentivo que me permitiu chegar até aqui. Ao meu companheiro e amigo, Paulo Henrique de Oliveira Bezerra por estar ao meu lado durante os momentos difíceis do doutorado.

Ao meu orientador, Prof<sup>o</sup> Dr. Henrique da Silva Silveira Duarte. Aos meus coorientadores, Prof<sup>a</sup> Dra. Louise Larissa May De Mio e Prof<sup>o</sup> Dr. Sérgio Miguel Mazaro, pelos ensinamentos, dedicação e confiança. Aos membros da banca de defesa de doutorado, Prof<sup>o</sup> Paulo Afonso Ferreira da Universidade Federal de Mato Grosso e a Prof<sup>a</sup> Renata Faier Calegario da Universidade Federal do Paraná pelas sugestões e contribuições.

Aos meus amigos e colegas do laboratório, Alexandre, Camilla, Carlos, Danielle, Débora, Dione, Eliane, Felipe, Gabriel, Giovana, Gloria, Guilherme, Heloisa, Jhulia, Juliana, Leonardo, Maria, Mayara, Meira, Rafaele, Renan, Thiago, Mônica, Pamela e Wagner.

Aos técnicos dos laboratórios Simone, Tiago, Cléia e Izabel.

Ao Prof<sup>o</sup> Dr. Átila Morgor, à Eng. Agr. Dra. Andressa Cristina Zamboni Machado pelo auxílio na obtenção do inóculo de *Meloidogyne* spp. utilizados neste trabalho.

Ao Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti, em especial ao Eng. Agr. Msc. Arlei Maceda, à Méd. Vet. e Gerente dos Laboratórios, Msc. Rosária Regina Tesoni de Barros Richartz Rosário, e a Eng. Agr. Carmen Silvia Chamiço pelo auxílio na utilização do laboratório de Nematologia da Agência de Defesa Agropecuária do Paraná - ADAPAR.

Ao Programa de Pós-graduação em Agronomia - Produção Vegetal, em especial aos coordenadores Prof<sup>o</sup> Dr. Anibal de Moraes e Prof<sup>o</sup> Dr. Arthur Arrobas Martins Barroso, e à secretária Lucimara.

À Universidade Federal do Paraná pela oportunidade de realização do curso de Mestrado em Agronomia - Produção Vegetal e à Universidade Estadual do Oeste do Paraná, pela oportunidade de realização do curso de graduação em Agronomia.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por conceder a bolsa de Doutorado.

Aos colegas e amigos de outros departamentos da universidade, que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

“O que planta e o que rega têm um só propósito, e cada um será recompensado de acordo com o seu próprio trabalho.”

(I Coríntios 3:8)

## RESUMO

Os nematoides das galhas (*Meloidogyne* spp.) podem ser considerados como os fitonematoides mais importantes para diversas culturas agrícolas, pois causam perdas médias na ordem de 25% na produtividade, são cosmopolitas, polípagos e possuem uma alta eficiência reprodutiva. O controle desses nematoides é difícil e pode demandar a integração de diversas medidas de controle. O controle de nematoides com fungos nematófagos e extratos vegetais vem ganhando destaque devido a demanda por produtos agrícolas produzidos sem agrotóxicos. Os fungos nematófagos já são utilizados comercialmente para o controle de *Meloidogyne*. Entretanto, somente poucas espécies desses fungos são utilizadas. Os cogumelos são espécies de fungos capazes de controlar os nematoides pela produção de substâncias nematicidas e estruturas de predação. Entretanto, a maioria dos estudos foram realizados em condições *in vitro*, evidenciando o efeito direto dos cogumelos sobre os nematoides. Considerando que as espécies *Lentinula edodes*, *Macrocybe titans* e *Pleurotus eryngii* possuem potencial de controle de *M. javanica*, objetivou-se no Capítulo I desse trabalho: i) verificar o potencial de produção de mudas de tomate cultivadas em substrato de cogumelo; ii) avaliar o controle de *M. javanica* a partir do cultivo de mudas de tomate em substrato de cogumelo; iii) verificar se a incorporação do substrato de cogumelo ao solo pode auxiliar no manejo de *M. javanica* em tomateiro. Além do efeito direto sobre os nematoides como estruturas de predação e produção de toxinas, os cogumelos podem afetar indiretamente os nematoides. Esse efeito indireto dos cogumelos ocorre pela indução de mecanismos de resistência das plantas aos nematoides. Assim, objetivou-se no Capítulo II desse trabalho verificar os mecanismos de resistência induzidos por *L. edodes* e *P. eryngii* contra *M. javanica* em plantas de tomateiros. Além dos cogumelos, os extratos vegetais podem atuar de maneira direta sobre os nematoides produzindo substâncias tóxicas. O extrato de Nim (*Azadirachta indica*) é rico em compostos químicos com potencial nematicida. Assim, objetivou-se no Capítulo III verificar a utilização de dois produtos comerciais a base de extrato bruto de Nim, o OpeNeem Flex e OpeNeem Plus para o controle de *M. javanica* em plantas de tomateiro. Os resultados obtidos no Capítulo I indicam que a produção de mudas de tomateiro em substrato de cogumelos não possui potencial de controle de *M. javanica*. Entretanto, a incorporação do substrato de cogumelo no substrato de cultivo de tomate em concentrações  $\geq 12,5\%$  para os isolados LEMID-Led02, LEMID-Mti01 e LEMID-Per01 e  $\geq 25\%$  para o isolado LEMID-Led01 reduziu o fator de reprodução do nematoide. Portanto, esta medida de controle torna-se uma ferramenta útil a ser incorporada no manejo integrado de *M. javanica*. No Capítulo II, os resultados apontam que as análises bioquímicas

demonstraram ocorrer indução de resistência nas plantas de tomateiro pelos substratos de cogumelos, ativando as enzimas relacionadas a defesa vegetal  $\beta$ -1,3-glucanase e quitinase, sendo a rota preferencial de defesa. No Capítulo III, os valores estimados de concentração efetiva de 50% de controle ( $CE_{50}$ ) de eclosão de J<sub>2</sub>'s foram de 0,44 e 0,40%, e para a mortalidade dos J<sub>2</sub>'s foram estimadas em 13,9 e 19,3%, respectivamente para OpeNeem Flex para OpeNeem Plus. As aplicações dos formulados OpeNeem Flex e OpeNeem Plus sobre plantas de tomateiros infestados com J<sub>2</sub>'s de *M. javanica* não apresentou efeitos significativos sobre a altura e massa da matéria seca das plantas de tomateiros, mas resultou na redução significativa do fator de reprodução de *M. javanica*. As concentrações de 1,0% dos formulados de Nim reduziu o fator de reprodução de *M. javanica* em 48,2% para OpeNeem Flex e 59,4% para OpeNeem Plus, controle semelhante ao obtido com a Abamectina (58,8%). Assim, a aplicação de formulados obtidos de subprodutos da produção de óleo de Nim possuem potencial de controle de *M. javanica* em plantas de tomateiro.

**Palavras-chave:** *Azadirachta indica*; indução de resistência; *Lentinula edodes*; *Meloidogyne javanica*; *Pleurotus eryngii*

## ABSTRACT

Root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) can be considered the most important plant parasitic nematodes for several agricultural crops, as they cause average losses in the order of 25% in productivity, are cosmopolitan, polyphagous and have a high reproductive efficiency. Controlling these nematodes is difficult and may require the integration of different control measures. The control of nematodes with nematophagous fungi and plant extracts has gained prominence due to the demand for agricultural products without pesticides. Nematophagous fungi are already commercially used to control *Meloidogyne*. However, only a few species of these fungi are used. Mushrooms are fungal species capable of controlling nematodes by producing nematicidal substances and predation structures. However, most studies were carried out under in vitro conditions, showing the direct effect of mushrooms on nematodes. Considering that the species *Lentinula edodes*, *Macrocybe titans* and *Pleurotus eryngii* have potential to control *M. javanica*, the objective of Chapter I of this study was to: i) verify the production potential of tomato seedlings cultivated in mushroom substrate; ii) evaluate the control of *M. javanica* from the cultivation of tomato seedlings in mushroom substrate; iii) verify if the incorporation of mushroom substrate to the soil can help in the management of *M. javanica* in tomato. In addition to the direct effect on nematodes, such as the formation of predation structures and toxin production, mushrooms can indirectly affect nematodes. This indirect effect of mushrooms occurs through the induction of plant resistance mechanisms to nematodes. Thus, the objective of Chapter II of this study was to verify the resistance mechanisms induced by *L. edodes* and *P. eryngii* against *M. javanica* in tomato plants. In addition to mushrooms, plant extracts can act directly on nematodes, producing toxic substances. Neem extract (*Azadirachta indica*) is rich in chemical compounds with nematicidal potential. Thus, the objective of Chapter III was to verify the use of two commercial products based on crude Neem extract, OpeNeem Flex and OpeNeem Plus, for the control of *M. javanica* in tomato plants. The results obtained in Chapter I indicate that the production of tomato seedlings in mushroom substrate has no potential to control *M. javanica*. However, the incorporation of mushroom substrate in tomato cultivation substrate at concentrations  $\geq 12.5\%$  for the isolates LEMID-Led02, LEMID-Mti01 and LEMID-Per01 and  $\geq 25\%$  for the isolate LEMID-Led01 reduced the reproduction factor of the nematode. Therefore, this control measure is a useful tool to be incorporated into the integrated management of *M. javanica*. In Chapter II, the biochemical analyzes showed that there was induction of resistance in tomato plants by mushroom substrates, with the activation of the  $\beta$ -1,3-glucanase and chitinase

enzymes related to plant defense, being the preferred defense pathway. In Chapter III, the estimated values of effective concentrations for 50% control ( $EC_{50}$ ) of  $J_2$ 's hatching were 0.44 and 0.40%, and for the mortality of  $J_2$ 's they were estimated at 13.9 and 19.3%, respectively for OpeNeem Flex for OpeNeem Plus. The applications of OpeNeem Flex and OpeNeem Plus formulations on tomato plants infested with *M. javanica*  $J_2$ 's did not show significant effects on height and dry matter of tomato plants but resulted in a significant reduction in the reproduction factor of *M. javanica*. Concentrations of 1.0% of the Neem formulations reduced the reproduction factor of *M. javanica* by 48.2% for OpeNeem Flex and by 59.4% for OpeNeem Plus, a control similar to that obtained with Abamectin (58.8%). Thus, the application of formulations obtained from Neem oil by-products have potential to control *M. javanica* in tomato plants.

**Keywords:** *Azadirachta indica*; resistance induction; *Lentinula edodes*; *Meloidogyne javanica*; *Pleurotus eryngii*.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>CAPÍTULO I - O SUBSTRATO DE COGUMELO PODE SER UMA ALTERNATIVA PARA CONTROLAR NEMATOIDES DAS GALHAS EM TOMATEIROS .....</b>	<b>8</b>
2.1	INTRODUÇÃO.....	10
2.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	11
2.2.1	Preparação de inóculo de nematoide .....	11
2.2.2	Preparação do substrato de cogumelo .....	11
2.2.3	Produção de mudas de tomate em substrato de cogumelo .....	12
2.2.4	Produção de mudas de tomate em substrato de cogumelo para o controle de <i>Meloidogyne javanica</i> .....	13
2.2.5	Incorporação de substrato de cogumelo no solo de cultivo de tomateiros para o controle de <i>Meloidogyne javanica</i> .....	13
2.2.6	Análise estatística .....	14
2.3	RESULTADOS .....	14
2.3.1	Produção de mudas de tomate em substrato de cogumelo .....	14
2.3.2	Produção de mudas de tomate em substrato de cogumelo para o controle de <i>Meloidogyne javanica</i> .....	16
2.3.3	Incorporação de substrato de cogumelo no solo de cultivo de tomateiros para o controle de <i>Meloidogyne javanica</i> .....	16
2.4	DISCUSSÃO.....	18
2.5	DECLARAÇÃO DE CONTRIBUIÇÃO DE AUTORIA.....	21
2.6	AGRADECIMENTOS .....	21
2.7	REFERÊNCIAS .....	22
<b>3</b>	<b>CAPÍTULO II – ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS EM TOMATEIROS CAUSADAS POR SUBSTRATOS DE COGUMELOS CONTRA NEMATOIDES DAS GALHAS.....</b>	<b>27</b>
3.1	INTRODUÇÃO.....	28
3.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.2.1	Inóculo de <i>Meloidogyne javanica</i> e preparo dos substratos de cogumelo .....	30
3.2.2	Tratamentos e delineamento experimental.....	30
3.2.3	Coleta das amostras e análise .....	31

3.2.4	Análise de dados.....	34
3.3	RESULTADOS.....	34
3.4	DISCUSSÃO.....	37
3.5	DECLARAÇÃO DE CONTRIBUIÇÃO DE AUTORIA.....	39
3.6	AGRADECIMENTOS.....	39
3.7	REFERÊNCIAS.....	40
<b>4</b>	<b>CAPÍTULO III – EFEITO DE FORMULAÇÕES COMERCIAIS DE NIM SOBRE OS NEMATOIDES DAS GALHAS.....</b>	<b>45</b>
4.1	INTRODUÇÃO.....	47
4.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	48
4.2.1	Formulados de Nim.....	48
4.2.2	Obtenção do inóculo de <i>Meloidogyne javanica</i> .....	48
4.2.3	Experimentos <i>in vitro</i> de eclosão e mortalidade de J <sub>2</sub> .....	49
4.2.4	Experimento de penetração e desenvolvimento de J <sub>2</sub> nas raízes de tomateiros.....	50
4.2.5	Experimento de desenvolvimento de reprodução de <i>Meloidogyne javanica</i> em plantas de tomateiro.....	51
4.2.6	Análise estatística.....	52
4.3	RESULTADOS.....	53
4.3.1	Experimentos <i>in vitro</i> de eclosão e mortalidade de J <sub>2</sub> .....	53
4.3.2	Experimento de penetração e desenvolvimento de J <sub>2</sub> nas raízes de tomateiros.....	54
4.3.3	Experimento de desenvolvimento de reprodução de <i>Meloidogyne javanica</i> em plantas de tomateiro.....	55
4.4	DISCUSSÃO.....	56
4.5	DECLARAÇÃO DE CONTRIBUIÇÃO DE AUTORIA.....	59
4.6	AGRADECIMENTOS.....	59
4.7	REFERÊNCIAS.....	59
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES GERAIS.....</b>	<b>63</b>
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS GERAIS.....</b>	<b>64</b>

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

No mundo foram produzidas 180,7 milhões de toneladas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) em 2019, em 5 milhões de ha (FAO, 2021). O Brasil é o décimo maior produtor de tomates do mundo (FAO, 2021), sendo que a cultura tem grande importância econômica (QUEZADO-DUVAL et al., 2013), produzindo cerca de 3,9 milhões de toneladas em cerca 54,5 mil ha em 2019. Os cinco maiores estados produtores são: Goiás, São Paulo, Minas Gerais, Bahia e Paraná, que respondem por cerca de 78% do total nacional. O Paraná foi o quinto estado em produção, produzindo cerca de 229 mil toneladas (SEAB/ DERAL, 2020)

A produção do tomate possui importância econômica para o Brasil devido as condições ambientais serem favoráveis para a produção. A temperatura afeta drasticamente a cultura do tomateiro, sendo que a temperatura ótima para a produção de tomates varia de 21 a 28 °C durante o dia e de 15 a 20 °C durante a noite (FILGUEIRA, 2000). A produção de tomates em temperaturas fora do intervalo ótimo de cultivo resulta em estresse nas plantas, menor fixação dos frutos e redução da qualidade dos frutos (FONTES; SILVA, 2019). Além disso, o cultivo de tomate em temperaturas distantes do intervalo ótimo favorece o desenvolvimento de pragas e doenças (SOUZA; RESENDE, 2003).

Os nematoides são patógenos causadores de doenças em tomateiros que se desenvolvem no mesmo intervalo das temperaturas ótimas para esta planta. Em consequência disso, as perdas em tomateiros suscetíveis podem chegar a 80% devido ao parasitismo de *Meloidogyne* spp. Goeldi (KAŞKAVALCI; ÖNCÜER, 1999). Esse gênero de nematoide é popularmente conhecido como nematoide das galhas, sendo capaz de parasitar mais de 2000 hospedeiros (KHALIL, 2013) e é possivelmente o patógeno de plantas mais prejudicial do mundo (TRUDGILL; BLOK, 2001). No Brasil, as espécies *Meloidogyne javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949 e *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1949 são frequentemente encontradas parasitando tomateiros (ROSA; WESTERICH; WILCKEN, 2014). Por exemplo, *M. incognita*, pode ser encontrada de regiões temperadas a tropicais, em qualquer lugar onde a temperatura mais baixa está acima de 3° C, o que torna a doença causada por este nematoide muito difícil de ser controlada (SASSER et al., 1983).

Na expectativa de atingir a máxima produtividade, os produtores utilizam estratégias de controle para manejar a população de nematoides. O controle químico é frequentemente utilizado no controle de nematoides em sistemas convencionais de cultivo. Atualmente há poucos nematicidas disponíveis no mercado brasileiro. Em 2021 no Estado do Paraná, é permitido o uso de Fluensulfone, Metam-sódio, Abamectina e extrato de alho para o controle

de *Meloidogyne* spp. em tomateiros (MAPA, 2021). Entretanto, a demanda mundial sobre a utilização de métodos de controle menos agressivos ao meio ambiente e a saúde humana, suprimiu o uso de alguns nematicidas químicos, e em alguns casos, muitos nematicidas foram banidos de alguns países ou tiveram seu uso restringido (COLLANGE et al., 2011). Em consequência disso, o manejo integrado vem ganhando destaque no controle de nematoides.

No manejo integrado de nematoides, as estratégias incluem os princípios de exclusão/evasão, redução do inoculo inicial, supressão da reprodução de nematoides e restrição de danos a cultura (BARKER; KOENNING, 1998). A principal medida de controle baseada no princípio de exclusão é a seleção de mudas saudáveis, que conseqüentemente impede a inserção de nematoides em uma área de cultivo (BRIDGE, 1996; COLLANGE et al., 2011). Entretanto, algumas vezes a inserção de nematoides é acidental, podendo ocorrer não somente pelo material propagativo, mas também por meio da água de irrigação (HUGO; MALAN, 2016), implementos agrícolas e/ou pelos calçados dos trabalhadores rurais (COLLANGE et al., 2011).

Quando a presença de nematoides é detectada na área de cultivo, o princípio da evasão é aplicado na ausência de cultivares resistentes ou espécies imunes. Entretanto, mesmo apresentando bons resultados de controle, a utilização de cultivares resistentes ou espécies vegetais imunes pode se tornar um problema para os próximos anos. Atualmente há relatos de suplantação de resistência, principalmente em relação ao gene de resistência *mi*. Populações virulentas de *M. incognita* no Brasil foram selecionadas e suplantaram a resistência do gene *mi* do híbrido de tomateiro 'Heinz 9992' (SILVA et al., 2019). Além da seleção de populações resistentes, as condições ambientais podem reduzir a eficiência dos genes de resistência, visto que cultivares e porta-enxertos resistentes apresentam aumento do número de galhas radiculares em temperaturas superiores a 28° C (DEVTRAN; SOGUT; MUTLU, 2010; HWANG et al., 2000; JABLONSKA et al., 2007). A utilização de diferentes medidas de controle, como a rotação de cultivares resistentes com cultivares suscetíveis e plantas não hospedeiras podem ser aliados para reduzir a pressão de seleção de linhagens de nematoides, evitando a suplantação de resistência (TZORTAKAKIS; GOWEN, 1996).

Enfim, o controle químico é danoso ao meio ambiente e a saúde humana, o princípio da evasão está cada vez mais difícil de ser aplicada, e as condições ambientais exigidas para a produção do tomateiro são muito semelhantes que as condições favoráveis ao nematoides, tudo isso torna o controle um desafio. Outro fator complicador é que a resistência dos cultivares atuais pode ser suplantada e novos cultivares demoram para serem lançadas. Neste cenário a busca por novas formas de controle para o manejo de nematoides é uma opção que deve ser investigada.

As medidas de controle biológico vêm ganhando destaque pela abordagem não prejudicial à saúde humana, ecologicamente correto, economicamente viável, oferecendo uma alternativa sustentável e econômica aos nematicidas químicos (SHAMALIE; FONSEKA; RAJAPAKSHA, 2012). Atualmente são conhecidos diversos seres vivos que influenciam na vida dos nematoides. Esses seres vivos incluem plantas, algas, bactérias, fungos, protozoários e outros nematoides (MUKHTAR; PERVAZ, 2003), capazes de predação e parasitar nematoides (EAPEN; BEENA; RAMANA, 2005; LIU; XIANG; CHE, 2009) ou produzir substâncias nematicidas (AKHTAR, 2000; BALDIN et al., 2012; KWOK et al., 1992; LI et al., 2007; PINEDA-ALEGRÍA et al., 2021; SOARES; SUFIATE; DE QUEIROZ, 2018; SUFIATE et al., 2017). Dentre esses seres vivos, os fungos e as bactérias já vêm sendo utilizadas em produtos nematicidas comercializados e aplicados como o controle químico. 0o9

No Brasil, os agentes de controle biológico de nematoides disponíveis são 49 produtos comerciais constituídos por fungos e bactérias, contendo uma única espécie ou mais espécies. Cerca de 73,4% dos produtos disponíveis para o controle biológico de nematoides possuem bactérias em sua formulação. As espécies de bactérias utilizadas são *Bacillus amyloliquefaciens* (28,6%), *Bacillus firmus* (6,1%), *Bacillus subtilis* (26,5%), *Bacillus licheniformis* (6,1%), *Bacillus velezensis* (4,1%) e *Pasteuria nishizawae* (2,0%). Os fungos nematófagos estão presentes na formulação de 34,7% dos produtos de controle biológico de nematoides. As espécies de fungos nematófagos utilizados são *Purpureocillium lilacinum* (14,3%, sin. *Paecilomyces lilacinus*), *Pochonia chlamydosporia* (8,2%), *Trichoderma asperellum* (2,0%), *Trichoderma harzianum* (8,2%), *Trichoderma koningiopsis* (2,0%) (MAPA, 2021).

Os fungos nematófagos são comuns no solo e podem produzir estruturas especializadas para a captura de nematoides, tais como anéis constritores, redes tridimensionais de hifas e estruturas adesivas, além de liberarem compostos tóxicos na solução do solo (MUKHTAR; PERVAZ, 2003). Alguns desses fungos nematófagos produzem basidiocarpos (cogumelos) e são utilizados principalmente para a alimentação humana. Os cogumelos dos gêneros *Agaricus*, *Amauroderma*, *Coprinus*, *Flammulina*, *Hericium*, *Hohenbuehelia*, *Lentinula*, *Macrocybe*, *Omphalotus*, *Peziza*, *Pleurotus*, *Resupinatus* e *Stropharia* apresentam algum potencial nematicida (ASLAM, 2013; BARRON; THORN, 1987; COMANS-PÉREZ et al., 2014; DEGENKOLB; VILCINSKAS, 2016; DONG et al., 2006; HIBBETT; THORN, 1994; ISHIZAKI; NOMURA; WATANABE, 2015; KWOK et al., 1992; LI et al., 2007; LUO et al., 2004, 2006, 2007; OKORIE; ONONUJU; OKWUJIAKO, 2011; STADLER et al., 1994; THORN; BARRON, 1984). Considerando o potencial dos cogumelos cultivados no Brasil para o controle de *Meloidogyne*, Hahn et al. (2019) realizaram testes *in vitro* com 24 isolados de 15

espécies de cogumelos e concluíram que isolados de *L. edodes* (LEMID-Led01 e LEMID-Led02), *M. titans* (LEMID-Mti01) e *P. eryngii* (LEMID-Per01) possuem efeito direto sobre os nematoides, e por isso têm potencial para uso no manejo de *M. javanica*. No entanto, experimentos realizados em condições *in vitro* requerem estudos complementares *in vivo* para verificar a interação planta-nematoide. Diante da possibilidade de avaliar o potencial do controle de nematoides como organismos antagônicos, o Capítulo I deste trabalho apresentar um estudo *in vivo* do potencial nematicida dos cogumelos *L. edodes* (LEMID-Led01 e LEMID-Led02), *M. titans* (LEMID-Mti01) e *P. eryngii* (LEMID-Per01) para o controle de *M. javanica* em plantas de tomateiro.

A interação do substrato de cogumelos com os nematoides estudado no capítulo I pode ocorrer de forma direta, onde o cogumelo age sobre os nematoides pela produção de toxinas ou estruturas de predação. O efeito direto pela produção de toxinas pelos cogumelos *L. edodes* e *P. eryngii* foi verificada anteriormente em experimentos *in vitro* (HAHN et al., 2019). Entretanto, os efeitos indiretos do substrato de cogumelos sobre os nematoides estão associados à interação dos nematoides com as plantas de tomateiro. Essa interação indireta ocorre por mecanismos de resistência expressados pelas plantas em resposta aos cogumelos e aos nematoides.

O potencial de indução de resistência dos cogumelos já foi estudado para doenças bacterianas (KWAK et al., 2015; SILVA; PASCHOLATI; BEDENDO, 2013) e fúngicas (PARADA et al., 2011, 2012). Entretanto, pouco se conhece sobre o potencial de controle de nematoides pela indução de resistência utilizando agentes biológicos. Sendo assim, o objetivo do Capítulo II é identificar os mecanismos bioquímicos envolvidos no controle da doença pela indução de resistência de plantas de tomateiros cultivados em solos incorporados com substratos de cogumelos das espécies *L. edodes* e *P. eryngii*.

Um outro assunto relevante para pesquisa com nematoides são a busca de substâncias químicas derivadas de planta com alto potencial de controle para nematoides. Por exemplo, o uso de toxinas produzidas pelo metabolismo secundário das plantas é amplamente usado no manejo de nematoides parasitas de plantas (CHITWOOD, 2002; OKA, 2010) e consiste em uma medida de controle alternativo. A incorporação de resíduos orgânicos ou a aplicação de extratos vegetais impacta fortemente as propriedades físicas e biológicas do solo e pode promover um ambiente favorável aos microrganismos antagonistas dos nematoides. Dentre as plantas com potencial nematicida, destaca-se o Nim (*Azadirachta indica* A. Juss).

O Nim possui dois produtos importantes para a agricultura, o óleo de Nim e a torta de Nim. O óleo de Nim é o óleo que sai na extração, já torta de Nim é um subproduto da prensagem

a frio das sementes (nozes) de Nim contendo menos azadiractina que o óleo. A maioria dos trabalhos que utilizaram azadiractina purificada não apresentou os efeitos nematicidas e nematostático esperados (JAVED et al., 2008a). Isso pode ser devido à instabilidade da azadiractina em solução aquosa (JARVIS; JOHNSON; MORGAN, 1998). Outros fatores podem estar associados à aplicação de compostos purificados obtidos do Nim, que podem não possuir as propriedades nematicidas ou nematostática necessárias para o controle eficiente (JAVED et al., 2008a).

