

BRIZZA FERNANDES DOS SANTOS VARGAS

**UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS DA INDÚSTRIA DE CULTIVO DE COGUMELOS
COMESTÍVEIS COMO INDUTORES DE VIAS DE RESISTÊNCIA A NEMATÓIDES
EM PLANTAS DE SOJA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: José Humberto de Queiróz

Coorientador: Maximiller