Além da semente do Nim, outras partes da planta como folhas e galhos não lenhosos possuem diversas substâncias. As folhas e as sementes de Nim contêm uma série de triterpenóides como a nimbina e o salannina (JARVIS; JOHNSON; MORGAN, 1998). Outros compostos químicos também foram encontrados nas folhas de Nim, como: nimbina, nimbaneno, 6-desacetilnimbineno, nimban-diol, nimbolida, ácido ascórbico, n-hexacosanol, 7-desacetil-7-benzoilazadiradiona, 7-desacetil-7-benzoilunotina, 17- Hidroxiazadiradiona e nimbiol (HOSSAIN et al., 2013). Possivelmente muitos compostos obtidos do Nim possuem efeitos nematicidas, entretanto sua identidade ainda é incerta (AKHTAR, 2000; CHITWOOD, 2002; JAVED et al., 2008a). Na tentativa de utilizar o potencial desses compostos presentes nos subprodutos da produção de óleo de Nim (folhas e ramos) e comercializá-los, algumas empresas desenvolveram novos produtos. Deste modo, surge um novo mercado e novas alternativas para serem testadas para o controle de nematoides. Assim, o capítulo III deste trabalho apresentar um estudo *in vitro* e *in vivo* do potencial nematicida dos formulados comerciais de Nim OpeNeem Flex e OpeNeem Plus para o controle de *M. javanica* em plantas de tomateiro.

Considerando o exposto, os objetivos deste trabalho foram de verificar i) o potencial de produção de mudas de tomate cultivadas em substrato de cogumelo; ii) o controle de *M. javanica* a partir do cultivo de mudas de tomate em substrato de cogumelo; iii) se a incorporação do substrato de cogumelo ao solo pode auxiliar no manejo de *M. javanica* em tomateiro; iv) os mecanismos de resistência induzidos por *L. edodes* e *P. eryngii* contra *M. javanica* em plantas de tomateiros e v) a utilização de dois produtos comerciais a base de extrato bruto de Nim, o OpeNeem Flex e OpeNeem Plus para o controle de *M. javanica* em plantas de tomateiro.

## 2 CAPÍTULO I - O SUBSTRATO DE COGUMELO PODE SER UMA ALTERNATIVA PARA CONTROLAR NEMATOIDES DAS GALHAS EM TOMATEIROS

Marlon Henrique Hahn <sup>a</sup>; Danielle Dutra Martinha <sup>a</sup>; Sérgio Miguel Mazaró <sup>b</sup>; Louise Larissa May De Mio <sup>a</sup>; Henrique da Silva Silveira Duarte <sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Fitotecnia e Fitossanidade, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná - UFPR, Curitiba, PR, Brasil. E-mail: [marlonhhahn@gmail.com](mailto:marlonhhahn@gmail.com); [danielledmartinha@gmail.com](mailto:danielledmartinha@gmail.com); [maydemio@gmail.com](mailto:maydemio@gmail.com).

<sup>b</sup> Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR Dois Vizinhos, PR, Brasil. E-mail: [sergio@utfpr.edu.br](mailto:sergio@utfpr.edu.br).

\* Autor para correspondência. H. S. S. Duarte, e-mail: [henriqueduarte@ufpr.br](mailto:henriqueduarte@ufpr.br)

### RESUMO

O tomate é afetado pelo parasitismo dos nematoides das galhas (*Meloidogyne* spp.). Dentre as medidas de controle, o uso de cogumelos capazes de produzir substâncias nematicidas ou estruturas de predação tem se tornado uma possibilidade para o manejo dos nematoides. Assim, os objetivos deste estudo foram verificar: i) o potencial de produção de mudas de tomate cultivadas em substrato de cogumelo; ii) o controle de *M. javanica* a partir do cultivo de mudas de tomate em substrato de cogumelo e iii) se a incorporação do substrato de cogumelo ao solo pode auxiliar no manejo de *M. javanica* em tomateiro. Isolados de *Lentinula edodes* (LEMID-Led01 e LEMID-Led02), *Macrocybe titans* (LEMID-Mti01) e *Pleurotus eryngii* (LEMID-Per01) foram pré-selecionados como espécies potenciais para o controle de nematoides. Os quatro substratos de cogumelos foram testados, e cada um dos substratos foi misturado em substrato de muda comercial nas concentrações de 0, 25, 50, 75 e 100% para o crescimento de mudas de tomate. Mudas cultivadas em substrato de cogumelo a 100% de cada um dos quatro isolados foram infestadas com *M. javanica*. A incorporação do substrato do cogumelo ao solo foi testada nas concentrações de 0,0, 12,5, 25,0, 37,5 e 50,0% e posteriormente os tomateiros foram cultivados e então o solo foi infestado com *M. javanica*. O uso de substrato de cogumelo para a produção de mudas de tomateiro afetou a emergência, altura e massa da matéria seca total das mudas. O uso de substrato 100% de cogumelo não teve potencial para controlar *M. javanica* no cultivo de mudas de tomate. A incorporação do substrato cogumelo ao solo reduziu a altura e a massa da matéria seca total dos tomateiros infestados com *M. javanica*. No entanto, a incorporação do substrato de cogumelo no substrato de cultivo de tomate em concentrações  $\geq 12,5\%$  para os isolados LEMID-Led02, LEMID-Mti01 e LEMID-Per01 reduziram em mais

de 33,42, 50,17 e 35,19% no fator de reprodução de *M. javanica*, respectivamente. No caso do LEMID-Led01, as concentrações de  $\geq 25\%$  de substrato reduziu em mais de 41,10% o fator de reprodução de *M. javanica*. Portanto, a incorporação do substrato de cogumelos ao solo é uma medida de controle potencialmente útil a ser incorporada no manejo integrado do nematoide *M. javanica*, mas o substrato 100% de cogumelo não deve ser utilizado para produção de mudas.

**Palavras-chave:** *Lentinula edodes*; *Macrocybe titans*; *Pleurotus eryngii*; nematoides das galhas

### ABSTRACT

Tomatoes are affected by root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.) parasitism. Among the control measures, the use of mushrooms capable of producing nematicidal substances or predation structures has become a possibility for the management of nematodes. Thus, the objectives of this study were to verify: i) the production potential of tomato seedlings cultivated in mushroom substrate; ii) the control of *M. javanica* from the cultivation of tomato seedlings in mushroom substrate and iii) whether the incorporation of mushroom substrate to the soil can help in the management of *M. javanica* in tomato. Isolates of *Lentinula edodes* (LEMID-Led01 and LEMID-Led02), *Macrocybe titans* (LEMID-Mti01) and *Pleurotus eryngii* (LEMID-Per01) were pre-selected as potential species for nematode control. The four mushroom substrates were tested, and each substrate was mixed in commercial seedling substrate at concentrations of 0, 25, 50, 75 and 100% for the growth of tomato seedlings. Seedlings grown in 100% mushroom substrate of each of the four isolates were infested with *M. javanica*. The incorporation of mushroom substrate to the soil was tested at concentrations of 0.0, 12.5, 25.0, 37.5 and 50.0%, the tomato plants were cultivated, and the soil was infested with *M. javanica*. The use of mushroom substrate to produce tomato seedlings affected the emergence, height and total dry matter mass of the seedlings. The use of 100% mushroom substrate had no potential to control *M. javanica* in tomato seedling cultivation. However, incorporation of mushroom substrate in tomato cultivation substrate at concentrations  $\geq 12.5\%$  for isolates LEMID-Led02, LEMID-Mti01 and LEMID-Per01 reduced *M. javanica* reproduction factor by more than 33.42, 50.17 and 35.19%, respectively. In the case of LEMID-Led01, concentrations of  $\geq 25\%$  of substrate reduced the reproduction factor of *M. javanica* by more than 41.10%. Therefore, soil incorporation of mushroom substrate is a potentially useful control measure to be incorporated into integrated management of *M. javanica* nematode, but 100% mushroom substrate should not be used for seedling production.

**Keywords:** *Lentinula edodes*; *Macrocybe titans*; *Pleurotus eryngii*; root-knot nematode

## 2.1 INTRODUÇÃO

O tomate (*Solanum lycopersicum* L.) é uma hortaliça apreciada em todo o mundo, sendo uma fonte rica em micronutrientes como minerais, vitaminas e antioxidantes para uma dieta humana bem balanceada (SEID et al., 2015). Em 2019, foram produzidas 180,7 milhões de toneladas da fruta em 5 milhões de ha, sendo o Brasil o 10º maior produtor (FAO, 2021). No entanto, a produção é afetada por doenças em vários estágios do desenvolvimento do tomate. São conhecidas pelo menos cerca de 200 doenças e distúrbios fisiológicos que ocorrem no tomate (SINGH; SINGH; KUMAR, 2017), sendo os nematoides do gênero *Meloidogyne* spp. de grande importância (SEID et al., 2015). No Brasil, as espécies *Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood e *Meloidogyne incognita* (Kofoid e White) Chitwood são frequentemente associadas ao tomate (BELAN et al., 2009) e o manejo destas doenças é fundamental para a cultura.

O controle químico é frequentemente usado no manejo de nematoides em tomateiros. No entanto, atualmente existem poucos nematicidas disponíveis para uso em tomateiros no Brasil (MAPA, 2021). Devido ao impacto negativo dos nematicidas no meio ambiente e na saúde humana, novas medidas de controle de origem natural estão sendo desenvolvidas, as quais estão inseridas no contexto da agricultura sustentável (BRIDGE, 1996). Assim, o controle biológico realizado pela aplicação de microrganismos vivos e/ou seus derivados, óleos essenciais, extratos vegetais, substâncias bioativas naturais e resíduos industriais (PHILBRICK et al., 2020) é uma alternativa atraente para o manejo de nematoides.

Os fungos nematófagos têm destaque no controle biológico, pois possuem estratégias de sobrevivência que variam entre o parasitismo e a predação (LIU; XIANG; CHE, 2009). Mais de 185 espécies de fungos nematófagos com potencial para o manejo de *Meloidogyne* spp. são conhecidos (HAHN et al., 2018). Dentre essas espécies, os cogumelos vêm ganhando destaque devido à capacidade predatória de nematoides (BARRON; THORN, 1987; LUO et al., 2004, 2006, 2007) e produção de substâncias nematicidas (DEGENKOLB; VILCINSKAS, 2016; LI et al., 2007; SUFIATE et al., 2017). Outro fator importante seria o uso do substrato esgotado da produção de cogumelos como uma fonte mais econômica para investigar a ação nematicida.

Considerando o potencial dos cogumelos cultivados no Brasil para o controle de *Meloidogyne*, Hahn et al. (2019) realizaram testes in vitro com 24 isolados de 15 espécies de cogumelos e concluíram que isolados de *L. edodes* (LEMID-Led01 e LEMID-Led02), *M. titans* (LEMID-Mti01) e *P. eryngii* (LEMID-Per01) têm potencial para uso no manejo de *M. javanica*.

No entanto, experimentos realizados em condições *in vitro* requerem estudos complementares *in vivo* para verificar a interação planta-nematoide. Com base no exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar a utilização do substrato de cogumelo de quatro isolados das espécies selecionadas no manejo de *M. javanica* durante o crescimento da muda e na incorporação ao substrato de crescimento de tomateiros.

## 2.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.2.1 Preparação de inóculo de nematoide

As populações de nematoides utilizadas no trabalho fazem parte da coleção de nematoides do Laboratório de Epidemiologia para o Manejo Integrado de Doenças (LEMID). Os nematoides foram obtidos de tomateiros infestados com *M. javanica* identificados pelo padrão perineal (TAYLOR; SASSER, 1978) e pela técnica de eletroforese de isoenzimas (CARNEIRO; ALMEIDA, 2001; CARNEIRO; ALMEIDA; QUÉNÉHERVÉ, 2000). A população foi multiplicada em tomateiros cv. Santa Clara mantida em estufa. A suspensão de ovos de *M. javanica* utilizada nos experimentos foi obtida pela extração dos nematoides das raízes por flotação centrífuga em sacarose com caulim (COOLEN; D'HERDE, 1972). As raízes com galhas de *M. javanica* foram cortadas e trituradas em liquidificador por 20 segundos e filtradas em duas peneiras de 200 e 500 Mesh, respectivamente. A suspensão retida na peneira 500 Mesh foi centrifugada em tubos Falcon de 100 cm<sup>3</sup> contendo 1 cm<sup>3</sup> de caulim e submetida à centrifugação a 530 g por 4 minutos. O sobrenadante foi substituído por sacarose (456 g L<sup>-1</sup>), homogeneizado e submetido à flotação a 530 g por 1 minuto. Os nematoides no sobrenadante foram lavados com água corrente em peneiras de 200 e 500 mesh. Os ovos e eventuais juvenis do segundo estágio (J<sub>2</sub>) de *M. javanica* foram estimados e utilizados para infestar o solo nos experimentos.

### 2.2.2 Preparação do substrato de cogumelo

Os isolados de cogumelos utilizados neste trabalho foram previamente selecionados (HAHN et al., 2019) e armazenados no Laboratório de Epidemiologia para o Manejo Integrado de Doenças (LEMID). Os isolados foram mantidos em placas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo meio Batata, Dextrose e Agar (BDA). Os cogumelos foram cultivados em substrato composto por serragem grossa (marcenaria do setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná - UFPR), farelo de trigo (Anaconda, Curitiba), calcário agrícola (Solo Branco) e gesso (AM Gesso), em a proporção de 88: 10: 1: 1 (v v<sup>-1</sup>). O substrato foi misturado

manualmente e embalado em sacos de polipropileno com dimensões de 30 × 45 cm fechados com rolha de espuma e amarrados com elásticos de látex. Os sacos com o substrato foram autoclavados a 121 ° C por 1 hora, e posteriormente permaneceram em câmara de fluxo laminar por 12 horas para refrigeração. A infestação foi realizada pela adição de 7 g de meio de cultura BDA colonizado em placas de 90 mm com o micélio de 14 dias na parte superior da embalagem. O substrato infestado foi incubado à temperatura ambiente por 120 dias no escuro.

### 2.2.3 Produção de mudas de tomate em substrato de cogumelo

Este experimento foi realizado para avaliar o efeito do substrato cogumelo em relação aos aspectos agrônômicos do tomateiro avaliando, antes mesmo de testar o substrato de cogumelo no manejo de *M. javanica*. Para tanto, foram conduzidos quatro experimentos (um por isolado) em delineamento de blocos ao acaso com 5 tratamentos e quatro repetições. Cada experimento consistiu em isolados de *L. edodes* (LEMID-Led01 e LEMID-Led02), *M. titans* (LEMID-Mti01) e *P. eryngii* (LEMID-Per01). Os tratamentos consistiram em substratos preparados utilizando o substrato cogumelo e substrato comercial (Mecplant, Telêmaco Borba, Brasil) nas concentrações de 0, 25, 50, 75 e 100% v v<sup>-1</sup>. Cada repetição consistia em uma bandeja descartável de polietileno (Nutriplan, Cascavel, Brasil) contendo 32 células cone invertidas com dimensões de 3 cm de diâmetro e 5 cm de altura. As concentrações de substrato foram depositadas nas respectivas bandejas, irrigadas e incubadas por 7 dias. As sementes do tomate 'Santa Clara' foram semeadas e cobertas com substrato comercial, com uma semente por célula. As bandejas foram armazenadas em casa de vegetação com temperatura média de 25 ± 5 ° C e irrigação por aspersão.

Para avaliação foi quantificada a porcentagem de emergência pelo número de mudas emergidas em relação às 32 células, 10 dias após a semeadura. As plantas foram irrigadas diariamente por aspersão e sistema de fertirrigação uma vez por semana com solução de irrigação contendo 1,26 g de N; 1,08 g de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>; 3,24 g de K<sub>2</sub>O; 558 mg de S; 9 mg de Fe; 2,7 mg de Zn; 4,5 mg de Mn; 4,5 mg de B; 1,8 mg de Cu; 0,7 mg de Mo; 117 mg de Mg; 9 mg de Ni; 1,26 g de Ca e 261 mg de Mg (Plantpar, Umuarama, Brasil). Aos 43 dias após a semeadura, quatro plantas de cada repetição eram selecionadas aleatoriamente para determinar a altura das plantas e o peso da matéria seca em estufa de ar forçado a 60 ° C por 72 h. O experimento foi realizado duas vezes.

#### 2.2.4 Produção de mudas de tomate em substrato de cogumelo para o controle de *Meloidogyne javanica*

O experimento foi conduzido em delineamento de blocos casualizados com 5 tratamentos e quatro repetições para avaliar o potencial de manejo de *M. javanica* em mudas de tomate 'Santa Clara' com substrato de cogumelo. Os tratamentos corresponderam a mudas cultivadas em substratos 100% cogumelo de *L. edodes* (LEMID-Led01 e LEMID-Led02), *M. titans* (LEMID-Mti01) e *P. eryngii* (LEMID-Per01), além de uma testemunha cultivada com substrato de muda comercial (Mecplant, Telêmaco Borba, Brasil). Cada repetição consistiu em um vaso de 2 dm<sup>3</sup> contendo Latossolo (EMBRAPA, 2018) e areia na proporção de 1: 1 (v v<sup>-1</sup>), previamente autoclavado a 121 ° C por 1 hora e fertilizado (60 mg dm<sup>-3</sup> de N; 500 mg dm<sup>-3</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> e 150 mg dm<sup>-3</sup> de K<sub>2</sub>O) contendo uma planta.

As mudas produzidas com o substrato cogumelo em bandeja descartável de polietileno (Nutriplan, Cascavel, Brasil), com 128 células cônicas invertidas (3 cm de diâmetro por 5 cm de altura), 43 dias após a semeadura, foram transplantadas com o substrato para o respectivo vaso. Em seguida, foi realizada a inoculação com 2.500 ovos (População Inicial - PI) de *M. javanica* sendo depositados no solo em covas de 3 cm de profundidade e 2 cm de distância da planta. As plantas foram irrigadas diariamente por sistema de gotejamento. Trinta dias após a inoculação, as plantas foram suplementadas com 30 mg dm<sup>-3</sup> de N e 75 mg dm<sup>-3</sup> de K<sub>2</sub>O.

As plantas foram avaliadas 60 dias após a inoculação. Inicialmente, a altura da planta e o peso da matéria seca da parte aérea foram determinados em estufa de ar forçado a 60 °C por 72 h. O sistema radicular foi utilizado para a extração de nematoides pelo método de flotação centrífuga em sacarose com caulim (COOLEN; D'HERDE, 1972). Logo após a extração, as raízes foram secas e sua massa da matéria seca total determinada pela adição do peso das raízes ao peso da parte aérea. Os nematoides do solo foram extraídos por flotação centrífuga em sacarose (JENKINS, 1964). A população final (PF) foi estimada pela soma do número de nematoides presentes no sistema radicular e do número de nematoides do solo. O fator de reprodução (RF) foi calculado dividindo a PF pela PI do nematoide (OOSTENBRINK, 1966).

#### 2.2.5 Incorporação de substrato de cogumelo no solo de cultivo de tomateiros para o controle de *Meloidogyne javanica*

O potencial de controle de *M. javanica* pela incorporação de substrato de cogumelo foi avaliado através da realização de um experimento para cada um dos quatro isolados seguindo um delineamento de blocos ao acaso com cinco tratamentos e quatro repetições. Cada experimento consistiu em isolados de *L. edodes* (LEMID-Led01 e LEMID-Led02), *M. titans*

(LEMID-Mti01) e *P. eryngii* (LEMID-Per01). Os tratamentos foram cinco concentrações (0,0, 12,5, 25,0, 37,5 e 50,0% v v<sup>-1</sup>) de substrato de cogumelo. Para complementar a respectiva proporção, foi utilizada uma mistura de LATOSSOLO VERMELHO (EMBRAPA, 2018) mais areia na proporção de 1: 1 (v v<sup>-1</sup>), previamente autoclavado a 121 ° C por 1 hora. Cada repetição consistia em um vaso com uma planta.

As concentrações do substrato cogumelo foram depositadas em vasos de 2 dm<sup>3</sup>, fertilizados (60 mg dm<sup>-3</sup> de N; 500 mg dm<sup>-3</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> e 150 mg dm<sup>-3</sup> de K<sub>2</sub>O) e incubados por 7 dias. As mudas de tomate 'Santa Clara' foram produzidas em substrato comercial e transplantadas para os respectivos vasos contendo as diferentes concentrações do substrato cogumelo. A inoculação, condução e avaliação foram realizadas seguindo a metodologia do experimento descrita no item 2.2.4. O experimento foi repetido uma vez.

### 2.2.6 Análise estatística

Os dados foram submetidos à transformação Box-Cox com o pacote 'MASS' (RIPLEY et al., 2021). A normalidade foi testada pelo teste de Shapiro-Wilk e a homogeneidade da variância pelo teste de Bartlett. Foi realizada a Análise de Variância (ANOVA), com teste de agregação das médias (teste de Scott-Knott), ao nível de significância de 5%. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o pacote ExpDes.pt (FERREIRA; CAVALCANTI; NOGUEIRA, 2021) no software R (R CORE TEAM, 2021).

## 2.3 RESULTADOS

### 2.3.1 Produção de mudas de tomate em substrato de cogumelo

No primeiro experimento que avaliou as mudas produzidas em substrato de *L. edodes* (LEMID-Led01), não houve diferença na emergência de mudas e nas concentrações do substrato cogumelo utilizado (Figura 2.1 A). Porém, houve redução na altura das mudas (Figura 2.1 B) e na massa da matéria seca total das mudas (Figura 2.1 C) produzidas em concentrações ≥25% de substrato de cogumelos. Resultados semelhantes foram observados com o uso do substrato do cogumelo *P. eryngii* (LEMID-Per01) (Figura 2.1 J-L). No experimento com o substrato de *L. edodes* do isolado LEMID-Led02, não foram observadas diferenças na emergência (Figura 2.1 D) e na altura da muda (Figura 2.1 E) entre as concentrações de substrato dos cogumelos testados. No entanto, a massa da matéria seca total das mudas (Figura 2.1 F) foi reduzida em concentrações ≥25% do substrato *L. edodes* do isolado LEMID-Led02. O substrato de *M. titans* (LEMID-Mti01) reduziu a emergência de plântulas (Figura 2.1 G) de

tomate quando utilizado substrato 100% cogumelo, nas demais concentrações não houve diferença em relação à testemunha. Em relação à altura (Figura 2.1 H) e à massa seca total das mudas (Figura 2.1 I), houve redução nas concentrações  $\geq 25\%$  do substrato cogumelo.

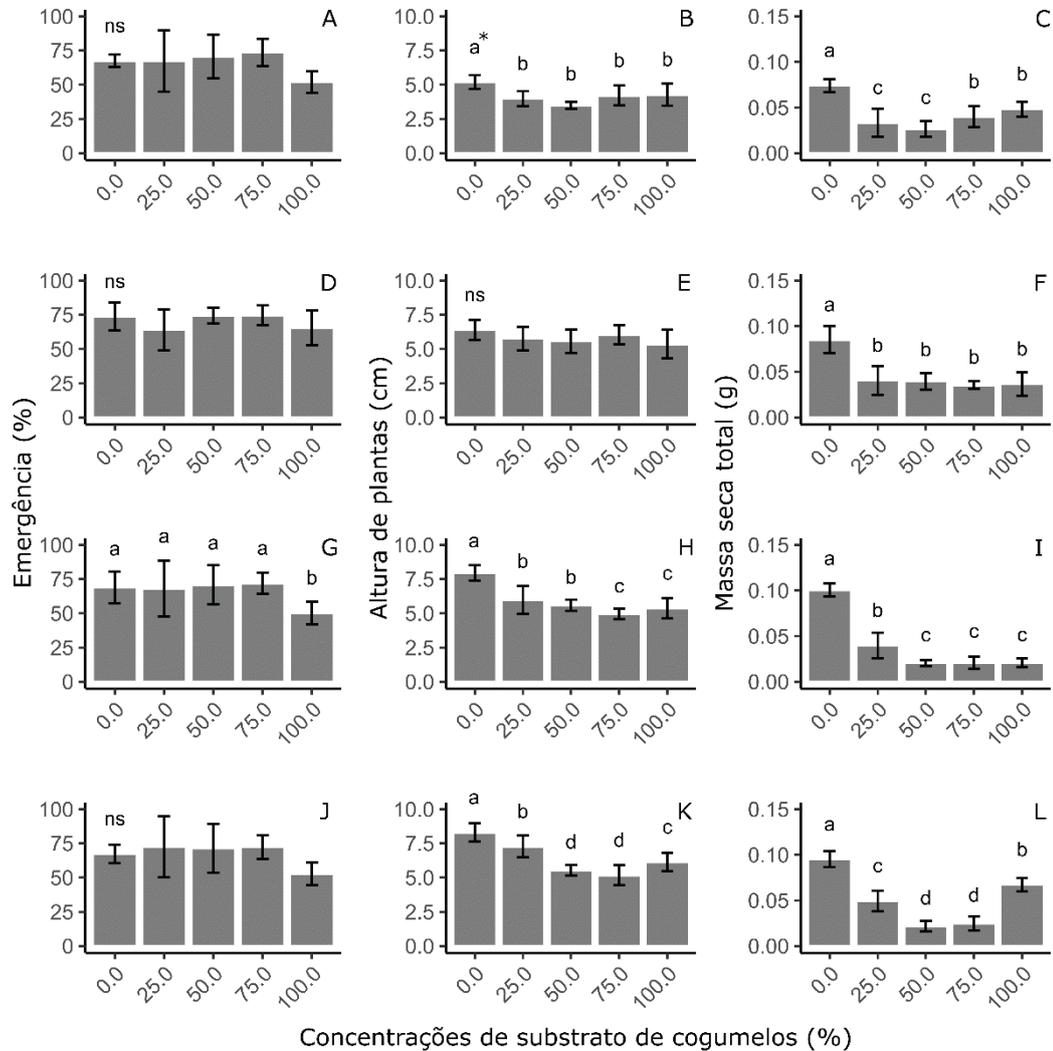


Figura 2. 1 - Efeito de substratos de cogumelos como meio de cultivo na emergência, altura e massa da matéria seca total de mudas de tomate 'Santa Clara'. Quatro experimentos independentes foram realizados com concentrações de 0,0 (controle), 25,0, 50,0, 75,0 e 100,0% de substrato de *Lentinula edodes* (LEMID-Led01 - A, B e C; LEMID-Led02 - D, E e F), *Macrocybe titans* (LEMID-Mti01 - G, H e I) e *Pleurotus eryngii* (LEMID-Per01 - J, K e L). Os dados representam a média ( $\pm$  desvio padrão,  $n = 8$ ) de dois experimentos, cada um realizado em quatro blocos. <sup>ns</sup>As médias não diferem estatisticamente pelo teste ANOVA  $P \geq 0,05$ . \* Médias seguidas por letras iguais pertencem ao mesmo agrupamento segundo o teste de Scott-Knott ( $P \leq 0,05$ ).

### 2.3.2 Produção de mudas de tomate em substrato de cogumelo para o controle de *Meloidogyne javanica*

Altura da planta, peso seco da planta e fator de reprodução do nematoide em mudas de tomate cultivadas em substratos de isolados de cogumelos na concentração de 100% infestados com *M. javanica* são mostrados na Figura 2.2. Em relação à altura das plantas, não foi observada diferença entre as médias de tratamento (Figura 2.2 A). A massa seca total das plantas (Figura 2.2 B) foi reduzida nos tratamentos com mudas produzidas nos substratos dos quatro isolados de cogumelos, sendo a maior massa observada na muda cultivada em substrato comercial (testemunha). Substrato de cogumelo a 100% não reduziu o fator de reprodução de *M. javanica* em mudas de tomate (Figura 2.1 C).

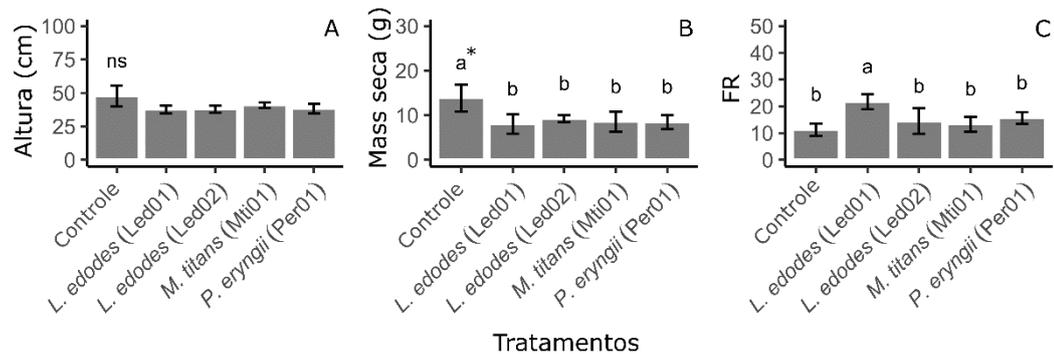


Figura 2. 2 - Efeito da utilização de 100% de substrato de cogumelo na altura da planta (A), massa seca da planta (B) e fator reprodutivo do nematoide (C) de mudas de tomate 'Santa Clara' cultivadas em substrato de cogumelo e infestadas com *M. javanica* após o transplante. Os dados representam a média ( $\pm$  desvio padrão,  $n = 4$ ), executado em quatro blocos. <sup>ns</sup>As médias não diferem estatisticamente pelo teste ANOVA  $P \geq 0,05$ . \* Médias seguidas por letras iguais pertencem ao mesmo agrupamento segundo o teste de Scott-Knott ( $P \leq 0,05$ ).

### 2.3.3 Incorporação de substrato de cogumelo no solo de cultivo de tomateiros para o controle de *Meloidogyne javanica*

Altura da planta, massa seca da planta e fator de reprodução do nematoide sob o efeito da incorporação do substrato de quatro isolados de cogumelos no solo de mudas de tomate infestadas com *M. javanica* são apresentadas na Figura 2.3. No experimento que avaliou a incorporação do substrato de *L. edodes* (LEMID-Led01) no solo, observou-se que a altura das plantas (Figura 2.3 A) e a massa seca total (Figura 2.3 B) das plantas não apresentaram diferença entre as concentrações de substrato do cogumelo utilizadas. Em relação ao fator de reprodução de *M. javanica*, houve redução nas concentrações  $\geq 25\%$  (Figura 2.3 C). No experimento com

*L. edodes* LEMID-Led02, não houve diferença na altura das plantas entre as concentrações de substrato testadas (Figura 2.3 D). Em relação à massa seca total das plantas, houve redução nas concentrações  $\geq 12,5\%$ , (Figura 2.3 E). Houve também uma redução no fator de reprodução de *M. javanica* em concentrações  $\geq 12,5\%$  (Figura 2.3 F).

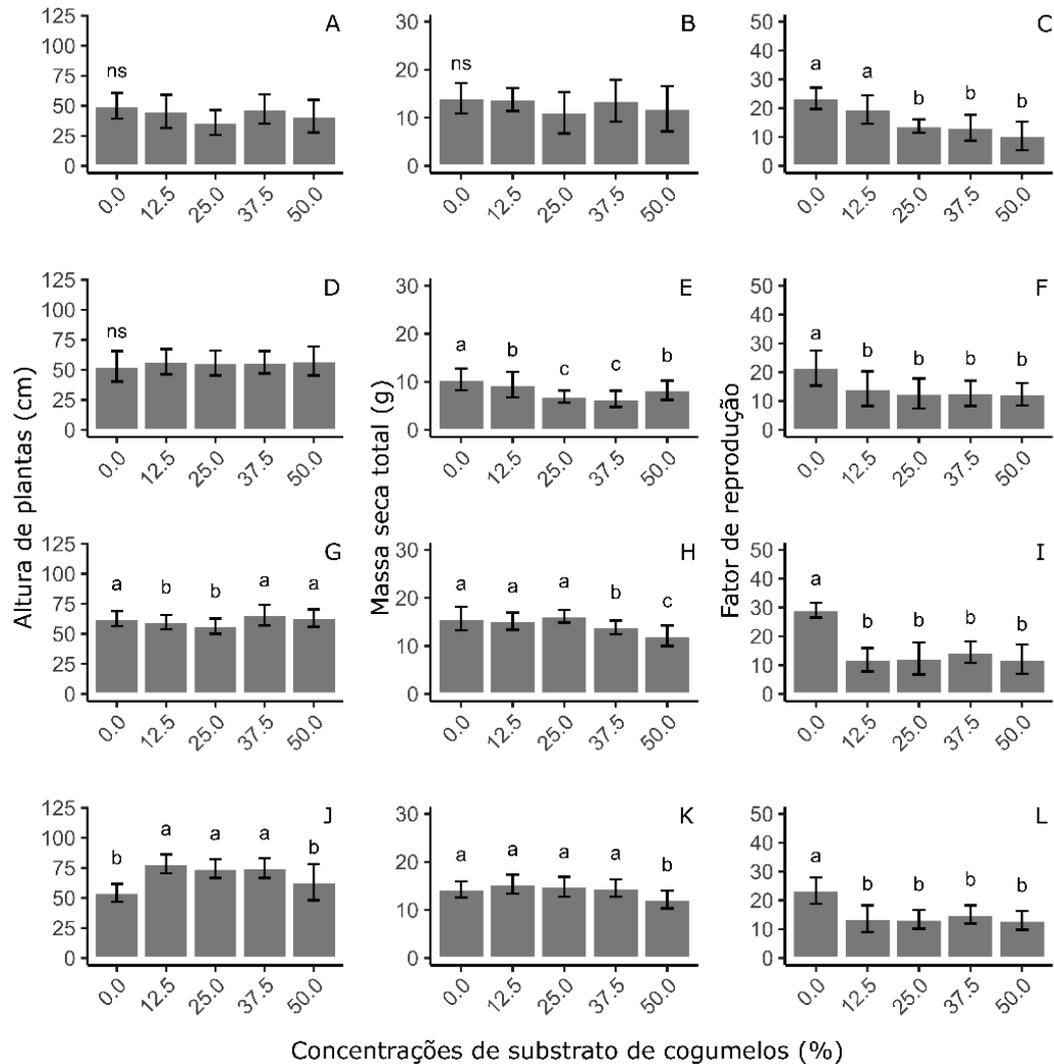


Figura 2. 3 - Efeito da incorporação de substrato de cogumelo ao solo na altura da planta, massa seca total da planta e fator de reprodução (RF) de *M. javanica* infestando tomateiro 'Santa Clara'. Quatro experimentos independentes foram realizados com concentrações de 0,0 (controle), 12,5, 25,0, 37,5 e 50,0% de substrato de *Lentinula edodes* (LEMID-Led01 - A, B e C; LEMID-Led02 - D, E e F), *Macrocybe titans* (LEMID-Mti01 - G, H e I) e *Pleurotus eryngii* (LEMID-Per01 - J, K e L). Os dados representam a média ( $\pm$  desvio padrão,  $n = 8$ ) de dois experimentos, cada um realizado em quatro blocos. <sup>ns</sup>As médias não diferem estatisticamente pelo teste ANOVA  $P \geq 0,05$ ). \*Médias seguidas por letras iguais pertencem ao mesmo agrupamento segundo o teste de Scott-Knott ( $P \leq 0,05$ ).

A incorporação do substrato de *M. titans* (LEMID-Mti01) resultou em uma pequena redução na altura do tomateiro quando incorporado ao solo nas concentrações de 12,5 e 25,0% (Figura 2.3 G). A massa seca total das plantas de tomate diminuiu com a incorporação em concentrações  $\geq 37,5\%$  (Figura 2.3 H). A incorporação de concentrações  $\geq 12,5\%$  de substrato ao solo proporcionou redução no fator de reprodução de *M. javanica* em tomateiros (Figura 2.3 I). No experimento que avaliou a incorporação do substrato de *P. eryngii* (LEMID-Per01) ao solo, observou-se que as concentrações de 12,5, 25,0 e 37,5% do substrato cogumelo resultaram em aumento no crescimento do tomateiro (Figura 2.3 J). Em relação à massa seca total, houve redução na média apenas com a incorporação de 50% do substrato (Figura 2.3 K). O fator de reprodução de *M. javanica* foi reduzido com a incorporação de concentrações  $\geq 12,5\%$  de substrato (Figura 2.3 L).

## 2.4 DISCUSSÃO

O manejo de nematoides é extremamente complexo devido às diversas interações que ocorrem no ecossistema agrícola. O controle biológico com fungos nematófagos tem sido usado para reduzir as perdas com nematoides. Neste trabalho verificamos o potencial de controle de *M. javanica* utilizando o substrato de cogumelos das espécies *L. edodes* (LEMID-Led01 e LEMID-Led02), *M. titans* (LEMID-Mti01) e *P. eryngii* (LEMID-Per01) reduzindo o fator de reprodução de *M. javanica* nas plantas de tomate. Portanto, essa estratégia de manejo de nematoides pode ser aplicada a partir de resíduos da produção agrícola, combinando a destinação desses resíduos com o manejo de nematoides e com baixo impacto ao meio ambiente e à saúde humana.

A produção de mudas de tomate cultivadas em diferentes concentrações de substratos de cogumelos apresentou redução na altura (exceto *L. edodes* LEMID-Led02) e na massa seca das mudas, mas não apresentou redução na emergência, exceto no caso de *M. titans* em a concentração de 100%. No entanto, não foi observada morte de plantas, permitindo a realização dos testes com plantas infestadas por *M. javanica*. A redução na altura e na massa seca das mudas também foi observada em outros estudos. O substrato de *P. ostreatus* utilizado para o crescimento de mudas de tomate, abobrinha e pimenta reduz a germinação, a massa fresca das mudas (MEDINA et al., 2009) e a altura das plantas (PRIADI et al., 2016). Concentrações  $\geq 50\%$  do substrato *Pleurotus sajor-caju* reduzem a altura e a massa seca das plantas de *Brassica oleracea* var. *Alboglabra* (SENDI et al., 2013). O substrato seco de *Agaricus subrufescens* reduz a altura e o peso fresco das mudas de tomate (LOPES et al., 2015b), e o substrato de *Flammulina velutipes* reduz a altura e a massa seca das mudas de melão (VAN TAM; WANG,

2015). O uso do substrato cogumelo para o crescimento de mudas de tomate não apresentou resultados satisfatórios como estratégia de manejo de nematoides, reduzindo a massa seca total das plantas e não diminuindo o fator de reprodução de *M. javanica*. No entanto, há estudos relatando o potencial dessa estratégia no manejo de outras doenças de plantas, como o tombamento causado por *Rhizoctonia solani* em mudas de tomate cultivadas em substrato de *L. edodes* e *P. eryngii* (HERAWATI; ISTIFADAH, 2019) e antracnose causada por *Colletotrichum lagenarium* em mudas de pepino cultivadas em substrato de *L. edodes* (INAGAKI; YAMAGUCHI, 2009).

Uma explicação para a interferência no crescimento das mudas em substrato de cogumelo é que possivelmente a quantidade de substrato de cogumelo presente nas mudas não foi suficiente para reduzir a população de nematoides. Portanto, optou-se por avaliar a incorporação do substrato do cogumelo ao solo de cultivo, para o qual isolados de *L. edodes* (LEMID-Led01 e LEMID-Led02), *M. titans* (LEMID-Mti01) e *P. eryngii* (LEMID -Per01) foram eficientes na redução do fator de reprodução de *M. javanica* em tomateiro. Assim, o substrato de cogumelo pode ser utilizado como medida de controle de nematoides e é uma alternativa para o descarte de substrato de cogumelo que pode ser incorporado ao solo para o manejo de nematoides de galhas.

O efeito nematocida dos extratos de *L. edodes* foi previamente estudado para *M. javanica* (HAHN et al., 2019), *Bursaphelenchus xylophilus* (DONG et al., 2006) e *Haemonchus contortus* (PINEDA-ALEGRÍA et al., 2021). Estudos sobre a interação de micélio de *L. edodes* na capacidade de predação de *M. javanica* (HAHN et al., 2019), *B. xylophilus* (ISHIZAKI; NOMURA; WATANABE, 2015; MAMIYA, 2006a; MAMIYA; HIRATSUKA; MURATA, 2005) e *Haemonchus contortus* (COMANS-PÉREZ et al., 2021) já foram realizados. Considerando que o cogumelo pode afetar diretamente os nematoides, possivelmente existe um efeito direto da aplicação do substrato do cogumelo na população de *M. javanica*, conforme observado por Hahn et al (2019) com extratos do substrato de *L. edodes*. A incorporação do substrato *L. edodes* em plantas de quiabo infestadas com *M. incognita* mostrou uma redução significativa no número de nematoides (SANTOS et al., 2018).

Anteriormente, o efeito direto do filtrado da cultura, do extrato do substrato da cultura e o potencial predatório do micélio de *M. titans* sobre *M. javanica* já haviam sido observados (HAHN et al., 2019). Porém, não houve estudo prévio sobre a incorporação do substrato de cultivo de *M. titans* para o controle de doenças de plantas, possivelmente porque o primeiro cultivo artificial desse cogumelo ocorreu apenas em 2004 (STIJVE, 2004).

A incorporação de substrato de *P. eryngii* ao solo apresentou potencial para a redução do fator de reprodução de *M. javanica*. Pelo que sabemos, não há estudos prévios da incorporação do substrato de *P. eryngii* ao solo para o controle de nematoides. Entretanto, outras espécies de cogumelos do gênero *Pleurotus* foram estudadas. Ao ser incorporada ao solo cultivado de Violeta Africana infestada por *M. javanica*, concentrações  $\geq 30\%$  de substrato de *Pleurotus ostreatus* reduziram o número de nematoides (ABBASI; TORKASHVAN; RAHANANDE, 2014). A aplicação de substrato de *P. ostreatus* reduz o número de nematoides nas raízes da soja (OKORIE; ONONUJU; OKWUJIAKO, 2011). O substrato de *P. ostreatus* na concentração de 50% quando incorporado ao solo apresentou potencial para o controle de *M. incognita* em plantas de alface (RIBAS et al., 2009). O substrato de *Pleurotus sajor-caju* quando aplicado ao solo de cultivo de tomate reduz a população de *M. incognita* e aumenta a produtividade (MOSTAFA; AWD ALLAH; AWAD-ALLAH, 2019). Mesmo não havendo estudos sobre a utilização do substrato de *P. eryngii* para o controle de nematoides, o efeito nematicida direto desse cogumelo já foi observado em diversos trabalhos. Em experimentos *in vitro*, os extratos obtidos de *P. eryngii* apresentaram efeito sobre ovos e juvenis de *M. javanica* (HAHN et al., 2019; HEYDARI; POURJAM; GOLTAPPEH, 2006; SUFIATE et al., 2017). A atividade predatória de *P. eryngii* também foi observada em *H. contortus* (COMANS-PÉREZ et al., 2021), *B. xylophilus* (MAMIYA, 2006a; MAMIYA; HIRATSUKA; MURATA, 2005) e *Ancylostoma caninum* Ercolani (LOPES et al., 2015a).

O uso do substrato do cogumelo é uma estratégia de controle biológico, em que o micélio do cogumelo pode produzir substâncias nematicidas e nematostática (HAHN et al., 2019; KWOK et al., 1992; TRUONG et al., 2007) e estruturas de predação (BARRON; THORN, 1987; LUO et al., 2004, 2006, 2007). Ao aplicar o substrato dos cogumelos no solo, ocorre a liberação desses compostos e pode afetar não só a população de nematoides, mas também as plantas. O cogumelo bioluminescente *Neonothopanus nambi* Speg. induziu resistência a *M. incognita* em tomateiros (NAMANUSART; SAKSIRIRAT; TANTHANUCH, 2016). O efeito indutor de cogumelos também é conhecido por exemplo com *Lyophyllum decastes* (PARADA et al., 2011) e *P. eryngii* (PARADA et al., 2011, 2012) no controle da antracnose (*Colletotrichum orbiculare*) em pepinos. Outro exemplo é de *L. edodes* no controle da murcha de Phytophthora (*Phytophthora capsici*) em pimenta (KANG et al., 2017), *Agaricus subrufescens* (syn. *Agaricus brasiliensis*) e *L. edodes* no controle do cancro bacteriano (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) em tomate (SILVA; PASCHOLATI; BEDENDO, 2013) e, *L. edodes* e *Agaricus blazei* no controle da murcha bacteriana (*Ralstonia solanacearum*) em tomate (SILVA; PASCHOLATI; BEDENDO, 2007).

O substrato do cogumelo também pode ser incluído no controle cultural de doenças de plantas devido à adição de matéria orgânica (BEDENDO; MASSOLA JÚNIOR; AMORIM, 2018), sendo uma das estratégias de manejo ecológico do nematoide (BRIDGE, 1996). A adição de matéria orgânica pode influenciar na disponibilidade de nutrientes, pH, porosidade que consequentemente afeta a capacidade hídrica do solo, além da atividade e biodiversidade da microbiota do solo. Como exemplo dessas alterações causadas pelo substrato do cogumelo no solo, a incorporação do substrato de *L. edodes* e *A. subrufescens* aumentou significativamente a respiração do solo de cultivo de alface (RIBAS et al., 2009). Além disso, substratos com alta relação C / N, como substratos de cogumelos não compostado, imobilizam o nitrogênio do solo na biomassa microbiana, evitando a absorção pelas plantas (KANAMORI; YASUDA, 1979). A importância da relação C / N fica evidente no estudo de Ribas et al (2009), onde a alta relação C / N do substrato de *L. edodes* (86/1) inibe o desenvolvimento das plantas de alface, enquanto a relação C / N do substrato de *A. subrufescens* (15/1) favorece o desenvolvimento de plantas de alface.

A incorporação do substrato dos cogumelos *L. edodes*, *M. titans* e *P. eryngii* ao solo torna esta técnica uma ferramenta útil a ser incorporada no manejo integrado de *M. javanica* em tomateiro. Como o substrato do cogumelo incorporado ao solo reduziu até 9,9% (*M. titans*) da altura e até 38,6% (*L. edodes* - LEMID-Led02 incorporado) da massa seca do tomateiro, novos estudos precisam ser realizados verificar a necessidade de fertilização complementar e o efeito na produtividade das plantas, além de avaliar o potencial de indução de resistência por cogumelos em tomateiro infectado por nematoides e outros patógenos.

## 2.5 DECLARAÇÃO DE CONTRIBUIÇÃO DE AUTORIA

**Marlon Henrique Hahn:** Conceitualização, Metodologia, Análise formal, Curadoria de dados, Redação - rascunho original, Visualização, Investigação. **Danielle Dutra Martinha:** Visualização, Investigação. **Sérgio Miguel Mazaro:** Conceituação, Recursos, Redação - revisão e edição. **Louise Larissa May De Mio:** Conceituação, Recursos, Aquisição de financiamento, Redação - revisão e edição. **Henrique da Silva Silveira Duarte:** Conceituação, Recursos, Supervisão, Administração de projetos, Visualização, Aquisição de financiamento, Redação - revisão e edição.

## 2.6 AGRADECIMENTOS

Este estudo foi parcialmente financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código Financeiro 001. Os autores LLMDM e HSSD

agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) / Brasil por sua bolsa de pesquisa.

## 2.7 REFERÊNCIAS

- ABBASI, N.; TORKASHVAN, A. M.; RAHANANDE, H. Evaluation of mushroom compost for the bio control root-knot nematode. **International Journal of Biosciences**, v. 5, n. 8, p. 147–153, 2014.
- BARRON, G. L.; THORN, R. G. Destruction of nematode by species of *Pleurotus*. **Canadian Journal of Botany**, v. 65, n. 4, p. 774–778, 1987.
- BEDENDO, I. P.; MASSOLA JÚNIOR, N. S.; AMORIM, L. Controles cultural e físico de doenças de plantas. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. (Eds.). **Manual de Fitopatologia: Princípios e conceitos**. 5. ed. Piracicaba: Ceres, 2018. p. 275–287.
- BELAN, L. L.; FONSECA, S. O.; ALVES, F. R.; JÚNIOR, W. C. D. J.; MATTA, F. D. P.; CABRAL, P. D. S.; RABELLO, L. K. C.; RODRIGUES, A. A. Screening of cherry tomato genotypes for resistance to *Meloidogyne incognita* and *M. javanica*. **Nematologia Brasileira**, v. 33, n. 3, p. 96–99, 2009.
- BRIDGE, J. Nematode management in sustainable and subsistence agriculture. **Annual review of phytopathology**, v. 34, n. 94, p. 201–225, 1996.
- CARNEIRO, R. M. D. G.; ALMEIDA, M. R. A. Técnica de eletroforese usada no estudo de enzimas de nematóides de galhas para identificação de espécies. **Nematologia Brasileira**, v. 25, n. 1, p. 35–44, 2001.
- CARNEIRO, R. M. D. G.; ALMEIDA, M. R. A.; QUÉNÉHERVÉ, P. Enzyme phenotypes of *Meloidogyne* spp. populations. **Nematology**, v. 2, n. 6, p. 645–654, 2000.
- COMANS-PÉREZ, R. J.; SÁNCHEZ, J. E.; AL-ANI, L. K. T.; GONZÁLEZ-CORTÁZAR, M.; CASTAÑEDA-RAMÍREZ, G. S.; MENDOZA-DE GIVES, P.; SÁNCHEZ-GARCÍA, A. D.; MILLÁN-OROZCO, J.; AGUILAR-MARCELINO, L. Biological control of sheep nematode *Haemonchus contortus* using edible mushrooms. **Biological Control**, v. 152, p. 104420, 2021.
- COOLEN, W. A.; D’HERDE, C. J. **A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue**. Ghent: State Agriculture Research Centre, 1972.
- DEGENKOLB, T.; VILCINSKAS, A. Metabolites from nematophagous fungi and nematicidal natural products from fungi as alternatives for biological control. Part II: metabolites from nematophagous basidiomycetes and non-nematophagous fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 9, p. 3813–3824, 2016.
- DONG, J. Y.; LI, X. P.; LI, L.; LI, G. H.; LIU, Y. J.; ZHANG, K. Q. Preliminary results on nematicidal activity from culture filtrates of basidiomycetes against the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* (Aphelenchoididae). **Annals of Microbiology**, v. 56, n. 2, p. 163–166, 2006.

- EMBRAPA. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. 5. ed. Brasília: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2018.
- FAO. **Crops**. 2021. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>>. Acesso em: 9 fev. 2021.
- FERREIRA, E. B.; CAVALCANTI, P. P.; NOGUEIRA, D. A. **ExpDes.pt: Pacote Experimental Designs (português)**. 2021. Disponível em: <<https://cran.r-project.org/web/packages/ExpDes.pt/ExpDes.pt.pdf>>. Acesso em: 7 jan. 2021.
- HAHN, M. H.; DUARTE, H. da S. S.; MAY DE MIO, L. L.; KUHN, O. J. Levantamento bibliométrico de fungos nematófagos no controle dos nematoides das galhas. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 17, n. 4, p. 389–397, 2018.
- HAHN, M. H.; MAY DE MIO, L. L.; KUHN, O. J.; DUARTE, H. da S. S. Nematophagous mushrooms can be an alternative to control *Meloidogyne javanica*. **Biological Control**, p. 104024, 2019.
- HERAWATI, L.; ISTIFADAH, N. The potential of spent substrate of oyster (*Pleurotus ostreatus*) dan Shiitake (*Lentinula edodes*) mushrooms to control damping-off disease (*Rhizoctonia solani*) in Tomato. **Cropsaver**, v. 1, n. 2, p. 93, 2019.
- HEYDARI, R.; POURJAM, E.; GOLTAPPEH, E. M. Antagonistic effect of some species of *Pleurotus* on the root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* *in vitro*. **Plant Pathology Journal**, v. 5, n. 2, p. 173–177, 2006.
- INAGAKI, H.; YAMAGUCHI, A. Spent substrate of shiitake (*Lentinula edodes*) inhibits symptoms of anthracnose in cucumber. **Mushroom Science and Biotechnology**, v. 17, n. 3, p. 113–115, 2009.
- ISHIZAKI, T.; NOMURA, N.; WATANABE, K. Screening of mushrooms for nematophagous activity against the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. **Nematological Research**, v. 45, n. 1, p. 19–25, 2015.
- JENKINS, W. R. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. **Plant Disease Reporter**, v. 48, n. 9, p. 692, 1964.
- KANAMORI, T.; YASUDA, T. Immobilization, mineralization and the availability of the fertilizer nitrogen during the decomposition of the organic matters applied to the soil. *Plant and Soil*, [s. l.], v. 52, n. 2, p. 219–227, 1979.
- KANG, D.-S.; MIN, K.-J.; KWAK, A.-M.; LEE, S.-Y.; KANG, H.-W. Defense response and suppression of *Phytophthora* blight disease of pepper by water extract from spent mushroom substrate of *Lentinula edodes*. **The Plant Pathology Journal**, v. 33, n. 3, p. 264–275, 2017.
- KWOK, O. C. H.; PLATTNER, R.; WEISLEDER, D.; WICKLOW, D. T. A nematocidal toxin from *Pleurotus ostreatus* NRRL 3526. **Journal of Chemical Ecology**, v. 18, n. 2, p. 127–136, 1992.
- LI, G.; ZHANG, K.; XU, J.; DONG, J.; LIU, Y. Nematicidal substances from fungi. **Recent Patents on Biotechnology**, v. 1, n. 3, p. 212–233, 2007.

- LIU, X.; XIANG, M.; CHE, Y. The living strategy of nematophagous fungi. **Mycoscience**, v. 50, n. 1, p. 20–25, 2009.
- LOPES, A. del C. G.; HIURA, E.; SOARES, F. E. de F.; FONSECA, L. A. Da; SENA, C. C.; FERRAZ, C. M.; LACERDA, T.; SENNA, T.; AGUIAR, A. R.; ARAÚJO, A. L.; ARAÚJO, J. V. De; BRAGA, F. R. Predatory activity of the fungus *Pleurotus eryngii* on *Ancylostoma caninum* infective larvae. **SOJ Veterinary Sciences**, v. 1, n. 1, p. 104–130, 2015. a.
- LOPES, R. X.; ZIED, D. C.; MARTOS, E. T.; DE SOUZA, R. J.; DA SILVA, R.; DIAS, E. S. Application of spent *Agaricus subrufescens* compost in integrated production of seedlings and plants of tomato. **International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture**, v. 4, n. 3, p. 211–218, 2015. b.
- LUO, H.; LI, X.; LI, G.; PAN, Y.; ZHANG, K. Acanthocytes of *Stropharia rugosoannulata* function as a nematode-attacking device. *Applied and Environmental Microbiology*, [s. l.], v. 72, n. 4, p. 2982–2987, 2006.
- LUO, H.; LIU, Y.; FANG, L.; LI, X.; TANG, N.; ZHANG, K. *Coprinus comatus* damages nematode cuticles mechanically with spiny balls and produces potent toxins to immobilize nematodes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 12, p. 3916–3923, 2007.
- LUO, H.; MO, M.; HUANG, X.; LI, X.; ZHANG, K. *Coprinus comatus*: A basidiomycete fungus forms novel spiny structures and infects nematode. **Mycologia**, v. 96, n. 6, p. 1218–1224, 2004.
- MAMIYA, Y. Attraction of the pinewood nematode to mycelium of some wood-decay fungi. **Nematological Research (Japanese Journal of Nematology)**, v. 36, n. 1, p. 1–9, 2006.
- MAMIYA, Y.; HIRATSUKA, M.; MURATA, M. Ability of wood-decay fungi to prey on the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner and Buhner) Nickle. **Nematological Research (Japanese Journal of Nematology)**, v. 35, n. 1, p. 21–30, 2005.
- MAPA. **Agrofit - Sistema de agrotóxicos fitossanitários**. 2021. Disponível em: <[http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Acesso em: 28 fev. 2021.
- MEDINA, E.; PAREDES, C.; PÉREZ-MURCIA, M. D.; BUSTAMANTE, M. A.; MORAL, R. Spent mushroom substrates as component of growing media for germination and growth of horticultural plants. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 18, p. 4227–4232, 2009.
- MOSTAFA, D. M.; AWD ALLAH, S. F. A.; AWAD-ALLAH, E. F. A. Potential of *Pleurotus sajor-caju* compost for controlling *Meloidogyne incognita* and improve nutritional status of tomato plants. **Journal of Plant Science and Phytopathology**, v. 3, n. 3, p. 118–127, 2019.
- NAMANUSART, W.; SAKSIRIRAT, W.; TANTHANUCH, W. FTIR Spectroscopic Analysis of Luminescent Mushroom (*Neonothopanus nambi* Speg.) induced disease resistance

- against tomato Root-Knot nematode, *Meloidogyne incognita* Chitwood. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, v. 10, n. 2, p. 923–935, 2016.
- OKORIE, C. C.; ONONUJU, C. C.; OKWUJIAKO, I. A. Management of *Meloidogyne incognita* with *Pleurotus ostreatus* and *P. tuberregium* in Soybean. **International Journal of Agriculture & Biology**, v. 13, n. 3, p. 401–405, 2011.
- OOSTENBRINK, M. Major characteristics of the relation between nematodes and plants. **Mededelingen Landbouw**, v. 66, n. 4, p. 1–46, 1966.
- PARADA, R. Y.; MURAKAMI, S.; SHIMOMURA, N.; EGUSA, M.; OTANI, H. Autoclaved spent substrate of hatakesimeji mushroom (*Lyophyllum decastes* Sing.) and its water extract protect cucumber from anthracnose. **Crop Protection**, v. 30, n. 4, p. 443–450, 2011.
- PARADA, R. Y.; MURAKAMI, S.; SHIMOMURA, N.; OTANI, H. Suppression of fungal and bacterial diseases of cucumber plants by using the spent mushroom substrate of *Lyophyllum decastes* and *Pleurotus eryngii*. **Journal of Phytopathology**, v. 160, p. 390–396, 2012.
- PHILBRICK, A. N.; ADHIKARI, T. B.; LOUWS, F. J.; GORNY, A. M. *Meloidogyne enterolobii*, a Major Threat to Tomato Production: Current Status and Future Prospects for Its Management. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, 2020.
- PINEDA-ALEGRÍA, J. A.; SÁNCHEZ, J. E.; VENTURA-ZAPATA, E.; GONZÁLEZ-CORTAZAR, M.; AGUILAR-MARCELINO, L. Nematicidal effect of Shiitake (*Lentinula edodes*) extracts against *Haemonchus contortus*. **Journal of Medicinal Food**, v. 11, p. jmf.2020.0168, 2021.
- PRIADI, D.; ARFANI, A.; SASKIAWAN, I.; MULYANINGSIH, E. S. Use of grass and spent mushroom compost as a growing medium of local tomato (*Lycopersicon esculentum* Miller) seedling in the nursery. **AGRIVITA Journal of Agricultural Science**, v. 38, n. 3, p. 243–250, 2016.
- R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing, R Foundation for Statistical Computing**, 2021. Disponível em: <<https://cran.r-project.org/>>
- RIBAS, L. C. C.; DE MENDONÇA, M. M.; CAMELINI, C. M.; SOARES, C. H. L. Use of spent mushroom substrates from *Agaricus subrufescens* (syn. *A. blazei*, *A. brasiliensis*) and *Lentinula edodes* productions in the enrichment of a soil-based potting media for lettuce (*Lactuca sativa*) cultivation: Growth promotion and soil bioremediati. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 20, p. 4750–4757, 2009.
- RIPLEY, B.; VENABLES, B.; BATES, D. M.; HORNIK, K.; GEBHARDT, A.; FIRTH, D. **Package ‘MASS’**. 2021. Disponível em: <<https://cran.r-project.org/web/packages/MASS/MASS.pdf>>. Acesso em: 28 mar. 2021.
- SANTOS, J. F. S.; TEIXEIRA, J. L.; SANTOS, J. S.; MENDONÇA, J. D. J.; SANTOS, T. A. de C.; GÓIS, L. D. S.; LOPES, L. J. de O.; SOUZA, A. L. De; MARINO, R. H. Interação microbiana e fertilizante Protector® NM no controle de *Meloidogyne incognita*. **Scientia Plena**, v. 14, n. 10, 2018.

- SEID, A.; FININSA, C.; MEKETE, T.; DECRAEMER, W.; WESEMAEL, W. M. L. Tomato (*Solanum lycopersicum*) and root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.)-a century-old battle. **Nematology**, v. 17, n. 9, p. 995–1009, 2015.
- SENDI, H.; MOHAMED, M. T. M.; ANWAR, M. P.; SAUD, H. M. Spent mushroom waste as a media replacement for peat moss in Kai-Lan (*Brassica oleracea* var. *Alboglabra*) production. **The Scientific World Journal**, v. 2013, p. 1–8, 2013.
- SILVA, R. F.; PASCHOLATI, S. F.; BEDENDO, I. P. Indução de resistência em tomateiro por extratos aquosos de *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* contra *Ralstonia solanacearum*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, n. 3, p. 189–196, 2007.
- SILVA, R. F.; PASCHOLATI, S. F.; BEDENDO, I. P. Induced resistance in tomato plants to *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis* by *Lentinula edodes* and *Agaricus subrufescens* (syn. *Agaricus brasiliensis*). **Journal of Plant Pathology**, v. 95, n. 2, p. 285–297, 2013.
- SINGH, V. K.; SINGH, A. K.; KUMAR, A. Disease management of tomato through PGPB: current trends and future perspective. **3 Biotech**, v. 7, n. 4, p. 255, 2017.
- STIJVE, T. De tropische reuzenpaddestoel *Macrocybe titans* is eetbaar en kan worden gekweekt. **AMK Mededelingen**, v. 3, p. 93–94, 2004.
- SUFIAATE, B. L.; SOARES, F. E. de F.; MOREIRA, S. S.; GOUVEIA, A. de S.; MONTEIRO, T. S. A.; FREITAS, L. G. De; QUEIROZ, J. H. De. Nematicidal action of *Pleurotus eryngii* metabolites. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 12, n. November, p. 216–219, 2017.
- TAYLOR, A.; SASSER, J. **Biology, Identification and Control of Root-knot Nematodes (*Meloidogyne* species)** Raleigh. 1. ed. Raleigh: Department of Plant Pathology, North Carolina State University, United States Agency for International Development, 1978.
- TRUONG, B. N.; OKAZAKI, K.; FUKIHARU, T.; TAKEUCHI, Y.; FUTAI, K.; LE, X. T.; SUZUKI, A. Characterization of the nematocidal toxocyst in *Pleurotus* subgen. *Coremiopleurotus*. **Mycoscience**, v. 48, n. 4, p. 222–230, 2007.
- VAN TAM, N.; WANG, C.-H. Use of spent mushroom substrate and manure compost for honeydew melon seedlings. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 34, n. 2, p. 417–424, 2015.

### 3 CAPÍTULO II – ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS EM TOMATEIROS CAUSADAS POR SUBSTRATOS DE COGUMELOS CONTRA NEMATOIDES DAS GALHAS

Marlon Henrique Hahn<sup>1</sup>; Mayara Catherine Candido Silva<sup>1</sup>; Danielle Dutra Martinha<sup>1</sup>; Louise Larissa May De Mio<sup>1</sup>; Sérgio Miguel Mazaro<sup>2</sup>; Henrique da Silva Silveira Duarte<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Fitotecnia e Fitossanidade, Universidade Federal do Paraná, Curitiba- PR, Brasil. E-mail: [marlonhhahn@gmail.com](mailto:marlonhhahn@gmail.com); [danielledmartinha@gmail.com](mailto:danielledmartinha@gmail.com) e [maydemio@ufpr.br](mailto:maydemio@ufpr.br)

<sup>2</sup>Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR Dois Vizinhos, PR, Brasil. E-mail: [sergio@utfpr.edu.br](mailto:sergio@utfpr.edu.br)

\* Autor para correspondência. H. S. S. Duarte, e-mail: [henriqueduarte@ufpr.br](mailto:henriqueduarte@ufpr.br)

#### RESUMO

Os tomateiros são severamente afetados pelo nematoide das galhas (*Meloidogyne javanica*). O controle biológico de *M. javanica* com fungos nematófagos é preferível em relação ao controle químico por ser menos agressivo à saúde e ao meio ambiente. Dentre os fungos nematófagos, os cogumelos apresentam efeito sobre os nematoides reduzindo a eclosão, causando a mortalidade de juvenis e reduzindo o fator de reprodução. Entretanto, pouco se conhece sobre os mecanismos de controle envolvidos na interação planta-nematoide. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi identificar os mecanismos bioquímicos envolvidos no controle da doença pela indução de resistência de plantas de tomateiros tratados com: i) solo e areia (1:1 v v<sup>-1</sup>) infestado com *M. javanica*; ii) solo, areia e substrato de *Lentinula edodes* (1:1:2 v v<sup>-1</sup>); iii) solo, areia e substrato de *L. edodes* (1:1:2 v v<sup>-1</sup>) infestado com *M. javanica*; iv) solo, areia e substrato de *Pleurotus eryngii* (1:1:2 v v<sup>-1</sup>) e v) solo, areia e substrato de *P. eryngii* (1:1:2 v v<sup>-1</sup>) infestado com *M. javanica* em 4 períodos de avaliação (0, 4, 10 e 20 dias). A área abaixo das curvas de altura das plantas, massa fresca da parte aérea e massa fresca total das plantas de tomateiros foram semelhantes entre os tratamentos no período avaliado. Não houve diferenças na atividade da enzima fenilalanina amônia-liase e alteração dos compostos fenólicos, envolvidos na rota dos fenilpropanoides. Entretanto, as análises bioquímicas demonstraram ocorrer indução de resistência nas plantas de tomateiro pelos substratos de cogumelos independente da inoculação do nematoide, ativando as enzimas relacionadas a defesa vegetal  $\beta$ -1,3-glucanase e quitinase, sendo a rota preferencial de defesa.

**Palavras-chave:** Indução de resistência; Quitinase;  $\beta$ -1,3-glucanase; nematoides das galhas

## ABSTRACT

Tomato plants are severely affected by the root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*). Biological control of *M. javanica* with nematophagous fungi is preferable over chemical control as it is less damaging to health and the environment. Among nematophagous fungi, mushrooms have a direct effect on nematodes, reducing hatching, causing juvenile mortality, and reducing the reproduction factor. However, little is known about the control mechanisms involved in the plant-nematoid interaction. Therefore, the objective of this work was to identify the biochemical mechanisms involved in disease control by inducing resistance in tomato plants treated with: i) soil and sand (1:1 v v<sup>-1</sup>) infested with *M. javanica*; ii) soil, sand and substrate of *Lentinula edodes* (1:1:2 v v<sup>-1</sup>); iii) soil, sand and substrate of *L. edodes* (1:1:2 v v<sup>-1</sup>) infested with *M. javanica*; iv) soil, sand and substrate of *Pleurotus eryngii* (1:1:2 v v<sup>-1</sup>) and v) soil, sand and substrate of *P. eryngii* (1:1:2 v v<sup>-1</sup>) infested with *M. javanica* at 4 evaluation times (0, 4, 10 and 20 days). The area under the curves of plant height, aerial part fresh mass and total fresh mass of tomato plants were similar between treatments in the period evaluated. There were no differences in the activity of the phenylalanine ammonia-lyase enzyme and alteration of the phenolic compounds involved in the phenylpropanoid pathway. However, biochemical analyzes showed that there was resistance induction in tomato plants by the mushroom substrates, activating enzymes related to plant defense  $\beta$ -1,3-glucanase and chitinase, being the preferred defense pathway.

**Keywords:** Resistance induction; Chitinase;  $\beta$ -1,3-glucanase; root-knot nematodes

### 3.1 INTRODUÇÃO

A cultura do tomate (*Solanum lycopersicum* L.) é comum em áreas tropicais e subtropicais. Em 2019, foram cultivados no mundo 5 milhões de ha com a cultura, produzindo 180.7 milhões de toneladas da fruta (FAO, 2021). Entretanto, um dos fatores que prejudicam a produção dos tomates são as doenças, das quais são destacadas as doenças causadas pelos nematoides. O gênero de nematoides de maior importância para o tomateiro é o *Meloidogyne* Goeldi (SEID et al., 2015). No Brasil, às espécies *M. javanica* (Treub) Chitwood e *M. incognita* (Kofoid e White) Chitwood são frequentemente associadas à redução de produtividade em tomateiros (BELAN et al., 2009).

O manejo de nematoides é importante para redução das perdas na produção de tomate. Entretanto, o manejo é complexo pois demanda da integração de medidas de controle a fim de reduzir os nematoides de forma sustentável (BARKER; KOENNING, 1998; BRIDGE, 1996).

Dentre as medidas disponíveis, o controle biológico com os fungos nematófagos vem ganhando destaque, pois são capazes de produzir estruturas de predação e parasitismo ou substâncias nematicidas (BARRON; THORN, 1987; CASTAÑEDA-RAMÍREZ et al., 2020; DEGENKOLB; VILCINSKAS, 2016; LI et al., 2007; LUO et al., 2004, 2006, 2007; SOARES; SUFIATE; DE QUEIROZ, 2018; SUFIATE et al., 2017). Já foram relatadas 185 espécies de fungos nematófagos com potencial para o manejo de *Meloidogyne* spp. (HAHN et al., 2018). Entretanto, dentre essas espécies com potencial nematicida, os cogumelos atraem a atenção por possuir diversas propriedades medicinais, incluindo antitumoral, antimutagênico, antidiabético, antiinflamatória, antibacteriano, antifúngico, antiviral e antitrombótico (CASTAÑEDA-RAMÍREZ et al., 2020). Esse conjunto de propriedades estimulou a pesquisa sobre seu potencial nematicida.

Considerando o potencial dos cogumelos cultivados no Brasil para o controle de *Meloidogyne*, Hahn et al. (2019) realizaram testes *in vitro* com resultados que indicaram potencial nematicida dos isolados de *Lentinula edodes* (LEMID-Led01) e *Pleurotus eryngii* (LEMID-Per01) para o controle de *M. javanica*. Esses resultados indicavam o efeito direto dos cogumelos sobre os nematoides pela produção de toxinas nematicidas ou atividade predatória das hifas dos cogumelos. Esse efeito direto de *L. edodes* e *P. eryngii* também foi observado por outros autores contra os nematoides *M. javanica* (HEYDARI; POURJAM; GOLTAPPEH, 2006; SUFIATE et al., 2017) e *Bursaphelenchus xylophilus* (DONG et al., 2006; ISHIZAKI; NOMURA; WATANABE, 2015; MAMIYA, 2006a, 2006b).

A eficácia dos cogumelos no controle do nematoide das galhas constatado *in vitro* também foi confirmado em condições *in vivo*. A incorporação do substrato de *L. edodes* e *P. eryngii* ao solo infestado reduziu o fator de reprodução de *M. javanica* em plantas de tomateiro ‘Santa Clara’ (Capítulo I). No entanto, não temos informações se a eficácia é apenas do efeito direto ou se ocorre também o efeito indireto por meio da indução de resistência das plantas aos nematoides.

A indução de resistência pode ser utilizada como uma medida de controle com potencial de reduzir a severidade das doenças de plantas (DEBONA et al., 2009). O potencial de indução de resistência dos cogumelos já foi estudado para doenças bacterianas (KWAK et al., 2015; SILVA; PASCHOLATI; BEDENDO, 2013) e fúngicas (PARADA et al., 2011, 2012). Considerando o potencial de cogumelos em causar alterações bioquímicas nas plantas de tomateiro, o objetivo deste estudo é investigar os possíveis mecanismos de resistência induzidos por *L. edodes* e *P. eryngii* contra *M. javanica* em plantas de tomateiros.

## 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.2.1 Inóculo de *Meloidogyne javanica* e preparo dos substratos de cogumelo

A população de *M. javanica* foi obtida originalmente de raízes de tomate. A identificação das espécies seguiu a metodologia do padrão perineal de fêmeas adultas (TAYLOR; SASSER, 1978) e pela técnica de eletroforese de isoenzimas (CARNEIRO; ALMEIDA, 2001; CARNEIRO; ALMEIDA; QUÉNÉHERVÉ, 2000). A multiplicação da população foi realizada em tomateiros cultivar 'Santa Clara' em casa de vegetação. Os nematoides foram extraídos das raízes de tomateiros (COOLEN; D'HERDE, 1972) e a suspensão de ovos foi coletada com uma peneira de 200 Mesh sobre uma de 500 Mesh (HAHN et al., 2019).

Dois isolados de cogumelos comerciais das espécies *L. edodes* (LEMID-Led01) e *P. eryngii* (LEMID-Per01) foram previamente selecionados devido seu potencial de controle de *M. javanica* (HAHN et al., 2019). O substrato para o cultivo dos cogumelos foi composto por serragem grossa (marcenaria do setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná - UFPR), farelo de trigo (Anaconda, Curitiba), calcário agrícola (Solo Branco) e gesso (AM Gesso), em a proporção de 88: 10: 1: 1 (v v<sup>-1</sup>). O substrato foi misturado manualmente e embalado em sacos de polipropileno com dimensões de 30 × 45 cm fechados com rolha de espuma e amarrados com elásticos de látex. O substrato embalado foi autoclavado a 121 °C por 1 hora e esfriado em câmara de fluxo laminar por 12 horas. A infestação foi realizada pela adição de 7 g de meio de cultura batata, dextrose e ágar colonizado em placas de 90 mm com o micélio de 14 dias na depositado na parte superior da bolsa. O substrato infestado foi incubado à temperatura ambiente por 120 dias no escuro. O solo e areia utilizados em combinação com os substratos de cogumelo foram autoclavados previamente a 121° C por 1 h. O solo utilizado correspondia ao horizonte B latossólico de um latossolo vermelho (EMBRAPA, 2018).

### 3.2.2 Tratamentos e delineamento experimental

A indução de resistência promovida pelos substratos de cogumelos foi avaliada em um experimento fatorial 5 x 4, em delineamento inteiramente ao acaso com 3 repetições. Os tratamentos corresponderam às condições de cultivo das mudas de tomateiro, 1) solo e areia (1:1 v v<sup>-1</sup>) infestado com *M. javanica*; 2) solo, areia e substrato de *L. edodes* (1:1:2 v v<sup>-1</sup>); 3) solo, areia e substrato de *L. edodes* (1:1:2 v v<sup>-1</sup>) infestado com *M. javanica*; 4) solo, areia e substrato de *P. eryngii* (1:1:2 v v<sup>-1</sup>) e 5) solo, areia e substrato de *P. eryngii* (1:1:2 v v<sup>-1</sup>) infestado com *M. javanica* e os 4 períodos de avaliação (0, 4, 10 e 20 dias). Cada repetição

consistiu em um copo de poliestireno contendo os substratos de cada tratamento com uma planta de tomateiro. O experimento foi repetido uma vez.

Para a produção das mudas de tomateiro, sementes do cultivar Santa Clara foram semeadas em bandejas de poliestireno com 128 células contendo substrato comercial (Mecplant, Telêmaco Borba, Brazil) e vermiculita na proporção de 1:1 (v v<sup>-1</sup>). As bandejas foram mantidas em casa de vegetação (UR > 60% e temperatura de 14 a 32° C) recebendo irrigação por aspersão sempre que necessário. A cada 5 dias, as mudas foram irrigadas com solução nutritiva hidropônica contendo 1.26 g de N; 1.08 g de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>; 3.24 g de K<sub>2</sub>O; 558 mg de S; 9 mg de Fe; 2.7 mg de Zn; 4.5 mg de Mn; 4.5 mg de B; 1.8 mg de Cu; 0.7 mg de Mo; 117 mg de Mg; 9 mg de Ni; 1.26 g de Ca e 261 mg de Mg (Plantpar, Umuarama, Brazil).

Os copos de poliestireno de 180 mL de capacidade com um furo no fundo com seus respectivos tratamentos sem a inoculação dos nematoides foram preparados quando as mudas tinham 30 dias após a emergência. Os copos contendo os tratamentos foram incubados por 15 dias em câmara de crescimento a 25° C, com fotoperíodo de 12 h e umidade relativa superior a 70%. O substrato foi irrigado a cada 2 dias. Aos 45 dias após a emergência das mudas, um orifício de 4 cm de profundidade foi aberto com o auxílio de um tubo Falcon de 50 mL e uma muda de tomateiro foi colocada em cada copo de poliestireno. As mudas correspondentes ao período 0 de avaliação foram coletadas e armazenadas à -20° C. Logo após o transplante da muda de tomateiro, um orifício de 2 cm de profundidade foi aberto com o auxílio de um tubo Microtubo cônico de 2 mL próximo do colo das plantas dos tratamentos que continham a inoculação de *M. javanica*. Nesse orifício foi depositado 500 µL de suspensão contendo 1000 ovos e eventuais juvenis. As plantas foram mantidas no interior de câmara de crescimento a 25 °C, com fotoperíodo de 12 h e umidade relativa aproximada de 70%. Durante o experimento, as plantas foram regadas sempre que necessário com a solução de hidropônica com metade da concentração.

### 3.2.3 Coleta das amostras e análise

As mudas coletadas no dia 0, 4, 10 e 20 dias após o transplante foram lavadas em água corrente e posteriormente o excesso de água foi retirado utilizando papel toalha. Um corte foi realizado no colo da planta para destacar a parte aérea do sistema radicial. A massa da matéria fresca total das plantas e a altura de plantas correspondente ao comprimento entre o colo da planta e a gema apical foi mensurado. Foi mensurado o índice de galhas das raízes (BRIDGE; PAGE, 1980). As raízes foram fragmentadas em pedaços de 2 cm de comprimento. Uma amostra aleatória de 0,1 g de raízes frescas foi coletada para quantificação de nematoides nas

raízes. A parte aérea e as raízes foram embaladas individualmente em folhas de alumínio, e mergulhadas em nitrogênio líquido e posteriormente armazenadas à -20 °C.

Para a quantificação dos nematoides, 100 mg de raízes infestadas com nematoides foram incubadas por 4 min em um Microtubo de 2 mL com 1 mL de solução de NaClO à 1,5%. Após a incubação, o NaClO foi escorrido e as raízes lavadas por 3 vezes com 1 mL de água. Foram adicionados 1 mL de fucsina ácida (1,0 g de fucsina ácida, 250 mL de ácido acético e 750 mL de água destilada) aos tubos Microtubo e posteriormente incubados em banho-maria até atingir 100° C por 30 s. Os tubos foram mantidos em temperatura ambiente por 10 min. O corante foi escorrido, e as raízes lavadas 3 vezes com 1 mL de água. Foram adicionados 1 mL de solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 30% nos tubos Microtubo, e posteriormente submetido à agitação a 5 g por 1 h. A solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi removida e substituída por 500 µL de glicerina acidificada (500 mL de glicerina e 5 mL de HCl 2 N). Os tubos foram incubados em banho-maria até atingir 100° C por 30 s. Após atingir o balanço térmico, as raízes foram pressionadas entre duas lâminas de microscopia (BYRD; KIRKPATRICK; BARKER, 1983). A quantificação dos nematoides no interior das raízes foi realizada em microscópio de luz em ampliação de 100×.

O extrato proteico foi obtido pela maceração de 0,2 g de material vegetal em almofariz previamente gelado contendo 0,1g de micropérolas de vidro, 0,1g de resina Dowex 1-X8, 0,1 g de PVPP e 4 mL de tampão borato de sódio 0,1M (pH 8,8) contendo EDTA 1mM, e ácido ascórbico 50 mM. O material completamente macerado foi centrifugado a 13500 g, a 4°C por 30min (GUZZO; MARTINS, 1996). Uma alíquota de 1200 µL do sobrenadante foi coletado, armazenado em um tubo Microtubo de 2 mL e congelado a -20 °C.

A atividade das enzimas β-1,3-glucanase, quitinase e fenilalanina-amônioliase foi determinada em relação ao teor de proteínas no tecido vegetal. A determinação do teor total de proteínas utilizou 40 µL de extrato proteico, adicionados a 460 µL de água destilada e 1 mL de reagente de Bradford e homogeneizados por 5 min (BRADFORD, 1976). A absorbância foi lida a 595 nm em espectrofotômetro. A concentração de proteína foi estimada com base em uma curva padrão de albumina de soro bovino. Os resultados foram expressos em mg g<sup>-1</sup> de tecido vegetal fresco.

A estimativa da atividade da β-1,3-glucanase foi determinada pela quantificação colorimétrica da hidrólise da β-1,3-glucana (GUZZO; MARTINS, 1996; WIRTH; WOLF, 1992). Foram utilizados 200 µL de extrato proteico diluído em 400 µL de tampão acetato de sódio 50mM (pH 5) e 200 µL de substrato enzimático (CM-Curdlan-RBB 4mg ml<sup>-1</sup>). O extrato foi agitado em vórtex e posteriormente incubado a 40° C por 2 h. A reação enzimática foi paralisada com a adição de 200 µL de HCl (2N) e esfriado em banho de gelo por 10 min. O

extrato foi centrifugado a 10.000 g por 5 min. A absorbância foi lida a 600 nm em espectrofotômetro. As concentrações foram determinadas usando uma curva padrão de glicose e os resultados foram expressos unidade enzimática  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína.

A estimativa da atividade da enzima quitinases foi determinada pela quantificação colorimétrica da hidrólise da quitina (GUZZO; MARTINS, 1996; WIRTH; WOLF, 1992). Foram utilizados 400  $\mu\text{L}$  de extrato proteico diluído em 500  $\mu\text{L}$  tampão fosfato de sódio 0,2 M com 100 mg de substrato para quitinases. O extrato foi agitado em vórtex e posteriormente incubado a 50° C por 1 h. A reação enzimática foi paralisada com a fervura do banho maria por 5 min. O extrato foi centrifugado a 7000 RPM por 10 min. A absorbância foi lida a 595 nm em espectrofotômetro. Os resultados foram expressos unidade enzimática  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína.

A estimativa da atividade da enzima fenilalanina-amônioliase foi realizada pela diferença absorbância resultante da conversão da fenilalanina em ácido trans-cinâmico (RODRIGUES; BEZERRA NETO; COELHO, 2006). Foram macerados 0,2 g de material vegetal em almofariz previamente gelado com 4,0 mL do tampão TRIS – HCl pH 8. O tampão de extração foi preparado com uma mistura de 22,2 g de Tris; 0,37 g de EDTA; 85,5 g de sacarose; 10 g de PVP e completou-se o volume para 1000 mL de água destilada. O pH foi ajustado para 8,0 com ácido clorídrico 2,0 N. O material completamente macerado foi centrifugado a 6000 g por 10 min a 4 °C. Uma alíquota de 200  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foi coletado e depositado em um tubo de ensaio de 15 mL, acrescido de 5 mL do tampão de extração. O extrato foi agitado em vórtex e uma alíquota de 1,5 mL do extrato foi transferido para um novo tubo de ensaio, acrescido de 1,0 mL do tampão de extração e 0,5 mL de fenilalanina (49,6 mg  $\text{mL}^{-1}$ ), e agitado em vórtex novamente. A solução foi incubada em banho-maria por 1 h a 40 °C. Após a incubação os tubos foram transferidos para um banho de gelo para paralisar a reação enzimática. A absorbância foi lida a 290 nm em espectrofotômetro. As concentrações foram estimadas com uma curva padrão de ácido trans-cinâmico e os resultados foram expressos como unidade enzimática  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína.

A estimativa da concentração de fenóis totais foi realizada pelo método espectrofotométrico com o reagente de Folin – Ciocalteau (BIELESKI; TURNER, 1966; JENNINGS, 1981). Foram macerados 0,2 g de material vegetal em almofariz com 5 mL da solução de extração. A solução de extração foi preparada utilizando metanol, clorofórmio e água na proporção de 12:5:3 v v<sup>-1</sup>. O material completamente macerado foi centrifugado a 6.000 rpm a 20 °C por 20 minutos. Uma alíquota de 500  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foi coletado e depositado em um tubo de ensaio de 15 mL, acrescido de 500  $\mu\text{L}$  água destilada e 500  $\mu\text{L}$  de reagente Folin – Ciocalteau diluído em água destilada (1:10 v v<sup>-1</sup>). O extrato foi agitado em vórtex, e após 15

min foram adicionados 5 mL do reagente alcalino A (carbonato de sódio 2% em solução de hidróxido de sódio 0,1 N). A solução foi agitada em vórtex e incubada por 50 min. A absorbância foi lida a 760 nm em espectrofotômetro. No controle negativo foi usada água destilada no mesmo volume do extrato vegetal. O resultado foi expresso em  $\text{mg g}^{-1}$  de tecido vegetal fresco.

### 3.2.4 Análise de dados

Com os dados de altura de plantas, massa fresca total e variáveis bioquímicas para os tratamentos ao longo do tempo foi obtida a área abaixo da curva de progresso (AACP). Os dados de AACP foram submetidos a testes de normalidade e homogeneidade de variância, em esquema fatorial 5x2, sendo o primeiro fator os tratamentos e o segundo fator o momento (repetição) dos experimentos. Para atingir a normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias, os dados foram transformados para  $\log_{10}(y)$ . Foi realizada a análise de variância (ANOVA) e posteriormente teste de Scott-Knott, ao nível de significância de 5% no pacote ‘ExpDes.pt’ (FERREIRA; CAVALCANTI; NOGUEIRA, 2021).

## 3.3 RESULTADOS

O efeito entre os experimentos não foi significativo para as variáveis avaliadas. Assim, os dados dos dois experimentos foram analisados em conjunto ( $n = 6$ ). A AACP para a altura de plantas e massa fresca total não apresentaram diferenças estatísticas entre os tratamentos testados (Figura 3.1).

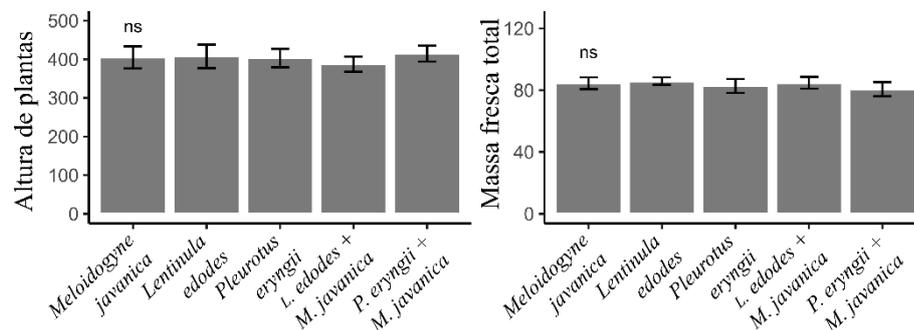


Figura 3.1 – Área abaixo da curva de progresso (AACP) para a altura e massa fresca total das plantas de tomateiros ‘Santa Clara’ do momento de aplicação dos tratamentos no dia 0 até o dia 20 de avaliação. Os dados representam a média ( $\pm$  desvio padrão,  $n = 6$ ) de dois experimentos, cada um realizado em três repetições. <sup>ns</sup>As médias não diferem estatisticamente pelo teste ANOVA ( $P \geq 0,05$ ).

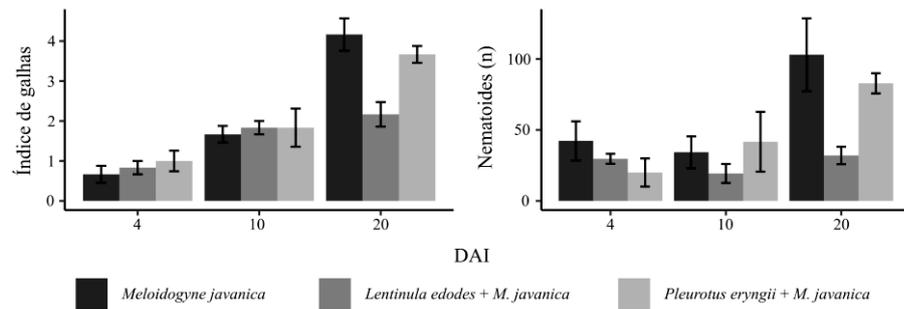


Figura 3.2 – Índice de galhas e número de nematoides da espécie *Meloidogyne javanica* contabilizados no interior das raízes de tomateiros das plantas testemunhas (Controle) e cultivadas em substrato de *Lentinula edodes* (Led01 infestado) e *Pleurotus eryngii* (Per01 infestado) avaliadas nos diferentes dias após a inoculação (DAI) dos nematoides. Os tratamentos sadios não receberam suspensões de *M. javanica* e não apresentaram sintomas da formação de galhas nas raízes das plantas de tomateiros ‘Santa Clara’. Os dados representam a média ( $\pm$  desvio padrão,  $n = 6$ ) de dois experimentos, cada um realizado com três repetições.

Os tratamentos que tiveram plantas inoculadas com *M. javanica* apresentaram sintomas de galhas confirmando a eficiência da inoculação e consequentemente a viabilidade do inóculo para que pudesse ser avaliado o efeito dos substratos de cogumelo na presença e ausência do nematoide. Após 4 dias da inoculação começaram a apresentar pequenas galhas nas raízes das plantas de tomateiros (Figura 3.2). As plantas não inoculadas com a suspensão de *M. javanica* não apresentaram sintomas de galhas.

As médias das AACP das análises bioquímicas foram analisadas separadamente para o sistema radicial e a parte aérea das plantas (Tabela 3.1). Os valores médios de AACP para o teor de proteínas totais, atividade da fenilalanina-amônio-liase e o teor de fenóis totais não apresentaram diferenças estatísticas entre os tratamentos testados para raízes e parte aérea. Os valores médios da AACP da atividade da  $\beta$ -1,3-Glucanase nas raízes das plantas de tomateiros apresentaram diferenças entre os tratamentos. Os valores médios da atividade da  $\beta$ -1,3-Glucanase nas raízes de plantas de tomateiro sadias e infestadas com o *M. javanica* cultivadas com substrato de *P. eryngii* e infestadas com o *M. javanica* cultivadas em substrato de *L. edodes* foram superiores aos valores médios das plantas de tomateiro infestadas com o *M. javanica* sem os cogumelos e em plantas de tomateiro sadias cultivadas em substrato de *L. edodes*. Na parte aérea das plantas de tomateiro, a atividade da  $\beta$ -1,3-Glucanase foi superior nos tratamentos contendo *P. eryngii* e *L. edodes*, com e sem a inoculação de *M. javanica* comparado as plantas inoculadas com *M. javanica* sem a presença do substrato de cogumelo. Em relação à atividade da quitinase nas raízes e na parte aérea, os valores médios da AACP nos tratamentos com o substrato de contendo *P. eryngii* e *L. edodes* com e sem a inoculação foram superiores aos

valores médios da atividade da enzima do tratamento controle sem a aplicação do substrato de cogumelos e inoculado com o nematoide (Tabela 3.1). De modo geral, a inoculação de nematoides não foi um fator significativo para a AACP da atividade das enzimas  $\beta$ -1,3-glucanase e quitinase na presença dos substratos de cogumelos

Tabela 3.1 – Médias estimadas para a área abaixo da curva de progresso das alterações bioquímicas das plantas de tomateiros ‘Santa Clara’ do momento de aplicação dos tratamentos no dia 0 até o dia 20 de avaliação.

Tratamento	Proteínas		$\beta$ -1,3-Glucanase	Quitinase	Fenilalanina amônioliase	Fenóis totais
Raízes						
<i>Meloidogyne javanica</i>	51.17	ns	0.397 b	9.16 b	0.046 ns	5.54 ns
<i>Lentinula edodes</i>	54.06		0.431 b	12.60 a	0.058	6.59
<i>Pleurotus eryngii</i>	69.03		0.511 a	12.99 a	0.054	6.97
<i>M. javanica</i> + <i>L. edodes</i>	93.77		0.501 a	12.06 a	0.046	5.37
<i>M. javanica</i> + <i>P. eryngii</i>	67.95		0.465 a	12.95 a	0.042	6.51
Parte aérea						
<i>Meloidogyne javanica</i>	158.91	ns	0.294 b	7.71 b	0.031 ns	20.79 ns
<i>Lentinula edodes</i>	209.03		0.344 a	9.56 a	0.022	21.31
<i>Pleurotus eryngii</i>	175.07		0.343 a	10.15 a	0.035	21.27
<i>M. javanica</i> + <i>L. edodes</i>	192.94		0.340 a	9.43 a	0.032	18.22
<i>M. javanica</i> + <i>P. eryngii</i>	196.94		0.323 a	9.58 a	0.020	21.59

Os dados representam a média (n = 6) de dois experimentos, cada um realizado com três repetições. As plantas de tomateiros foram infestadas com *Meloidogyne javanica*. Os dados representam a média ( $\pm$  desvio padrão, n = 6) de dois experimentos, cada um realizado em quatro blocos. \*Médias seguidas por letras iguais pertencem ao mesmo agrupamento segundo o teste de Scott-Knott ( $P \leq 0,05$ ).

A atividade da  $\beta$ -1,3-Glucanase nas raízes e na parte aérea das plantas de tomateiro aumenta aos 4 dias após a aplicação a inoculação (DAI), mantendo os níveis da atividade até os 20 DAI, sendo observado aos 4 dias após a aplicação A atividade da quitinase nas raízes aumentou aos 4 dias após aplicação dos tratamentos, mantendo a atividade até os 20 dias após a aplicação dos tratamentos (Figura 3.3).

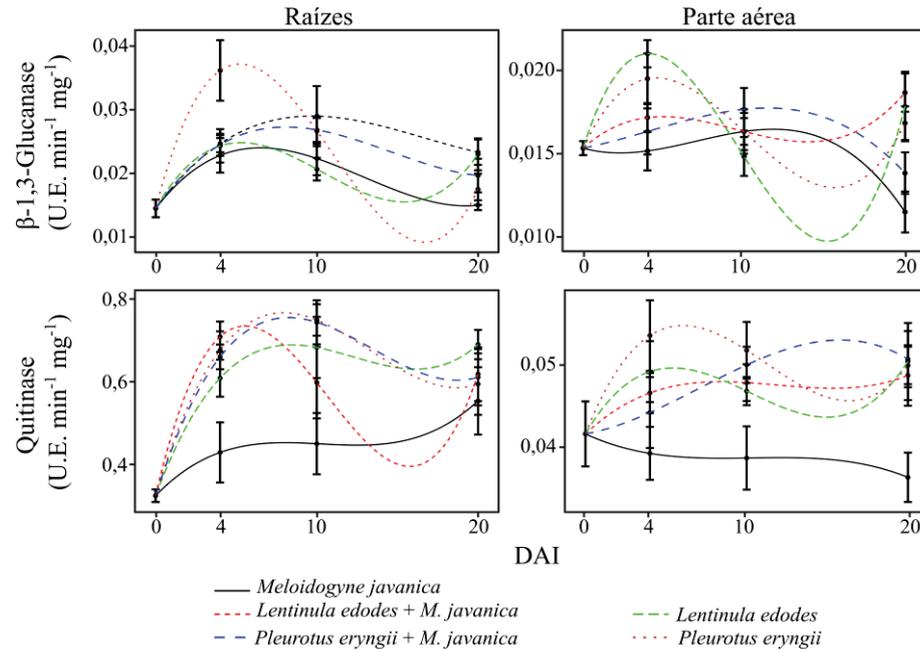


Figura 3.3 - Curvas de  $\beta$ -1,3-glucanase e quitinases estimados nas raízes e na parte aérea das plantas de tomateiros ‘Santa Clara’ durante o desenvolvimento entre o momento de aplicação dos tratamentos no dia 0 até o dia 20 dias após a inoculação (DAI). Os tratamentos infestados receberam suspensões de *Meloidogyne javanica*, enquanto os tratamentos saudáveis não receberam suspensões de *M. javanica*. Os dados representam a média ( $\pm$  erro padrão, n = 6) de dois experimentos, cada um realizado com três repetições.

### 3.4 DISCUSSÃO

A utilização do substrato de cogumelos das espécies de *L. edodes* e *P. eryngii* incorporados ao solo não interferiram no acúmulo de proteínas, na atividade da fenilalanina-amoniolase e no teor de fenóis totais nas raízes e na parte aérea de plantas de tomateiro. Entretanto, os tratamentos afetaram a atividade das enzimas  $\beta$ -1,3-Glucanase e quitinase, indicando que os cogumelos podem causar alterações bioquímicas nas plantas de tomateiro, induzindo a produção de proteínas relacionadas a resistência das plantas independente da presença do *M. javanica*. Esses resultados indicam um efeito dos cogumelos sobre o aumento da atividade da via metabólica das proteínas de resistência em detrimento a via metabólica dos fenilpropanoides. Sendo assim, este trabalho mostra que a eficácia dos cogumelos no controle do nematoide das galhas pode ser justificado devido ao efeito direto pela produção de toxinas nematicidas ou atividade predatória das hifas dos cogumelos como observado por Hahn et al. (2019) e possivelmente a um efeito indireto devido a um aumento da atividade da via metabólica das proteínas de resistência como observado neste estudo.

A aplicação dos substratos de cogumelos sobre as plantas de tomateiro não afetou a atividade da enzima fenilalanina-amoniolase nas raízes e na parte aérea das plantas. Essa

enzima é fundamental para a via do ácido chiquímico, convertendo a fenilalanina que é o principal precursor da via dos fenilpropanoides, da biossíntese de fitoalexinas fenólicas e lignina (VOGT, 2010). Conseqüentemente, a ausência de indução para o aumento da atividade da fenilalanina-amônioliase não resultou em diferenças entre as concentrações de fenóis totais entre os tratamentos. Os compostos fenólicos desempenham papel importante na resistência de plantas de bananeira ao nematoide *Radopholus similis* (DHAKSHINAMOORTHY et al., 2014; HOLSCHER et al., 2014). Entretanto, a indução de resistência pela aplicação do fungo nematófago *Pochonia chlamydosporia* em plantas de tomateiro infestadas com *M. javanica* (MEDEIROS et al., 2015) e a levedura *Lachancea thermotolerans* em plantas de soja infestadas com *M. incognita* (MIORANZA et al., 2021) também não induziram alterações significativas na atividade da fenilalanina-amônioliase.

O aumento da atividade da  $\beta$ -1,3-glucase nas plantas de tomateiro cultivadas em substrato de *P. eryngii* e *L. edodes* pode ser justificado pela presença do glucano, um polissacarídeo presente nesses cogumelos (AVNI et al., 2017; BAK et al., 2014). As  $\beta$ -1,3-glucanases hidrolisam as ligações  $\beta$ -1,3-D-glucosídicas, degradando esse polímero que é o principal componente das paredes celulares dos fungos (HONG et al., 2002). Conseqüentemente, as  $\beta$ -1,3-glucanases hidrolisam o  $\beta$ -1,3-glucano presente na parede celular dos fungos (SINGH; SINGH, 2018) sendo associada a defesa das plantas aos fungos fitopatogênicos (CASTRESANA et al., 1990).

O aumento da atividade da enzima quitinase pode ser propiciado pela presença de quitina na constituição dos cogumelos, representando em média 25% da fibra alimentar total dos cogumelos comestíveis (MANZI et al., 2004). A quitina também é um dos principais componentes dos nematoides (CHEN et al., 2015) sendo principalmente responsável pelo enrijecimento dos ovos (MCCLURE; BIRD, 1976). Entretanto, a presença do nematoide não é um fator determinante para a indução de resistência, visto que a quitina do cogumelo pode sinalizar e ser reconhecida pela planta. A quitinase pode ter algum efeito no mecanismo de resistência das plantas levando a uma redução do nematoide por degradação da parede celular e causar degradação das células da cutícula do nematoide. Deste modo, a planta acumula quitinases (SHARMA et al., 2011) que podem inibir o desenvolvimento dos nematoides (KHAN; WILLIAMS; NEVALAINEN, 2004). O maior acúmulo de quitinase foi observado em tomateiros tratados com *Pseudomonas fluorescens* Pf 128, que reduziu a penetração do nematoide nos tecidos radiculares do tomateiro (SANKARI; JONATHAN; KAVITHA, 2010).

No presente estudo, os tratamentos foram aplicados por incorporação ao solo, com contato direto com o patógeno. Entretanto, o aumento da atividade das enzimas  $\beta$ -1,3-

glucanases e quitinase na parte aérea das plantas de tomateiro, distante do contato direto com os tratamentos indica a indução de resistência sistêmica. Resultados semelhantes foram observados com o uso do substrato de *Lyophyllum decastes* incorporado ao solo, propiciando resultados satisfatórios no controle de antracnose (*Colletotrichum orbiculare*) que ataca a parte aérea de plantas de pepino (PARADA et al., 2011, 2012). Novos estudos podem ser realizados para verificar esse efeito de indução sobre as doenças que afetam a parte aérea das plantas de tomateiro, como por exemplo *Phytophthora infestans* e *Alternaria tomatophila*.

Novos estudos precisam ser realizados para verificar a interação dos substratos de cogumelos com o agroecossistema. A decomposição do substrato de cogumelos quando aplicado ao solo pode resultar na produção de substâncias desconhecidas que afetam diretamente os nematoides. Os ácidos orgânicos são tóxicos para os nematoides parasitas de plantas (OKA, 2010), embora sejam liberados durante a decomposição de materiais ricos em carbono mantido sob condições anaeróbicas (BLOK et al., 2000; MOMMA et al., 2006). Os processos de decomposição do substrato resultam em alterações químicas do solo, que incluem pH, que conseqüentemente favorecem a geração de amônia e ácido nítrico, e são tóxicos aos nematoides (OKA, 2010). As alterações físicas do solo também podem ser observadas na estrutura do solo, visto que a adição da matéria orgânica resulta na alteração da porosidade e estrutura do solo (NTALLI et al., 2020). Além disso, a própria decomposição pode favorecer o desenvolvimento da microbiota antagonista do solo (além do próprio cogumelo), reduzindo a população dos nematoides (BRIDGE, 1996; OKA, 2010). A eficiência econômica do controle dos nematoides com o uso do substrato de cogumelos também precisa ser testada.

### 3.5 DECLARAÇÃO DE CONTRIBUIÇÃO DE AUTORIA

**Marlon Henrique Hahn:** Conceitualização, Metodologia, Análise formal, Curadoria de dados, Redação - rascunho original, Visualização, Investigação. **Mayara Catherine Candido Silva e Danielle Dutra Martinha:** Visualização, Investigação. **Sérgio Miguel Mazaro:** Conceituação, Recursos, Redação - revisão e edição. **Louise Larissa May De Mio:** Conceituação, Recursos, Aquisição de financiamento, Redação - revisão e edição. **Henrique da Silva Silveira Duarte:** Conceituação, Recursos, Supervisão, Administração de projetos, Visualização, Aquisição de financiamento, Redação - revisão e edição.

### 3.6 AGRADECIMENTOS

Este estudo foi parcialmente financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código Financeiro 001. Os autores LLMDM e HSSD

agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) / Brasil por sua bolsa de pesquisa.

### 3.7 REFERÊNCIAS

- AVNI, S.; EZOVE, N.; HANANI, H.; YADID, I.; KARPOVSKY, M.; HAYBY, H.; GOVER, O.; HADAR, Y.; SCHWARTZ, B.; DANAY, O. Olive Mill waste enhances  $\alpha$ -glucan content in the edible mushroom *Pleurotus eryngii*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 7, p. 1564, 2017.
- BAK, W. C.; PARK, J. H.; PARK, Y. A.; KA, K. H. Determination of glucan contents in the fruiting bodies and mycelia of *Lentinula edodes* cultivars. **Mycobiology**, v. 42, n. 3, p. 301–304, 2014.
- BARKER, K. R.; KOENNING, S. R. Developing sustainable systems for nematode management. **Annual Review of Phytopathology**, v. 36, n. 1, p. 165–205, 1998.
- BARRON, G. L.; THORN, R. G. Destruction of nematode by species of *Pleurotus*. **Canadian Journal of Botany**, v. 65, n. 4, p. 774–778, 1987.
- BELAN, L. L.; FONSECA, S. O.; ALVES, F. R.; JÚNIOR, W. C. D. J.; MATTA, F. D. P.; CABRAL, P. D. S.; RABELLO, L. K. C.; RODRIGUES, A. A. Screening of cherry tomato genotypes for resistance to *Meloidogyne incognita* and *M. javanica*. **Nematologia Brasileira**, v. 33, n. 3, p. 96–99, 2009.
- BIELESKI, R. L.; TURNER, N. A. Separation and estimation of amino acids in crude plant extracts by thin-layer electrophoresis and chromatography. **Analytical Biochemistry**, v. 17, n. 2, p. 278–293, 1966.
- BLOK, W. J.; LAMERS, J. G.; TERMORSHUIZEN, A. J.; BOLLEN, G. J. Control of soilborne plant pathogens by incorporating fresh organic amendments followed by tarping. **Phytopathology**, v. 90, n. 3, p. 253–259, 2000.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.
- BRIDGE, J. Nematode management in sustainable and subsistence agriculture. **Annual review of phytopathology**, v. 34, n. 94, p. 201–225, 1996.
- BRIDGE, J.; PAGE, S. L. J. Estimation of root-knot nematode infestation levels on roots using a rating chart. **Tropical Pest Management**, v. 26, n. 3, p. 296–298, 1980.
- BYRD, D. W.; KIRKPATRICK, T.; BARKER, K. R. An improved technique for clearing and staining plant tissues for detection of nematodes. **Journal of nematology**, v. 15, n. 1, p. 142–143, 1983.
- CARNEIRO, R. M. D. G.; ALMEIDA, M. R. A. Técnica de eletroforese usada no estudo de enzimas de nematóides de galhas para identificação de espécies. **Nematologia Brasileira**, v. 25, n. 1, p. 35–44, 2001.

- CARNEIRO, R. M. D. G.; ALMEIDA, M. R. A.; QUÉNÉHERVÉ, P. Enzyme phenotypes of *Meloidogyne* spp. populations. **Nematology**, v. 2, n. 6, p. 645–654, 2000.
- CASTAÑEDA-RAMÍREZ, G. S.; TORRES-ACOSTA, J. F. de J.; SÁNCHEZ, J. E.; MENDOZA-DE-GIVES, P.; GONZÁLEZ-CORTÁZAR, M.; ZAMILPA, A.; AL-ANI, L. K. T.; SANDOVAL-CASTRO, C.; DE FREITAS SOARES, F. E.; AGUILAR-MARCELINO, L. The possible biotechnological use of edible mushroom bioproducts for controlling plant and animal parasitic nematodes. **BioMed Research International**, v. 2020, p. 1–12, 2020.
- CASTRESANA, C.; DE CARVALHO, F.; GHEYSEN, G.; HABETS, M.; INZÉ, D.; VAN MONTAGU, M. Tissue-specific and pathogen-induced regulation of a *Nicotiana plumbaginifolia* beta-1,3-glucanase gene. **The Plant Cell**, v. 2, n. 12, p. 1131–1143, 1990.
- CHEN, L.; JIANG, H.; CHENG, Q.; CHEN, J.; WU, G.; KUMAR, A.; SUN, M.; LIU, Z. Enhanced nematocidal potential of the chitinase pachi from *Pseudomonas aeruginosa* in association with Cry21Aa. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 14395, 2015.
- COOLEN, W. A.; D'HERDE, C. J. **A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue**. Ghent: State Agriculture Research Centre, 1972.
- DEBONA, D.; FIGUEIRÓ, G. G.; CORTE, G. D.; NAVARINI, L.; DOMINGUES, L. da S.; BALARDIN, R. S. Efeito do tratamento de sementes com fungicidas e acibenzolar-S-methyl no controle da ferrugem asiática e crescimento de plântulas em cultivares de soja. **Summa Phytopathologica**, v. 35, n. 1, p. 26–31, 2009.
- DEGENKOLB, T.; VILCINSKAS, A. Metabolites from nematophagous fungi and nematocidal natural products from fungi as alternatives for biological control. Part II: metabolites from nematophagous basidiomycetes and non-nematophagous fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 9, p. 3813–3824, 2016.
- DHAKSHINAMOORTHY, S.; MARIAMA, K.; ELSÉN, A.; DE WAELE, D. Phenols and lignin are involved in the defence response of banana (*Musa*) plants to *Radopholus similis* infection. **Nematology**, v. 16, n. 5, p. 565–576, 2014.
- DONG, J. Y.; LI, X. P.; LI, L.; LI, G. H.; LIU, Y. J.; ZHANG, K. Q. Preliminary results on nematocidal activity from culture filtrates of Basidiomycetes against the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* (Aphelenchoididae). **Annals of Microbiology**, v. 56, n. 2, p. 163–166, 2006.
- EMBRAPA. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. 5. ed. Brasília: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2018.
- FAO. **Crops**. 2021. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>>. Acesso em: 9 fev. 2021.
- FERREIRA, E. B.; CAVALCANTI, P. P.; NOGUEIRA, D. A. ExpDes.pt: Pacote Experimental Designs (português). 2021. Disponível em: <<https://cran.r-project.org/web/packages/ExpDes.pt/ExpDes.pt.pdf>>. Acesso em: 7 jan. 2021.

- GUZZO, S. D.; MARTINS, E. M. F. Local and systemic induction of  $\beta$ -1,3-Glucanase and Chitinase in coffee leaves protected against *Hemileia vastatrix* by *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Phytopathology**, v. 144, n. 9–10, p. 449–454, 1996.
- HAHN, M. H.; DUARTE, H. da S. S.; MAY DE MIO, L. L.; KUHN, O. J. Levantamento bibliométrico de fungos nematófagos no controle dos nematoides das galhas. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 17, n. 4, p. 389–397, 2018.
- HAHN, M. H.; MAY DE MIO, L. L.; KUHN, O. J.; DUARTE, H. da S. S. Nematophagous mushrooms can be an alternative to control *Meloidogyne javanica*. **Biological Control**, p. 104024, 2019.
- HEYDARI, R.; POURJAM, E.; GOLTAPPEH, E. M. Antagonistic effect of some species of *Pleurotus* on the root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* *in vitro*. **Plant Pathology Journal**, v. 5, n. 2, p. 173–177, 2006.
- HOLSCHER, D.; DHAKSHINAMOORTHY, S.; ALEXANDROV, T.; BECKER, M.; BRETSCHNEIDER, T.; BUERKERT, A.; CRECELIUS, A. C.; DE WAELE, D.; ELSSEN, A.; HECKEL, D. G.; HEKLAU, H.; HERTWECK, C.; KAI, M.; KNOP, K.; KRAFFT, C.; MADDULA, R. K.; MATTHAUS, C.; POPP, J.; SCHNEIDER, B.; SCHUBERT, U. S.; SIKORA, R. A.; SVATO, A.; SWENNEN, R. L. Phenalenone-type phytoalexins mediate resistance of banana plants (*Musa* spp.) to the burrowing nematode *Radopholus similis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 1, p. 105–110, 2014.
- HONG, T.-Y.; CHENG, C.-W.; HUANG, J.-W.; MENG, M. Isolation and biochemical characterization of an endo-1,3- $\beta$ -glucanase from *Streptomyces sioyaensis* containing a C-terminal family 6 carbohydrate-binding module that binds to 1,3- $\beta$ -glucan. **Microbiology**, v. 148, n. 4, p. 1151–1159, 2002.
- ISHIZAKI, T.; NOMURA, N.; WATANABE, K. Screening of mushrooms for nematophagous activity against the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. **Nematological Research**, v. 45, n. 1, p. 19–25, 2015.
- JENNINGS, A. C. The determination of dihydroxy phenolic compounds in extracts of plant tissues. **Analytical Biochemistry**, v. 118, n. 2, p. 396–398, 1981.
- KHAN, A.; WILLIAMS, K. L.; NEVALAINEN, H. K. M. Effects of *Paecilomyces lilacinus* protease and chitinase on the eggshell structures and hatching of *Meloidogyne javanica* juveniles. **Biological Control**, v. 31, n. 3, p. 346–352, 2004.
- KWAK, A. M.; MIN, K. J.; LEE, S. Y.; KANG, H. W. Water extract from spent mushroom substrate of *Hericium erinaceus* suppresses bacterial wilt disease of tomato. **Mycobiology**, v. 43, n. 3, p. 311–318, 2015.
- LI, G.; ZHANG, K.; XU, J.; DONG, J.; LIU, Y. Nematicidal substances from fungi. **Recent Patents on Biotechnology**, v. 1, n. 3, p. 212–233, 2007.
- LUO, H.; LI, X.; LI, G.; PAN, Y.; ZHANG, K. Acanthocytes of *Stropharia rugosoannulata* function as a nematode-attacking device. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 4, p. 2982–2987, 2006.

- LUO, H.; LIU, Y.; FANG, L.; LI, X.; TANG, N.; ZHANG, K. *Coprinus comatus* damages nematode cuticles mechanically with spiny balls and produces potent toxins to immobilize nematodes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 12, p. 3916–3923, 2007.
- LUO, H.; MO, M.; HUANG, X.; LI, X.; ZHANG, K. *Coprinus comatus*: A basidiomycete fungus forms novel spiny structures and infects nematode. **Mycologia**, v. 96, n. 6, p. 1218–1224, 2004.
- MAMIYA, Y. Attraction of the pinewood nematode to mycelium of some wood-decay fungi. **Nematological Research (Japanese Journal of Nematology)**, v. 36, n. 1, p. 1–9, 2006. a.
- MAMIYA, Y. Attraction of the pinewood nematode to mycelium of some wood-decay fungi. **Japanese Journal of Nematology**, v. 36, n. 1, p. 1–9, 2006. b.
- MANZI, P.; MARCONI, S.; AGUZZI, A.; PIZZOFERRATO, L. Commercial mushrooms: nutritional quality and effect of cooking. **Food Chemistry**, v. 84, n. 2, p. 201–206, 2004.
- MCCLURE, M. A.; BIRD, A. F. The tylenchid (Nematoda) eggshell: formation of the egg shell in *Meloidogyne javanica*. **Parasitology**, v. 72, n. 1, p. 29–39, 1976.
- MEDEIROS, H. A. De; RESENDE, R. S.; FERREIRA, F. C.; FREITAS, L. G.; RODRIGUES, F. Á. Induction of resistance in tomato against *Meloidogyne javanica* by *Pochonia chlamydosporia*. **Nematoda**, v. 2, 2015.
- MIORANZA, T. M.; MIAMOTO, A.; MATTOS, A. P.; RISSATO, B. B.; DIAS-ARIEIRA, C. R.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. *Lachancea thermotolerans* acts as a resistance inducer in soybean infected with *Meloidogyne incognita*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 159, n. 3, p. 511–523, 2021.
- MOMMA, N.; YAMAMOTO, K.; SIMANDI, P.; SHISHIDO, M. Role of organic acids in the mechanisms of biological soil disinfestation (BSD). **Journal of General Plant Pathology**, v. 72, n. 4, p. 247–252, 2006.
- NTALLI, N.; ADAMSKI, Z.; DOULA, M.; MONOKROUSOS, N. Nematicidal amendments and soil remediation. **Plants**, v. 9, n. 4, p. 429, 2020.
- OKA, Y. Mechanisms of nematode suppression by organic soil amendments - A review. **Applied Soil Ecology**, v. 44, n. 2, p. 101–115, 2010.
- PARADA, R. Y.; MURAKAMI, S.; SHIMOMURA, N.; EGUSA, M.; OTANI, H. Autoclaved spent substrate of hatakeshimeji mushroom (*Lyophyllum decastes* Sing.) and its water extract protect cucumber from anthracnose. **Crop Protection**, v. 30, n. 4, p. 443–450, 2011.
- PARADA, R. Y.; MURAKAMI, S.; SHIMOMURA, N.; OTANI, H. Suppression of fungal and bacterial diseases of cucumber plants by using the spent mushroom substrate of *Lyophyllum decastes* and *Pleurotus eryngii*. **Journal of Phytopathology**, v. 160, p. 390–396, 2012.

- RODRIGUES, A. A. C.; BEZERRA NETO, E.; COELHO, R. S. B. Indução de resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *Tracheiphilum* em Caupi: eficiência de indutores abióticos e atividade enzimática elicitada. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n. 5, p. 492–499, 2006.
- SANKARI, M. K.; JONATHAN, E. I.; KAVITHA, P. G. Induction of systemic resistance by chitinase in tomato against *Meloidogyne incognita* by *Pseudomonas fluorescens*. **Resistant Pest Management Newsletter**, v. 20, n. 1, p. 41–42, 2010.
- SEID, A.; FININSA, C.; MEKETE, T.; DECRAEMER, W.; WESEMAEL, W. M. L. Tomato (*Solanum lycopersicum*) and root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) -a century-old battle. **Nematology**, v. 17, n. 9, p. 995–1009, 2015.
- SHARMA, N.; SHARMA, K. P.; GAUR, R. K.; GUPTA, V. K. Role of chitinase in plant defense. **Asian Journal of Biochemistry**, v. 6, n. 1, p. 29–37, 2011.
- SILVA, R. F.; PASCHOLATI, S. F.; BEDENDO, I. P. Induced resistance in tomato plants to *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis* by *Lentinula edodes* and *Agaricus subrufescens* (syn. *Agaricus brasiliensis*). **Journal of Plant Pathology**, v. 95, n. 2, p. 285–297, 2013.
- SINGH, A.; SINGH, I. K. **Molecular aspects of plant-pathogen interaction**. 1. ed. Singapore: Springer Singapore, 2018.
- SOARES, F. E. de F.; SUFIATE, B. L.; DE QUEIROZ, J. H. Nematophagous fungi: Far beyond the endoparasite, predator and ovicidal groups. **Agriculture and Natural Resources**, v. 52, n. 1, p. 1–8, 2018.
- SUFIATE, B. L.; SOARES, F. E. de F.; MOREIRA, S. S.; GOUVEIA, A. de S.; MONTEIRO, T. S. A.; FREITAS, L. G. De; QUEIROZ, J. H. De. Nematicidal action of *Pleurotus eryngii* metabolites. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 12, p. 216–219, 2017.
- TAYLOR, A.; SASSER, J. **Biology, Identification and Control of Root-knot Nematodes (*Meloidogyne* species)** Raleigh. 1. ed. Raleigh: Department of Plant Pathology, North Carolina State University, United States Agency for International Development, 1978.
- VOGT, T. Phenylpropanoid biosynthesis. **Molecular Plant**, v. 3, n. 1, p. 2–20, 2010.
- WIRTH, S. J.; WOLF, G. A. Micro-plate colourimetric assay for Endo -acting cellulase, xylanase, chitinase, 1,3- $\beta$ -glucanase and amylase extracted from forest soil horizons. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 24, n. 6, p. 511–519, 1992.

#### 4 CAPÍTULO III – EFEITO DE FORMULAÇÕES COMERCIAIS DE NIM SOBRE OS NEMATÓIDES DAS GALHAS

Marlon Henrique Hahn<sup>1</sup>; Louise Larissa May-De-Mio<sup>1</sup>; Sérgio Miguel Mazaro<sup>2</sup>; Walmes Marques Zeviani<sup>3</sup>; Henrique da Silva Silveira Duarte<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Fitotecnia e Fitossanidade, Universidade Federal do Paraná, Curitiba- PR, Brasil. E-mail: [marlonhhahn@gmail.com](mailto:marlonhhahn@gmail.com) and [maydemio@ufpr.br](mailto:maydemio@ufpr.br)

<sup>2</sup>Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR Dois Vizinhos, PR, Brasil. E-mail: [sergio@utfpr.edu.br](mailto:sergio@utfpr.edu.br)

<sup>3</sup>Departamento de Estatística, Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR, Brazil. E-mail: [walmeszeviani@gmail.com](mailto:walmeszeviani@gmail.com)

\* Autor para correspondência. H. S. S. Duarte, e-mail: [henriqueduarte@ufpr.br](mailto:henriqueduarte@ufpr.br)

#### RESUMO

Os tomateiros são prejudicados pelo parasitismo de *Meloidogyne javanica*, um nematoide parasita de plantas e polífago capaz de causar grandes danos a cultura. O controle alternativo de *M. javanica* com extratos vegetais é uma estratégia importante no manejo ecológico de nematoides. A produção de óleo de Nim (*Azadirachta indica*) resulta em subprodutos ricos em substâncias nematocidas em sua composição, das quais são utilizadas na formulação de OpeNeem Flex e OpeNeem Plus. Ovos e juvenis de segundo estágio (J<sub>2</sub>'s) de *M. javanica* foram expostos aos formulados de Nim, OpeNeem Flex e OpeNeem Plus. Os ovos de *M. javanica* foram submetidos às concentrações de 0,0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 e 0,75% (v v<sup>-1</sup>) dos formulados, e os J<sub>2</sub>'s foram submetidos às concentrações de 0,0; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0; 15,0 e 20,0% (v v<sup>-1</sup>) dos formulados. As plantas de tomateiros foram tratadas com as concentrações de 0,00, 0,25, 0,50, 0,75, 1,00, 1,50, 2,00, 2,50 e 3,00% dos formulados para avaliação da penetração de J<sub>2</sub>'s de *M. javanica* nas raízes. Os formulados OpeNeem Flex e OpeNeem Plus foram aplicados em plantas de tomateiros infestados com ovos de *M. javanica* para comparação com o controle obtido pela aplicação de Carbofurano e Abamectina. Os valores estimados de concentração efetiva de 50% de controle (CE<sub>50</sub>) de eclosão de J<sub>2</sub>'s foram de 0,44 e 0,40%, e para a mortalidade dos J<sub>2</sub>'s foram estimadas em 13,9 e 19,3%, respectivamente para OpeNeem Flex para OpeNeem Plus. As aplicações dos formulados OpeNeem Flex e OpeNeem Plus sobre plantas de tomateiros infestados com J<sub>2</sub>'s de *M. javanica* não apresentou efeitos significativos sobre a altura e massa seca das plantas de tomateiros, mas resultou na redução significativa do fator de reprodução de *M. javanica*. As concentrações de 1,00% dos formulados de Nim reduziu o fator de reprodução de *M. javanica* em 48,2% para OpeNeem Flex e 59,4% para OpeNeem Plus,

controle semelhante ao obtido com a Abamectina (58,8%). Este estudo indica que a aplicação de formulados obtidos de subprodutos da produção de óleo de Nim possuem potencial de controle de *M. javanica* em plantas de tomateiro.

**Palavras-chave:** Dose-resposta; Concentração efetiva; *Azadirachta indica*; *Meloidogyne javanica*

### ABSTRACT

Tomato plants are parasitized by *Meloidogyne javanica*, a polyphagous plant parasitic nematode capable of causing great damage to the crop. Alternative control of *M. javanica* with plant extracts is an important strategy in the ecological management of nematodes. The production of Neem oil (*Azadirachta indica*) results in by-products rich in nematicidal substances, which are used in the formulation of OpeNeem Flex and OpeNeem Plus. Eggs and second instar juveniles (J<sub>2</sub>'s) of *M. javanica* were exposed to these formulations. The eggs of *M. javanica* were subjected to concentrations of 0.0; 0.1; 0.2; 0.3; 0.4; 0.5 and 0.75% (v v<sup>-1</sup>) of the formulations, and the J<sub>2</sub>'s were submitted to concentrations of 0.0; 0.5; 1.0; 2.5; 5.0; 10.0; 15.0 and 20.0% (v v<sup>-1</sup>) of the formulations. The tomato plants were treated with concentrations of 0.00, 0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 1.50, 2.00, 2.50 and 3.00% of those formulations for evaluating the penetration of *M. javanica* J<sub>2</sub>'s in the roots. The OpeNeem Flex and OpeNeem Plus formulas were applied to tomato plants infested with *M. javanica* eggs for comparison with the control obtained by the application of Carbofuran and Abamectin. The estimated values of effective concentrations for 50% control (EC<sub>50</sub>) of hatching of J<sub>2</sub>'s were 0.44 and 0.40% and the mortality of J<sub>2</sub>'s was estimated at 13.9 and 19.3% for OpeNeem Flex for OpeNeem Plus, respectively. Applications of OpeNeem Flex and OpeNeem Plus formulas on tomato plants infested with *M. javanica* J<sub>2</sub>'s did not show significant effects on height and dry mass of tomato plants but resulted in a significant reduction in the reproduction factor of *M. javanica*. Concentrations of 1.00% of the Neem formulations reduced the reproduction factor of *M. javanica* by 48.2% for OpeNeem Flex and 59.4% for OpeNeem Plus, a control similar to that obtained with Abamectin (58.8%). This study indicates that the application of formulations obtained from Neem oil by-products have potential to control *M. javanica* in tomato plants.

**Keywords:** Dose-response; Effective concentration; *Azadirachta indica*; *Meloidogyne javanica*

#### 4.1 INTRODUÇÃO

O tomate (*Solanum lycopersicum* L.) é um fruto muito apreciado mundialmente. Em 2019, a produção mundial foi de 180,7 milhões de toneladas, cultivados em 5,0 milhões de ha (FAO, 2021). No Brasil, a produção anual de 2019 foi estimada em 3,9 milhões de toneladas, distribuídos em 54,5 mil ha (FAO, 2021). Considerando o elevado valor econômico da cultura, é importante que não ocorram perdas de produtividade causadas por pragas e doenças. Os nematoides são um dos causadores das maiores perdas em tomateiros suscetíveis, podendo chegar a 80% devido o parasitismo de *Meloidogyne* spp. Goeldi (KAŞKAVALCI; ÖNCÜER, 1999). Esse gênero de nematoides é popularmente conhecido como nematoide das galhas, parasitando mais de 2000 hospedeiros (KHALIL, 2013) e possivelmente o fitonematoide mais importantes do mundo (TRUDGILL; BLOK, 2001). No Brasil, as espécies *Meloidogyne javanica* (Treb) Chitwood e *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood são encontradas parasitando tomateiros (ROSA; WESTERICH; WILCKEN, 2014).

O manejo dos nematoides é difícil e demanda da integração de diversos métodos de controle. O controle químico é frequentemente utilizado no controle de nematoides, mas atualmente há poucos nematicidas disponíveis no mercado brasileiro. Além disso, no Estado do Paraná, a grade de agrotóxicos disponíveis para o controle desses patógenos é mais restrita do que para outros estados do Brasil. Atualmente, para o controle de *Meloidogyne* spp. em tomateiros é permitido o uso de Fluensulfone, Metam-sódio, Abamectina e extrato de alho (MAPA, 2021; SEAB-PR, 2021). A escassez de produtos químicos e a necessidade de reduzir a aplicação de agrotóxicos devido a toxicidade vem favorecendo o desenvolvimento do mercado de produtos biológicos e alternativos para o controle de nematoides.

Os nematicidas alternativos obtidos de plantas e microrganismos são menos agressivos ao meio ambiente e a saúde humana (OKA, 2010). Toxinas produzidas por diversas espécies de plantas possuem efeito sobre *Meloidogyne*. O Nim (*Azadirachta indica* A. Juss) produz metabólitos secundários utilizados para o controle de pragas, e se destaca pela azadiractina (AERTS; MORDUE, 1997; COLLANGE et al., 2011; KHALIL, 2013; OKA, 2010). Essa substância está presente em abundância no óleo extraído das sementes, e possui efeito inseticida (AERTS; MORDUE, 1997; AKHTAR, 2000).

A popularização do óleo de Nim favoreceu o surgimento de cultivos comerciais de Nim para produção de óleo. Na prensagem a frio das sementes, restam os subprodutos como a torta de Nim. A aplicação de torta de Nim no solo tem potencial para o controle de nematoides (JAVED et al., 2007, 2008a; JAVED; ABDULLAH; FAYYAZ, 2007; OKA, 2010). Além disso, o manejo comercial das árvores também produz outro subproduto, que são as folhas e os

ramos resultante das podas. As folhas e as sementes de plantas de Nim contêm uma série de triterpenóides como a nimbina e a salannina (JARVIS et al., 1998; SCHAAF et al., 2000). Outros compostos voláteis como álcoois e ésteres (BARROS et al., 2014), e compostos não voláteis como o nimbaneno, 6-desacetilnimbineno, nimban-diol, nimbolida, ácido ascórbico, n-hexacosanol, 7-desacetil-7-benzoilazadiradiona, 7-desacetil-7-benzoilunotina, 17-hidroxiiazadiradiona e nimbiol também são encontrados nas plantas de Nim (HOSSAIN et al., 2013).

Na tentativa de utilizar o potencial desses compostos presentes nos subprodutos da produção de óleo de Nim (folhas e ramos) e comercializá-los, algumas empresas desenvolveram novos produtos. Deste modo, surge um novo mercado e novas alternativas para o controle de nematoides. Com base no exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar a utilização de dois produtos comerciais a base de Nim, o OpeNeem Flex e OpeNeem Plus para o controle de *M. javanica* em plantas de tomateiro.

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.2.1 Formulados de Nim

Os produtos formulados OpeNeem Flex e OpeNeem Plus foram cedidos pela empresa OpeNeem For Life S.A. (São Paulo). As plantas de Nim utilizadas na produção dos formulados foram cultivadas na Fazenda da OpeNeem no município de São João de Pirabas no estado do Pará. O formulado OpeNeem Flex é produzido utilizando o extrato hidro-alcoólico de folhas e ramos de Nim. O formulado OpeNeem Plus possui em sua constituição 90% de extrato hidro-alcoólico de folhas e ramos de Nim, acrescido de 5% de óleo de laranja (D'Limoneno) e 5% de adjuvantes.

### 4.2.2 Obtenção do inóculo de *Meloidogyne javanica*

A população de *M. javanica* foi obtida de raízes de tomate cultivadas na Fazenda Canguiri, pertencente à Universidade Federal do Paraná, localizada no município de Pinhais, Paraná. A identificação das espécies foi realizada utilizando o padrão perineal de fêmeas adultas (TAYLOR; SASSER, 1978) e pela técnica de eletroforese de isoenzimas (CARNEIRO; ALMEIDA, 2001; CARNEIRO; ALMEIDA; QUÉNÉHERVÉ, 2000). Os nematoides foram multiplicados em tomateiros do cultivar Santa Clara mantidos em casa de vegetação (temperatura ambiente de 8 a 36° C) e em câmara de cultivo com temperatura de  $28 \pm 3^\circ \text{C}$  e umidade relativa de  $80 \pm 20\%$  (InstalaFrio, Curitiba). Os nematoides utilizados como inóculo

foram extraídos pela metodologia de flotação centrífuga em sacarose com caulim (COOLEN; D'HERDE, 1972). As raízes foram trituradas em liquidificador com água por 15 segundos. A suspensão de raízes e nematoides foi separada por um conjunto de peneiras de 60 e 500 Mesh, nesta ordem. A suspensão retida na peneira 500 Mesh foi centrifugada a 530 g (Eppendorff, Hamburgo, Germany) por 4 minutos. O sobrenadante foi descartado e a massa compacta de raízes, caulim e nematoides foi ressuspensionado com solução de sacarose (453,6 g de açúcar refinado e água até completar 1 L) e centrifugada novamente a 530 g por 1 min. A suspensão de sacarose contendo os nematoides foi vertida sobre um conjunto de peneiras de 60, 200 e 500 Mesh, respectivamente, e lavada em água corrente. A suspensão retida na peneira de 500 Mesh era principalmente ovos com eventuais J<sub>2</sub>, sendo utilizada nos experimentos de eclosão. A suspensão de ovos foi submetida a uma câmara de eclosão aerada para obtenção de J<sub>2</sub>'s com 24 a 48 h de vida (HAHN et al., 2019). Os J<sub>2</sub>'s obtidos foram utilizados nos experimentos de mortalidade e penetração nas raízes de tomateiros.

#### 4.2.3 Experimentos *in vitro* de eclosão e mortalidade de J<sub>2</sub>

Buscando identificar concentrações com efeito nematicida, os formulados OpeNeem Flex e OpeNeem Plus foram analisados em testes *in vitro* para estimar a concentração efetiva de 50% de controle (CE<sub>50</sub>) de eclosão (testes de eclosão) e mortalidade de J<sub>2</sub>'s (teste de mortalidade) de *M. javanica*. Quatro experimentos foram conduzidos, sendo dois experimentos para os testes de eclosão (um para cada produto) e dois experimentos para os testes de mortalidade (um para cada produto), seguindo o delineamento de blocos casualizados com 7 concentrações e três repetições. Para os testes de eclosão, as concentrações dos formulados OpeNeem Flex e OpeNeem Plus utilizados nos experimentos foram de 0,0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 e 0,75% (v v<sup>-1</sup>). Nos experimentos de mortalidade, as concentrações utilizadas foram de 0,0; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0; 15,0 e 20,0% (v v<sup>-1</sup>). Os experimentos foram realizados em placas de ELISA de 96 poços com fundo chato, sendo cada repetição 1 poço. Em cada poço da placa foi depositado 20 µL de suspensão de nematoides (cerca de 200 ovos nos experimentos de eclosão ou 50 J<sub>2</sub>'s nos experimentos de mortalidade), 80 µL de sulfato de estreptomicina (0,5 mL L<sup>-1</sup>, Dinâmica, Indaiatuba) com polisorbato 20 (0,5 mL L<sup>-1</sup> - Tween 20®, Vetec, Rio de Janeiro) e 100 µL do tratamento com os formulados diluídos em diferentes concentrações. Os poços das placas foram fechados com filme plástico adesivo (Politac, Polifix, Terra Preta) e incubadas no escuro a 28±2 °C.

A eclosão dos J<sub>2</sub>'s de *M. javanica* foi avaliada em um microscópio de luz com ampliação de 40x (Zeiss) após 16 dias de incubação. Os J<sub>2</sub>'s eclodidos e os ovos restantes foram

quantificados e a taxa de eclosão foi calculada pela Eq. 1. Os experimentos de mortalidade foram avaliados após 48 horas de incubação. Em cada amostra do teste de mortalidade foram adicionados 20  $\mu\text{L}$  de solução de NaOH (1 N). Após 1 minuto, a contagem dos J<sub>2</sub>'s mortos foi realizada no microscópio de luz com ampliação de 40x (Zeiss). Os J<sub>2</sub>'s que permaneceram retilíneos após a adição de NaOH foram considerados mortos (CHEN; DICKSON, 2000; HARADA; YOSHIGA, 2015). As taxas de mortalidade foram calculadas pela Eq. 2. Os experimentos foram repetidos uma vez.

**Eq. 1**

$$\text{Eclosão (\%)} = \frac{\text{número de J}_2\text{'s eclodidos}}{\text{número de J}_2\text{'s eclodidos} + \text{ovos restantes}} \times 100$$

**Eq. 2**

$$\text{Mortalidade (\%)} = 100 - \left( \frac{\text{número de J}_2\text{'s mortos}}{\text{número de J}_2\text{'s vivos} + \text{número de J}_2\text{'s mortos}} \times 100 \right)$$

4.2.4 Experimento de penetração e desenvolvimento de J<sub>2</sub> nas raízes de tomateiros

Para identificar as concentrações com efeito sobre a penetração de J<sub>2</sub>'s de *M. javanica* nas raízes de tomateiros, mas que não causassem danos graves às plantas, foram realizados dois experimentos, um com o formulado OpeNeem Flex e outro com o OpeNeem Plus. Cada experimento foi conduzido em delineamento de blocos casualizados com 5 concentrações e três repetições. Os experimentos de penetração de J<sub>2</sub>'s de *M. javanica* nas raízes de tomateiro foram realizados em tubetes de mudas com 150 mL de capacidade. Para os testes de penetração foram utilizadas as concentrações de 0,00; 0,25; 0,75; 1,50 e 3,00% (v v<sup>-1</sup> de substrato). Um experimento prévio mergulhando mudas de tomateiro com raízes nuas em diferentes concentrações dos formulados diluídos em água e incubados por 24 h indicavam a ocorrência de lesões nas concentrações superiores à 3.00% dos formulados.

O substrato utilizado para a realização dos experimentos foi composto de LATOSSOLO VERMELHO (EMBRAPA, 2018) e areia (1:1 v v<sup>-1</sup>). A fertilidade foi corrigida acrescentando 5,21 g dm<sup>-3</sup> de calcário dolomítico, 0,17 g dm<sup>-3</sup> de ureia, 0,35 g dm<sup>-3</sup> de KCl e 2,78 g dm<sup>-3</sup> de Super Fosfato Simples. O substrato foi autoclavado a 120° C por 1 hora. As diferentes concentrações foram obtidas pela diluição dos produtos (0; 375; 1125; 2250 e 4500  $\mu\text{l}$  de produto comercial) em água, totalizando 25 ml de calda aplicados com um Becker sobre a superfície do substrato de cada tubete. Em seguida foi transplanta uma muda de tomateiro 'Santa Clara' com 30 dias após a emergência, cultivada em bandeja de polietileno de 128 células

(Nutriplan, Cascavel) contendo substrato comercial (MecPlant, Telêmaco Borba). Após o transplante das mudas, uma cavidade de 3 cm de profundidade foi aberta com microtubo de 2.0 mL ao lado do colo da planta. Na cavidade foi depositado 100 µL de suspensão contendo cerca de 100 J<sub>2</sub>'s de *M. javanica* (População inicial, PI). Os tubetes foram colocados dentro de copos de poliestireno (tipo sundae, Copaza, Içara) e encaixados em grades de sustentação. As mudas foram mantidas em câmara de crescimento a 25±3 °C, UR de 80±20% e fotoperíodo de 12 horas de luz. As regas foram realizadas pelo copo de acordo com a necessidade.

As plantas foram avaliadas aos 30 dias após a inoculação. Inicialmente foi determinada a altura das plantas e o peso de massa seca da parte aérea por meio de uma estufa de ventilação forçada a 60° C por 72 h. O sistema radicular foi utilizado para a extração dos nematoides pelo método de flotação centrífuga em sacarose com caulim (COOLEN; D'HERDE, 1972). As raízes trituradas após a extração de nematoides retidas na peneira de 60 Mesh foram coletadas e secas para determinação da massa seca total da planta. A população final (PF) foi estimada pelo número de nematoides presentes nas raízes. O fator de reprodução (Eq. 3) foi calculado pela divisão da PF pela PI de nematoides (OOSTENBRINK, 1966). Devido a morte das plantas na concentração de 3.00%, os experimentos foram repetidos com concentrações intermediárias de 0.0; 0.5; 1.0; 2.0 e 2.5% (v v<sup>-1</sup> de substrato).

### Eq. 3

$$\text{Fator de reprodução (FR)} = \frac{\text{População Final (FP)}}{\text{População inicial (IP)}}$$

#### 4.2.5 Experimento de desenvolvimento de reprodução de *Meloidogyne javanica* em plantas de tomateiro

Ao constatar que a concentração de 1.0% dos formulados apresentou resultados satisfatórios nos testes de penetração, foi realizado um experimento para comparar os formulados com a abamectina e carbofurano. Um experimento foi conduzido seguindo o delineamento de blocos casualizados com 5 tratamentos e quatro repetições. Os experimentos foram realizados em vasos de alumínio contendo 2 L. Os tratamentos utilizados correspondiam aos formulados OpeNeem Flex e OpeNeem Plus (1.0% v v<sup>-1</sup> ou 20 ml por vaso), carbofurano (10 µl por vaso, furadan 350 SC, FMC), abamectina (2 µl por vaso, vertimec 18 EC, Syngenta) e controle (água).

O substrato utilizado nos experimentos foi preparado de acordo com a metodologia descrita no item 3.2.3. O substrato (regado 24 horas antes com água) foi pulverizado na superfície com 20 ml por vaso dos produtos OpeNeem Flex e OpeNeem Plus, e 20 ml por vaso de carbofuran (10 µl por vaso) e a abamectina (2 µl por vaso) diluídos em água. O controle recebeu a aplicação de 20 ml por vaso de água. Na sequência, um orifício de 3 cm de profundidade foi aberto com um tubo Falcon de 50 mL. No fundo do orifício foi depositado 1.0 ml de suspensão contendo cerca de 5000 ovos de *M. javanica*. Sobre a suspensão de nematoides foi transplantada uma muda de tomateiro do ‘Santa Clara’ com 30 dias após a emergência, cultivada em bandeja de polietileno de 128 células (Nutriplan, Cascavel) contendo substrato comercial (MecPlant, Telêmaco Borba). Após 90 dias da inoculação, as plantas foram avaliadas de acordo com a metodologia descrita no item 2.3. O experimento foi repetido uma vez.

#### 4.2.6 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com o software R (R CORE TEAM, 2021). As curvas de dose-resposta para eclosão e mortalidade dos J<sub>2</sub>'s de *M. javanica* foram ajustadas, e o modelo estatístico foi determinado pelo menor peso para o Critério de informação de Akaike (WAGENMAKERS; FARRELL, 2004) obtidos pela função *mselect()* do pacote ‘drc’ (RITZ; STREBIG, 2016). A análise de variância (ANOVA) foi aplicada aos dados para identificação e remoção de termos experimentais não significativos ( $P < 0.05$ ), exceto blocos. Os parâmetros do modelo de regressão e a CE<sub>50</sub> foram estimados utilizando as funções *drm()* e *ED()* do pacote ‘drc’.

Os dados dos experimentos de penetração de J<sub>2</sub>'s de *M. javanica* nas raízes de tomateiros foram transformados para  $\log_{10}(y)$  para satisfazer as pressuposições e o então o modelo de regressão linear. Os termos experimentais não significativos foram removidos pelo teste *f* de Fisher da ANOVA ( $P < 0.05$ ), exceto blocos. O efeito da concentração sobre a resposta foi testado pelo teste *t* de Student sobre os parâmetros do modelo de regressão utilizando o pacote ‘agricolae’ (MENDIBURU, 2021).

Os dados dos experimentos de reprodução de *M. javanica* foram transformados para  $\log_{10}(y)$  para satisfazer as pressuposições e o então o modelo de regressão linear. Os estudos dos termos experimentais significativos identificados pela ANOVA ( $P < 0.05$ ) foram realizados por meio de comparações múltiplas de médias usando o teste de Tukey utilizando o pacote ‘agricolae’ (MENDIBURU, 2021).

### 4.3 RESULTADOS

#### 4.3.1 Experimentos *in vitro* de eclosão e mortalidade de J<sub>2</sub>

Os experimentos *in vitro* apresentaram um efeito de dose-resposta para eclosão e mortalidade de *M. javanica*. As curvas de dose-respostas da eclosão dos ovos de *M. javanica* à imersão nos formulados OpeNeem Flex e OpeNeem Plus são apresentadas na forma de curvas sigmóides (Figura 4.1). O teste de Wald indicou que não há significância entre a repetição do experimento no tempo. Sendo assim, os dois experimentos foram analisados conjuntamente (n = 6). O modelo estatístico que apresentou o menor Critério de informação de Akaike (WAGENMAKERS; FARRELL, 2004) foi Weibull de três parâmetros (W2.3) para eclosão e Weibull de quatro parâmetros (W2.4) para mortalidade de J<sub>2</sub>'s de *M. javanica*. O critério de informação de Akaike indica que os dados apresentaram um ajuste satisfatório ao modelo estatístico, mesmo apresentando valores de coeficiente de determinação baixos (Tabela 4.1).

Tabela 4. 1 - Seleção de modelo por comparação de modelos diferentes usando os seguintes critérios: o valor de log de verossimilhança, o critério de informação de Akaike (AIC), o erro padrão residual estimado ou o valor p de um teste de falta de ajuste para um controle eficaz a 50% (CE<sub>50</sub>) de J<sub>2</sub>'s eclodidos (testículos de eclosão) e mortos (teste de mortalidade) de *Meloidogyne javanica*.

Modelo	LogLik	AIC	Lack of fit	Res var	R <sup>2</sup>
Eclosão de J <sub>2</sub> 's					
W2.3()	-314.998	643.997	0.991	113.999	0.690
LL.3()	-315.549	645.099	0.958	115.505	0.686
W2.4()	-314.964	647.929	0.957	116.905	0.690
LL.4()	-315.400	648.800	0.892	118.124	0.687
G.4()	-316.187	650.374	0.727	120.357	0.681
LL.5()	-314.869	651.738	0.852	119.792	0.691
J <sub>2</sub> 's Mortos					
W2.4()	-293.432	604.863	1.759E <sup>-02</sup>	70.013	0.712
LL.4()	-293.972	605.944	1.227E <sup>-02</sup>	70.919	0.940
G.4()	-294.391	606.781	9.252E <sup>-03</sup>	71.629	0.745
LL.5()	-294.442	610.884	2.052E <sup>-03</sup>	73.655	0.693
W2.3()	-341.081	696.161	1.137E <sup>-17</sup>	212.129	0.701
LL.3()	-341.274	696.548	9.722E <sup>-18</sup>	213.108	0.735

LogLik: O valor da probabilidade de LogLik; AIC: critério de informação de Akaike; Lack of fit: teste de significância de falta de ajuste; Res var: Variância residual; W2.3 (): modelo Weibull de três parâmetros; LL.3 (): modelo Log-Logístico de três parâmetros; W2.4 (): modelo Weibull de quatro parâmetros; LL.4 (): modelo Log-Logístico de quatro parâmetros G.4 (): modelo de Gompertz de quatro parâmetros; LL.5 (): modelo Log-Logístico de cinco parâmetros.

Os valores de  $CE_{50}$  para eclosão de *M. javanica* foram estimados na concentração de 0.44% para OpeNeem Flex e 0.40% para OpeNeem Plus. Nos testes de mortalidade, o modelo estatístico de Weibull de quatro parâmetros apresentou melhor ajuste, estimando a concentração de  $CE_{50}$  em 12.90% para OpeNeem Flex e 12.30% para o OpeNeem Plus (Figura 4.1). O intervalo de confiança para os valores estimados de  $CE_{50}$  indicam que não há diferença estatística entre os valores de  $CE_{50}$  estimados entre os produtos OpeNeem Flex e OpeNeem Plus para eclosão e mortalidade de  $J_2$ 's de *M. javanica*.

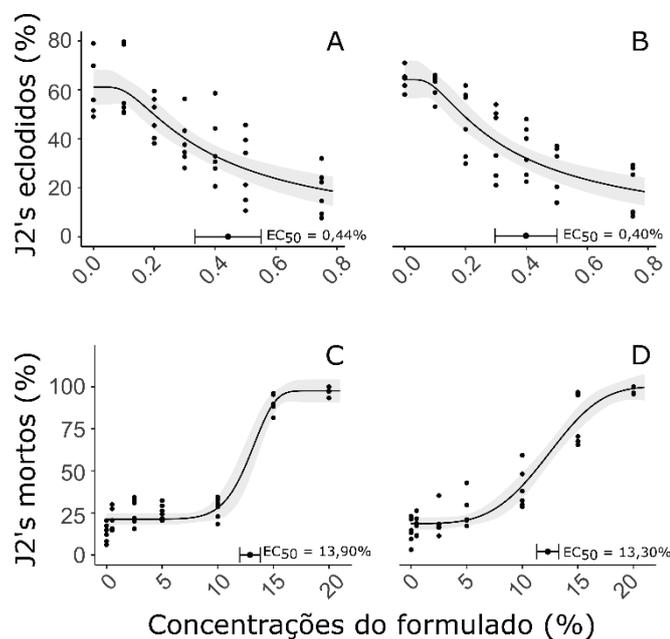


Figura 4.1 - Porcentagem de juvenis nascidos e mortos de *Meloidogyne javanica* ( $J_2$ 's) após 48 h de exposição a diferentes concentrações da formulação comercial de Nim (*Azadirachta indica*). Curva de Weibull com três parâmetros da exposição de incubação de  $J_2$ 's ao OpeNeem Flex, com estimativa de  $CE_{50}$  em 0,44% (A); Curva de três parâmetros de Weibull para a exposição de incubação de  $J_2$ 's ao OpeNeem Plus, com estimativa de  $CE_{50}$  em 0,40% (B); Curva de Weibull com quatro parâmetros para a exposição de mortalidade de  $J_2$  ao OpeNeem Flex, com estimativa de  $CE_{50}$  em 13,90% (C); Curva de Weibull com quatro parâmetros para a exposição de mortalidade de  $J_2$ 's ao OpeNeem Plus, com estimativa de  $CE_{50}$  em 13,30% (D). Bandas acinzentadas representam o intervalo de confiança (0,95%) da curva estimada. As barras representam o valor estimado de  $CE_{50}$  com intervalo de confiança (0,95%). Os pontos representam os dados ( $n = 6$ ) de dois experimentos, cada um realizado em três blocos.

#### 4.3.2 Experimento de penetração e desenvolvimento de $J_2$ nas raízes de tomateiros

O teste de Wald indicou que não há significância entre a repetição do experimento no tempo. Sendo assim, os dois experimentos foram analisados conjuntamente ( $n = 6$ ). As concentrações de 2.5 e 3.0% dos formulados foram retiradas das análises devido a morte das

plantas. O efeito de experimentos e dos produtos não foi significativo no modelo de regressão linear. O efeito das concentrações dos formulados OpeNeem Flex e OpeNeem Plus não apresentou valor significativo para o valor  $\beta$  da regressão linear para altura (0.164 e 0.152) e massa seca total de plantas (0.0190 e 0.0422), respectivamente (Figura 4.2). O fator de reprodução de *M. javanica* apresentou redução significativa com o aumento das concentrações dos formulados OpeNeem Flex e OpeNeem Plus. A redução do fator de reprodução de *M. javanica* foi de 81.71 e 94.73% nas concentrações de 1.0 e 2.0 de OpeNeem Flex, respectivamente. Para o OpeNeem Plus, a redução no fator de reprodução foi de 84.28 e 91.47% nas concentrações de 1.0 e 2.0% respectivamente. O valor  $\beta$  da regressão linear para o fator de reprodução foi de -0.684 para OpeNeem Flex e -0.583 para OpeNeem Plus.

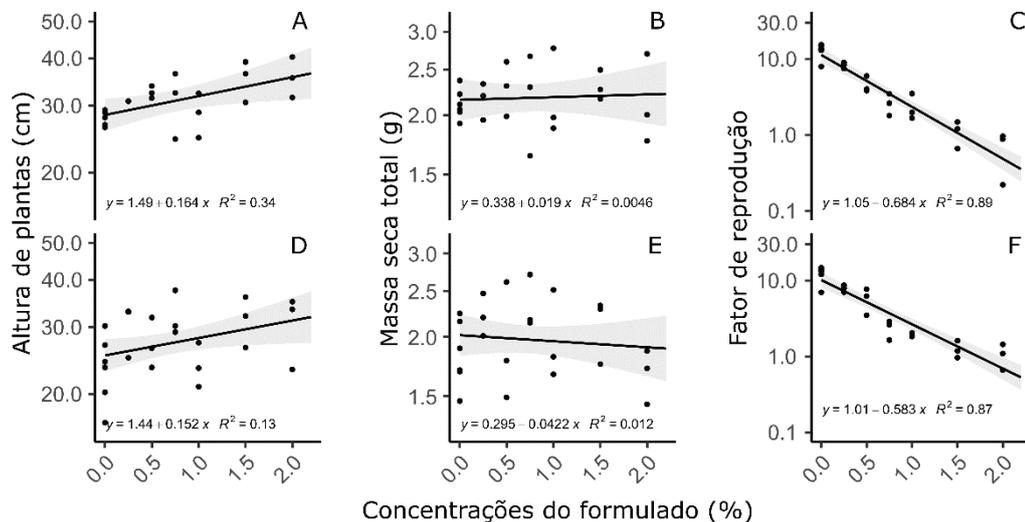


Figura 4.2 - Efeito das concentrações dos formulados OpeNeem Flex e OpeNeem Plus sobre a altura, massa seca de plantas e o fator de reprodução de *M. javanica* em plantas de tomateiros. Altura de plantas de tomateiros tratados com OpeNeem Flex (A) e OpeNeem Plus (D); Massa seca total de plantas de tomateiros tratados com OpeNeem Flex (B) e OpeNeem Plus (E); Fator de reprodução de *M. javanica* em plantas de tomateiro tratadas com OpeNeem Flex (C) e OpeNeem Plus (F). Bandas acinzentadas representam o intervalo de confiança (0.95%) da curva estimada. O eixo y é representado na escala de  $\log_{10}(y)$ . Os pontos representam os dados ( $n = 3$ ) de dois experimentos, cada um realizado em três blocos.

#### 4.3.3 Experimento de desenvolvimento de reprodução de *Meloidogyne javanica* em plantas de tomateiro

O teste de Wald indicou que não há significância entre a repetição do experimento no tempo. Sendo assim, os dois experimentos foram analisados conjuntamente ( $n = 6$ ). Os dados de altura e massa seca total das plantas de tomateiro infestados por *M. javanica* não apresentaram diferença estatística entre as concentrações dos formulados OpeNeem Flex e

OpeNeem Plus testados ( $P > 0.05$ ). No caso do FR, houve diferença significativa entre os formulados OpeNeem Flex e OpeNeem Plus ( $P < 0.05$ ). Os formulados OpeNeem Flex, OpeNeem Plus, abamectina e carbofurano resultaram na redução do FR de *M. javanica* em plantas de tomateiro (Figura 4.3). As concentrações de 1.00% dos formulados de Nim reduziu o fator de reprodução de *M. javanica* em 48.22% para OpeNeem Flex e 59.42% para OpeNeem Plus.

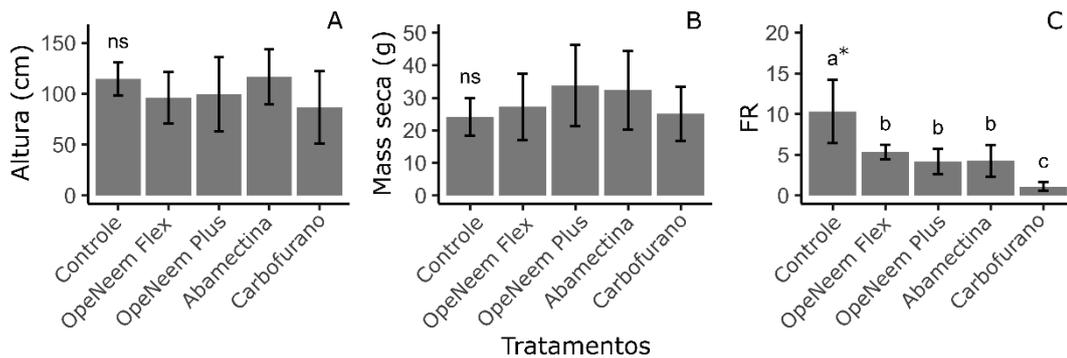


Figura 4.3 - Efeito dos tratamentos no comprimento do broto (A); massa seca total (B) e fator de reprodução (C). Os dados representam a média  $\pm$  desvio padrão ( $n = 8$ ) de dois experimentos, cada um realizado em quatro blocos. <sup>ns</sup>As médias não diferem estatisticamente pelo teste ANOVA ( $P \geq 0,05$ ). \* Médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente teste de Tukey. Médias seguidas de letras diferentes diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

#### 4.4 DISCUSSÃO

Os nematoides são um grupo de patógenos de plantas de importância mundial. O uso dos extratos vegetais é potencialmente aplicável para o manejo de nematoides. Dentre os nematicidas obtidos de extratos vegetais, os formulados de Nim possuem um potencial para ser explorado. Os produtos obtidos pelo extrato alcoólico da parte aérea das plantas de Nim, como o OpeNeem Flex e OpeNeem Plus, apresentam potencial de controle de *M. javanica* em plantas de tomateiro.

Os formulados de OpeNeem Flex e OpeNeem Plus inibiram a eclosão e causaram a mortalidade *in vitro* de  $J_2$ 's de *M. javanica*. As concentrações de 0.44 e 0.40% do OpeNeem Flex e OpeNeem Plus, respectivamente, foram capazes de inibir em 50% a eclosão de  $J_2$ 's de *M. javanica*. O extrato aquoso e o extrato alcoólico de folhas de Nim reduz a eclosão de *M. javanica* (JAVED et al., 2008b) e *M. incognita* (NILE et al., 2018) em condições *in vitro*. As concentrações de 13,9 e 13,3% do OpeNeem Flex e OpeNeem Plus, respectivamente, foram capazes de matar 50% dos  $J_2$ 's de *M. javanica*. Resultados semelhantes foram observados com o extrato aquoso de torta e folhas de Neem nas concentrações de 10%, no qual foi observado a

mortalidade de 35 e 26% dos J<sub>2</sub>'s de *M. javanica*, respectivamente (JAVED et al., 2008b). Considerando a proximidade dos valores de CE<sub>50</sub> entre os formulados, os resultados demonstram que para fins de manejo, a aplicação dos formulados de OpeNeem Flex e OpeNeem Plus está direcionada à redução da eclosão dos J<sub>2</sub>'s e não na mortalidade dos J<sub>2</sub>'s. Desta forma, a aplicação de concentrações de 0,44% de OpeNeem Flex e 0,40% de OpeNeem Plus, possivelmente apresentam resultados de viabilidade econômica superior à aplicação de 13,9% de OpeNeem Flex e 13,3% de OpeNeem Plus.

A penetração de J<sub>2</sub>'s nas raízes de tomateiro após 30 dias da inoculação e tratamento com os formulados OpeNeem Flex e OpeNeem Plus apresentaram redução no fator de reprodução de *M. javanica*, sem apresentar efeito significativo na altura e massa seca total das plantas de tomateiros. O extrato etílico da torta de Nim afeta a penetração de J<sub>2</sub>'s nas raízes de tomateiro após 21 dias da inoculação e tratamento, apresentando redução de nematoides no interior das raízes, sem ocorrer a redução da massa das plantas (JAVED et al., 2008a). Foi observado o surgimento de uma injúria no colo das plantas com evolução para o tombamento e morte das plantas de tomateiro com a aplicação de concentrações iguais ou superiores a 2.5% de ambos os formulados. A aplicação da concentração máxima de 2.0% suportada pelas plantas estimada nos testes de penetração, resultaria na redução de 94.73 e 91.47% do fator de reprodução pela aplicação do formulado OpeNeem Flex e OpeNeem Plus, respectivamente. Na concentração de 1.0%, a redução no fator de reprodução seria de 81.71 e 84.28%, para o OpeNeem Flex e OpeNeem Plus, respectivamente. Ou seja, dobrar a concentração do produto aplicado resultaria somente em uma redução de 13.02% para o OpeNeem Flex e de 7.19% para o OpeNeem Plus. Sendo assim, a aplicação da concentração de 2% dos produtos no solo possivelmente é inviável economicamente, e optamos por aplicar a concentração intermediária de 1% nos testes de reprodução de *M. javanica*.

Nos testes de reprodução de *M. javanica*, os formulados OpeNeem Flex e OpeNeem Plus aplicados na concentração de 1.0% reduziram o fator de reprodução de *M. javanica* em raízes de plantas de tomateiro. A redução do fator de reprodução obtido pela aplicação dos formulados de Nim foi semelhante ao controle obtido pela aplicação da Abamectina. Entretanto, há uma diferença entre a aplicabilidade dos produtos, pois foram necessários 20 mL por vaso dos formulados OpeNeem Flex ou OpeNeem Plus, comparados aos 2 µl por vaso de abamectina necessários para atingir um índice de controle semelhante. A necessidade da aplicação de altas quantidades de formulados já havia sido apontada pela necessidade de aplicação de mais de 500 L ha<sup>-1</sup> de extratos de Nim formulados para o controle de nematoides (OKA, 2010).

A redução dos nematoides propiciada pela aplicação de diferentes formulações de Nim é relatada em diversos trabalhos. A aplicação de folhas e da torta de Nim em pó (JAVED et al., 2007), na forma de extrato bruto (JAVED et al., 2008b), ou somente a torta (RIZVI et al., 2015) aplicada no solo reduz a infestação de *M. javanica* em plantas de tomateiro. A redução do fator de reprodução dos nematoides do gênero *Meloidogyne* é associada aos compostos de Nim com efeito nematostático. Um dos compostos mais conhecidos é a azadiractina (um triterpenóide da classe dos limonóides), que inibe o crescimento e o desenvolvimento de insetos, bloqueando a biossíntese dos hormônios do crescimento e impedindo a ecdise (MORDUE et al., 1998). O extrato aquoso de azadiractina purificada não inibiu a eclosão dos J<sub>2</sub>'s de *M. javanica* (JAVED et al., 2008b) e nem parou o desenvolvimento dos J<sub>2</sub>'s em plantas de tomateiro (JAVED et al., 2007), sugerindo que o composto não foi absorvido ou não é diretamente tóxico para causar a morte dos nematoides.

Outros triterpenóides como a nimbina e a salannina são reconhecidos por apresentarem efeito nematostático. Da mesma forma que a azadiractina, a nimbina e a salannina purificadas não causam a morte de J<sub>2</sub>'s de *M. incognita*. Entretanto, há redução da mobilidade dos nematoides, e conseqüentemente redução da penetração de J<sub>2</sub>'s nas raízes das plantas (MOJUMDER; KAMRA; DUREJA, 2002). A redução da mobilidade dos J<sub>2</sub>'s também demonstra importância durante o processo de eclosão dos J<sub>2</sub>'s dos ovos (JAVED et al., 2008b). A imobilização dos J<sub>2</sub>'s também ocorre por compostos voláteis existentes na planta de Nim, resultando na incapacidade dos J<sub>2</sub>'s em penetrar as raízes das plantas (BARROS et al., 2014).

Existem diversos fatores que devem ser considerados em relação a eficiência dos formulados aplicados no solo. Inicialmente, devemos considerar que em uma situação de campo haverá a rápida degradação dos compostos, pela decomposição dos formulados. O extrato bruto de folhas de Nim pode persistir no solo e inibir *M. javanica* por até 16 semanas (JAVED et al., 2007; JAVED; ABDULLAH; FAYYAZ, 2007). Entretanto, a água de irrigação dissolve os formulados constantemente e os lixivia em profundidade. Sendo assim, novos estudos propondo a aplicação de formulados de Nim em diferentes intervalos de aplicação e até mesmo por meio de fertirrigação precisam ser desenvolvidos para tornar o uso da tecnologia viável.

Os resultados indicam que os formulados de Nim OpeNeem Flex e OpeNeem Plus nas concentrações de 1,0% podem ser usadas no controle de *M. javanica* em plantas de tomateiros. Essa concentração é superior à concentração necessária para inibir a eclosão de 50% dos juvenis (0,4% de OpeNeem Flex e 0,44% de OpeNeem Plus), entretanto, não é suficiente para causar a morte de 50% dos juvenis (13,90% de OpeNeem Flex e 13,30% de OpeNeem Plus).

#### 4.5 DECLARAÇÃO DE CONTRIBUIÇÃO DE AUTORIA

**Marlon Henrique Hahn:** Conceitualização, Metodologia, Análise formal, Curadoria de dados, Redação - rascunho original, Visualização, Investigação. **Louise Larissa May De Mio:** Conceitualização, Recursos, Aquisição de financiamento, Redação - revisão e edição. **Sérgio Miguel Mazaro:** Conceitualização, Recursos, Aquisição de financiamento, Redação - revisão e edição. **Walmes Marques Zeviani:** Análise formal, Redação - revisão e edição. **Henrique da Silva Silveira Duarte:** Conceitualização, Recursos, Supervisão, Administração de projetos, Visualização, Aquisição de financiamento, Redação - revisão e edição.

#### 4.6 AGRADECIMENTOS

Este estudo foi parcialmente financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código Financeiro 001. Os autores LLMDM e HSSD agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) / Brasil por sua bolsa de pesquisa.

#### 4.7 REFERÊNCIAS

- AERTS, R. J.; MORDUE, A. J. Feeding deterrence and toxicity of neem triterpenoids. **Journal of Chemical Ecology**, v. 23, n. 9, p. 2117–2132, 1997.
- AKHTAR, M. Nematicidal potential of the neem tree *Azadirachta indica* (A. Juss). **Integrated Pest Management Reviews**, v. 5, n. 1, p. 57–66, 2000.
- BARROS, A. F.; CAMPOS, V. P.; DA SILVA, J. C. P.; PEDROSO, M. P.; MEDEIROS, F. H. V.; POZZA, E. A.; REALE, A. L. Nematicidal activity of volatile organic compounds emitted by *Brassica juncea*, *Azadirachta indica*, *Canavalia ensiformis*, *Mucuna pruriens* and *Cajanus cajan* against *Meloidogyne incognita*. **Applied Soil Ecology**, v. 80, p. 34–43, 2014.
- CARNEIRO, R. M. D. G.; ALMEIDA, M. R. A. Técnica de eletroforese usada no estudo de enzimas de nematóides de galhas para identificação de espécies. **Nematologia Brasileira**, v. 25, n. 1, p. 35–44, 2001.
- CARNEIRO, R. M. D. G.; ALMEIDA, M. R. A.; QUÉNÉHERVÉ, P. Enzyme phenotypes of *Meloidogyne* spp. populations. **Nematology**, v. 2, n. 6, p. 645–654, 2000.
- CHEN, S. Y.; DICKSON, D. W. A technique for determining live second-stage juveniles of *Heterodera glycines*. **Journal of nematology**, v. 32, n. 1, p. 117–121, 2000.
- COLLANGE, B.; NAVARRETE, M.; PEYRE, G.; MATEILLE, T.; TCHAMITCHIAN, M. Root-knot nematode (*Meloidogyne*) management in vegetable crop production: The challenge of an agronomic system analysis. **Crop Protection**, v. 30, n. 10, p. 1251–1262, 2011.

- COOLEN, W. A.; D'HERDE, C. J. **A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue**. Ghent: State Agriculture Research Centre, 1972.
- EMBRAPA. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. 5. ed. Brasília: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2018.
- FAO. **Crops**. 2021. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>>. Acesso em: 9 fev. 2021.
- HAHN, M. H.; MAY DE MIO, L. L.; KUHN, O. J.; DUARTE, H. da S. S. Nematophagous mushrooms can be an alternative to control *Meloidogyne javanica*. **Biological Control**, p. 104024, 2019.
- HARADA, Y.; YOSHIGA, T. Distinguishing between inactivated and dead second stage juveniles of *Meloidogyne incognita* using the NaOH method. **Nematological Research**, v. 45, n. 1, p. 51–55, 2015.
- HOSSAIN, M. A.; AL-TOUBI, W. A. S.; WELI, A. M.; AL-RIYAMI, Q. A.; AL-SABAHI, J. N. Identification and characterization of chemical compounds in different crude extracts from leaves of Omani neem. **Journal of Taibah University for Science**, v. 7, n. 4, p. 181–188, 2013.
- JARVIS, A. P.; JOHNSON, S.; MORGAN, E. D.; JARVIS, A. P.; JOHNSON, S.; MORGAN, E. D. Stability of the natural insecticide Azadirachtin in aqueous and organic solvents. **Pesticide Science**, v. 53, p. 217–222, 1998.
- JAVED, N.; ABDULLAH, K.; FAYYAZ, S. Systemic and persistent effect of neem (*Azadirachta indica*) formulations against root-knot nematodes, *Meloidogyne javanica* and their storage life. **Crop Protection**, v. 26, p. 911–916, 2007.
- JAVED, N.; ANWAR, S. A.; FYAZ, S.; KHAN, M. M.; ASHFAQ, M. Effects of Neem formulations applied as soil drenching on the development of *Meloidogyne javanica* root-knot nematode on roots of tomato. **Pakistan Journal of Botany**, v. 40, n. 2, p. 905–910, 2008. a.
- JAVED, N.; GOWEN, S. R.; EL-HASSAN, S. A.; INAM-UL-HAQ, M.; SHAHINA, F.; PEMBROKE, B. Efficacy of neem (*Azadirachta indica*) formulations on biology of root-knot nematodes (*Meloidogyne javanica*) on tomato. **Crop Protection**, v. 27, n. 1, p. 36–43, 2008. b.
- JAVED, N.; GOWEN, S. R.; INAM-UL-HAQ, M.; ANWAR, S. A. Protective and curative effect of neem (*Azadirachta indica*) formulations on the development of root-knot nematode *Meloidogyne javanica* in roots of tomato plants. **Crop Protection**, v. 26, n. 4, p. 530–534, 2007.
- KAŞKAVALCI, G.; ÖNCÜER, C. Investigations on the distribution and economic importance of *Meloidogyne* Goeldi, 1887 (Tylenchida: Meloidogynidae) species found in the major areas of hot climate vegetables in Aydın province. **Turkish Journal of Entomology**, v. 23, n. 2, p. 149–160, 1999.

- KHALIL, M. S. Abamectin and Azadirachtin as eco-friendly promising biorational tools in integrated nematodes management programs. **Journal of Plant Pathology & Microbiology**, v. 4, n. 4, p. 1000174, 2013.
- MAPA. **Agrofit - Sistema de agrotóxicos fitossanitários**. 2021. Disponível em: <[http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Acesso em: 28 fev. 2021.
- MENDIBURU, F. De. **Package ‘agricolae.’** 2021. Disponível em: <<https://cran.r-project.org/web/packages/agricolae/agricolae.pdf>>. Acesso em: 7 jan. 2021.
- MOJUMDER, V.; KAMRA, A.; DUREJA, P. Effect of neem extracts on activity and mortality of second-stage juveniles of *Meloidogyne incognita*. **Nematologia Mediterranea**, v. 30, n. 1, p. 83–84, 2002.
- MORDUE, A. J.; SIMMONDS, M. S. J.; LEY, S. V.; BLANEY, W. M.; MORDUE, W.; NASIRUDDIN, M.; NISBET, A. J. Actions of azadirachtin, a plant allelochemical, against insects. **Pesticide Science**, v. 54, n. 3, p. 277–284, 1998.
- NILE, A. S.; NILE, S. H.; KEUM, Y. S.; KIM, D. H.; VENKIDASAMY, B.; RAMALINGAM, S. Nematicidal potential and specific enzyme activity enhancement potential of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) aerial parts. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 5, p. 4204–4213, 2018.
- OKA, Y. Mechanisms of nematode suppression by organic soil amendments - A review. **Applied Soil Ecology**, v. 44, n. 2, p. 101–115, 2010.
- OOSTENBRINK, M. Major characteristics of the relation between nematodes and plants. **Mededelingen Landbouw**, v. 66, n. 4, p. 1–46, 1966.
- R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing, R Foundation for Statistical Computing**, 2021. Disponível em: <<https://cran.r-project.org/>>
- RITZ, C.; STREBIG, J. C. **Package “drc.”** 2016. Disponível em: <<https://cran.r-project.org/web/packages/drc/drc.pdf>>.
- RIZVI, R.; SINGH, G.; SAFIUDDIN; ANSARI, R. A.; TIYAGI, S. A.; MAHMOOD, I. Sustainable management of root-knot disease of tomato by neem cake and *Glomus fasciculatum*. **Cogent Food & Agriculture**, v. 1, n. 1, p. 1008859, 2015.
- ROSA, J. M. O.; WESTERICH, J. N.; WILCKEN, S. R. S. Reação de genótipos e híbridos de tomateiro à *Meloidogyne enterolobii*. **Ciência Rural**, v. 44, n. 7, p. 1166–1171, 2014.
- SCHAAF, O.; JARVIS, A. P.; ESCH, S. A. Van der; GIAGNACOVO, G.; OLDHAM, N. J. Rapid and sensitive analysis of azadirachtin and related triterpenoids from Neem (*Azadirachta indica*) by high-performance liquid chromatography – atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 886, p. 89–97, 2000.
- SEAB-PR. **Agrotóxicos do Paraná**. 2021. Disponível em: <<http://celepar07web.pr.gov.br/agrotoxicos/pesquisar.asp>>. Acesso em: 1 mar. 2021.

- TAYLOR, A.; SASSER, J. **Biology, Identification and Control of Root-knot Nematodes (*Meloidogyne* species)** Raleigh. 1. ed. Raleigh: Department of Plant Pathology, North Carolina State University, United States Agency for International Development, 1978.
- TRUDGILL, D. L.; BLOK, V. C. Apomictic, polyphagous root-knot nematodes: Exceptionally successful and damaging biotrophic root pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v. 39, n. 1, p. 53–77, 2001.
- WAGENMAKERS, E.-J.; FARRELL, S. AIC model selection using Akaike weights. **Psychonomic Bulletin & Review**, v. 11, n. 1, p. 192–196, 2004.

## 5 CONCLUSÕES GERAIS

A produção de mudas de tomateiro em substrato de cogumelo afetou a emergência, altura e massa seca total das mudas. Mudas de tomate cultivadas em substrato 100% cogumelo não apresentaram potencial para controlar *M. javanica*. A incorporação do substrato cogumelo ao solo afetou a altura e a massa seca total dos tomateiros infestados com *M. javanica*. No entanto, a incorporação do substrato de cogumelo no substrato de cultivo de tomate em concentrações  $\geq 12,5\%$  para os isolados LEMID-Led02, LEMID-Mti01 e LEMID-Per01 e  $\geq 25\%$  para o isolado LEMID-Led01 reduziu o fator de reprodução do nematoide. Portanto, esta medida de controle torna-se uma ferramenta útil a ser incorporada no manejo integrado do nematoide *M. javanica*.

A utilização do substrato de cogumelos das espécies de *L. edodes* e *P. eryngii* incorporados ao solo não interferiram no acúmulo de proteínas, na atividade da fenilalanina-amonioliase e no teor de fenóis totais nas raízes e na parte aérea de plantas de tomateiro. Entretanto, os tratamentos afetaram a atividade das enzimas  $\beta$ -1,3-Glucanase e quitinase, indicando que os cogumelos podem causar alterações bioquímicas nas plantas de tomateiro, induzindo a produção de proteínas relacionadas a resistência das plantas. Esses resultados indicam um efeito dos cogumelos sobre o aumento a atividade da via metabólica das proteínas de resistência em detrimento a via metabólica dos fenilpropanoides.

Os valores estimados de concentração efetiva de 50% de controle ( $CE_{50}$ ) de eclosão de  $J_2$ 's foram de 0,44 e 0,40%, e para a mortalidade dos  $J_2$ 's foram estimadas em 13,9 e 19,3%, respectivamente para OpeNeem Flex para OpeNeem Plus. As aplicações dos formulados OpeNeem Flex e OpeNeem Plus sobre plantas de tomateiros infestados com  $J_2$ 's de *M. javanica* não apresentou efeitos significativos sobre a altura e massa seca das plantas de tomateiros, mas resultou na redução significativa do fator de reprodução de *M. javanica*. As concentrações de 1,00% dos formulados de Nim reduziu o fator de reprodução de *M. javanica* em 48,2% para OpeNeem Flex e 59,4% para OpeNeem Plus, controle semelhante ao obtido com a Abamectina (58,8%). Este estudo indica que a aplicação de formulados obtidos de subprodutos da produção de óleo de Nim possuem potencial de controle de *M. javanica* em plantas de tomateiro.

## 6 REFERÊNCIAS GERAIS

- AKHTAR, M. Nematicidal potential of the neem tree *Azadirachta indica* (A. Juss). **Integrated Pest Management Reviews**, v. 5, n. 1, p. 57–66, 2000.
- ASLAM, S. Organic management of root knot nematodes in tomato with spent mushroom compost. **Sarhad Journal of Agriculture**, v. 29, n. 1, p. 63–69, 2013.
- BALDIN, E. L. L.; WILCKEN, S. R. S.; PANNUTI, L. E. da R.; SCHLICK-SOUZA, E. C.; VANZEI, F. P. Use of botanical extracts, cassava wastewater and nematicide for the control of root-knot nematode on carrot. **Summa Phytopathologica**, v. 38, n. 1, p. 36–41, 2012.
- BARKER, K. R.; KOENNING, S. R. Developing sustainable systems for nematode management. **Annual Review of Phytopathology**, v. 36, n. 1, p. 165–205, 1998.
- BARRON, G. L.; THORN, R. G. Destruction of nematode by species of *Pleurotus*. **Canadian Journal of Botany**, v. 65, n. 4, p. 774–778, 1987.
- BRIDGE, J. Nematode management in sustainable and subsistence agriculture. **Annual review of phytopathology**, v. 34, n. 94, p. 201–225, 1996.
- CHITWOOD, D. J. Phytochemical Based Strategies for Nematode Control. **Annual Review of Phytopathology**, v. 40, n. 1, p. 221–249, 2002.
- COLLANGE, B.; NAVARRETE, M.; PEYRE, G.; MATEILLE, T.; TCHAMITCHIAN, M. Root-knot nematode (*Meloidogyne*) management in vegetable crop production: The challenge of an agronomic system analysis. **Crop Protection**, v. 30, n. 10, p. 1251–1262, 2011.
- COMANS-PÉREZ, R.; AGUILAR-MARCELINO, L.; GIVES, P. M. De; SÁNCHEZ, J.; LÓPEZ-ARELLANO, M. In vitro lethal capability of ten strains of edible mushrooms against *Haemonchus contortus* against (nematoda) infective larvae. **8th International conference on Mushroom Biology and Mushroom Products (ICMBMP8) 2014**, p. 557–562, 2014.
- DEGENKOLB, T.; VILCINSKAS, A. Metabolites from nematophagous fungi and nematicidal natural products from fungi as alternatives for biological control. Part II: metabolites from nematophagous basidiomycetes and non-nematophagous fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 9, p. 3813–3824, 2016.
- DEVTRAN, Z.; SOGUT, M. A.; MUTLU, N. Response of tomato rootstocks with the Mi resistance gene to *Meloidogyne incognita* race 2 at different soil temperatures. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 49, n. 1, p. 11–17, 2010.
- DONG, J. Y.; LI, X. P.; LI, L.; LI, G. H.; LIU, Y. J.; ZHANG, K. Q. Preliminary results on nematicidal activity from culture filtrates of Basidiomycetes against the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* (Aphelenchoididae). **Annals of Microbiology**, v. 56, n. 2, p. 163–166, 2006.

- EAPEN, S. J.; BEENA, B.; RAMANA, K. V. Tropical soil microflora of spice-based cropping systems as potential antagonists of root-knot nematodes. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 88, n. 3, p. 218–225, 2005.
- FAO. **Crops**. 2021. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>>. Acesso em: 9 fev. 2021.
- FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa - UFV, 2000.
- FONTES, P. C. R.; SILVA, D. J. H. Cultura do tomate. In: FONTES, P. C. R.; NICK, C. (Eds.). **Olericultura: teoria e prática**. 2. ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa - UFV, 2019. p. 611–631.
- HAHN, M. H.; MAY DE MIO, L. L.; KUHN, O. J.; DUARTE, H. da S. S. Nematophagous mushrooms can be an alternative to control *Meloidogyne javanica*. **Biological Control**, p. 104024, 2019. >
- HIBBETT, D. S.; THORN, R. G. Nematode-Trapping in *Pleurotus tuberregium*. **Mycologia**, v. 86, n. 5, p. 696, 1994.
- HOSSAIN, M. A.; AL-TOUBI, W. A. S.; WELI, A. M.; AL-RIYAMI, Q. A.; AL-SABAHI, J. N. Identification and characterization of chemical compounds in different crude extracts from leaves of Omani neem. **Journal of Taibah University for Science**, v. 7, n. 4, p. 181–188, 2013.
- HUGO, H. J.; MALAN, A. P. M. Occurrence and control of plant-parasitic nematodes in irrigation water – A Review. **South African Journal of Enology and Viticulture**, v. 31, n. 2, p. 169–180, 2016.
- HWANG, C.-F.; BHAKTA, A. V.; TRUESDELL, G. M.; PUDLO, W. M.; WILLIAMSON, V. M. Evidence for a role of the N terminus and leucine-rich repeat region of the Mi gene product in regulation of localized cell death. **The Plant Cell**, v. 12, n. 8, p. 1319–1329, 2000.
- ISHIZAKI, T.; NOMURA, N.; WATANABE, K. Screening of mushrooms for nematophagous activity against the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. **Nematological Research**, v. 45, n. 1, p. 19–25, 2015.
- JABLONSKA, B.; AMMIRAJU, J. S. S.; BHATTARAI, K. K.; MANTELIN, S.; DE ILARDUYA, O. M.; ROBERTS, P. A.; KALOSHIAN, I. The Mi - 9 Gene from *Solanum arcanum* conferring heat-stable resistance to root-knot nematodes as a homolog of Mi-1. **Plant Physiology**, v. 143, n. 2, p. 1044–1054, 2007.
- JARVIS, A. P.; JOHNSON, S.; MORGAN, E. D. Stability of the natural insecticide azadirachtin in aqueous and organic solvents. **Pesticide Science**, v. 53, n. 3, p. 217–222, 1998.
- JAVED, N.; ANWAR, S. A.; FYAZ, S.; KHAN, M. M.; ASHFAQ, M. Effects of Neem formulations applied as soil drenching on the development of *Meloidogyne javanica* root-knot nematode on roots of tomato. **Pakistan Journal of Botany**, v. 40, n. 2, p. 905–910, 2008.

- KAŞKAVALCI, G.; ÖNCÜER, C. Investigations on the distribution and economic importance of *Meloidogyne* Goeldi, 1887 (Tylenchida: Meloidogynidae) species found in the major areas of hot climate vegetables in Aydın province. **Turkish Journal of Entomology**, v. 23, n. 2, p. 149–160, 1999.
- KHALIL, M. S. Abamectin and Azadirachtin as eco-friendly promising biorational tools in integrated nematodes management programs. **Journal of Plant Pathology & Microbiology**, v. 4, n. 4, p. 1000174, 2013.
- KWAK, A. M.; MIN, K. J.; LEE, S. Y.; KANG, H. W. Water extract from spent mushroom substrate of *Hericium erinaceus* suppresses bacterial wilt disease of tomato. **Mycobiology**, v. 43, n. 3, p. 311–318, 2015.
- KWOK, O. C. H.; PLATTNER, R.; WEISLEDER, D.; WICKLOW, D. T. A nematocidal toxin from *Pleurotus ostreatus* NRRL 3526. **Journal of Chemical Ecology**, v. 18, n. 2, p. 127–136, 1992.
- LI, G.; ZHANG, K.; XU, J.; DONG, J.; LIU, Y. Nematicidal substances from fungi. **Recent Patents on Biotechnology**, v. 1, n. 3, p. 212–233, 2007.
- LIU, X.; XIANG, M.; CHE, Y. The living strategy of nematophagous fungi. **Mycoscience**, v. 50, n. 1, p. 20–25, 2009.
- LUO, H.; LI, X.; LI, G.; PAN, Y.; ZHANG, K. Acanthocytes of *Stropharia rugosoannulata* function as a nematode-attacking device. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 4, p. 2982–2987, 2006.
- LUO, H.; LIU, Y.; FANG, L.; LI, X.; TANG, N.; ZHANG, K. *Coprinus comatus* damages nematode cuticles mechanically with spiny balls and produces potent toxins to immobilize nematodes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 12, p. 3916–3923, 2007.
- LUO, H.; MO, M.; HUANG, X.; LI, X.; ZHANG, K. *Coprinus comatus*: A basidiomycete fungus forms novel spiny structures and infects nematode. **Mycologia**, v. 96, n. 6, p. 1218–1224, 2004.
- MAPA. **Agrofit - Sistema de agrotóxicos fitossanitários**. 2021. Disponível em: <[http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Acesso em: 28 fev. 2021.
- MUKHTAR, T.; PERVAZ, I. *In vitro* evaluation of ovicidal and larvicidal effects of culture filtrate of *Verticillium chlamydosporium* against *Meloidogyne javanica*. **International Journal of Agriculture & Biology**, v. 5, n. 4, p. 576–579, 2003.
- OKA, Y. Mechanisms of nematode suppression by organic soil amendments - A review. **Applied Soil Ecology**, v. 44, n. 2, p. 101–115, 2010.
- OKORIE, C. C.; ONONUJU, C. C.; OKWUJIAKO, I. A. Management of *Meloidogyne incognita* with *Pleurotus ostreatus* and *P. tuberregium* in Soybean. **International Journal of Agriculture & Biology**, v. 13, n. 3, p. 401–405, 2011.

- PARADA, R. Y.; MURAKAMI, S.; SHIMOMURA, N.; EGUSA, M.; OTANI, H. Autoclaved spent substrate of hatakeshimeji mushroom (*Lyophyllum decastes* Sing.) and its water extract protect cucumber from anthracnose. **Crop Protection**, v. 30, n. 4, p. 443–450, 2011.
- PARADA, R. Y.; MURAKAMI, S.; SHIMOMURA, N.; OTANI, H. Suppression of fungal and bacterial diseases of cucumber plants by using the spent mushroom substrate of *Lyophyllum decastes* and *Pleurotus eryngii*. **Journal of Phytopathology**, v. 160, p. 390–396, 2012.
- PINEDA-ALEGRÍA, J. A.; SÁNCHEZ, J. E.; VENTURA-ZAPATA, E.; GONZÁLEZ-CORTAZAR, M.; AGUILAR-MARCELINO, L. Nematicidal effect of Shiitake (*Lentinula edodes*) extracts against *Haemonchus contortus*. **Journal of Medicinal Food**, v. 11, p. jmf.2020.0168, 2021.
- QUEZADO-DUVAL, A. M.; INOUE-NAGATA, A. K.; REIS, A.; PINHEIRO, J. B.; LOPES, C. A.; ARAÚJO, E. R.; FONTENELLE, M. R.; COSTA, J. R.; GUIMARÃES, C. M. N.; ROSSATO, M.; BECKER, W. F.; COSTA, H.; FERREIRA, M. A. S. V.; DESTÉFANO, S. A. L. **Levantamento de doenças e mosca-branca em tomateiro em regiões produtoras no Brasil**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento: Brasília.
- ROSA, J. M. O.; WESTERICH, J. N.; WILCKEN, S. R. S. Reação de genótipos e híbridos de tomateiro à *Meloidogyne enterolobii*. **Ciência Rural**, v. 44, n. 7, p. 1166–1171, 2014.
- SASSER, J. N.; EISENBACK, J. D.; CARTER, C. C.; TRIANTAPHYLLOU, A. C. The international *Meloidogyne* project-its goals and accomplishments. **Annual Review of Phytopathology**, v. 21, n. 1, p. 271–288, 1983.
- SEAB/ DERAL. **Prognóstico Olericultura - Novembro de 2020**. Curitiba. Disponível em: <[https://www.agricultura.pr.gov.br/sites/default/arquivos\\_restritos/files/documento/2021-01/Olericultura\\_2021.pdf](https://www.agricultura.pr.gov.br/sites/default/arquivos_restritos/files/documento/2021-01/Olericultura_2021.pdf)>.
- SHAMALIE, B.; FONSEKA, R.; RAJAPAKSHA, R. Effect of *Trichoderma viride* and Carbofuran (Curator®) on management of root knot nematodes and growth parameters of Gotukola (*Centella asiatica* L.). **Tropical Agricultural Research**, v. 23, n. 1, p. 61, 2012.
- SILVA, R. V. Da; LIMA, B. V. De; PEIXOTO, F. R.; GONDIM, J. P. E.; MIRANDA, B. E. C. De. Supplanting resistance of the Mi gene by root-knot nematode in industrial tomato in the Cerrado in Goiás State of Brazil. **Ciência Rural**, v. 49, n. 9, 2019.
- SILVA, R. F.; PASCHOLATI, S. F.; BEDENDO, I. P. Induced resistance in tomato plants to *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis* by *Lentinula edodes* and *Agaricus subrufescens* (syn. *Agaricus brasiliensis*). **Journal of Plant Pathology**, v. 95, n. 2, p. 285–297, 2013.
- SOARES, F. E. de F.; SUFIATE, B. L.; DE QUEIROZ, J. H. Nematophagous fungi: Far beyond the endoparasite, predator and ovicidal groups. **Agriculture and Natural Resources**, v. 52, n. 1, p. 1–8, 2018.

- SOUZA, J. L. De; RESENDE, P. **Manual de horticultura orgânica**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa - UFV, 2003.
- STADLER, M.; MAYER, A.; ANKE, H.; STERNER, O. Fatty acids and other compounds with nematicidal activity from cultures of basidiomycetes. **Planta Medica**, v. 60, n. 02, p. 128–132, 1994.
- SUFIATE, B. L.; SOARES, F. E. de F.; MOREIRA, S. S.; GOUVEIA, A. de S.; MONTEIRO, T. S. A.; FREITAS, L. G. De; QUEIROZ, J. H. De. Nematicidal action of *Pleurotus eryngii* metabolites. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 12, n. November, p. 216–219, 2017.
- THORN, R. G.; BARRON, G. L. Carnivorous mushrooms. **Science**, v. 224, n. 4644, p. 76–78, 1984.
- TRUDGILL, D. L.; BLOK, V. C. Apomictic, polyphagous root-knot nematodes: Exceptionally successful and damaging biotrophic root pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v. 39, n. 1, p. 53–77, 2001.
- TZORTAKAKIS, E. A.; GOWEN, S. R. Occurrence of a resistance breaking pathotype of *Meloidogyne javanica* on tomatoes in Crete, Greece. **Fundamental and applied nematology**, v. 19, n. 3, p. 283–288, 1996.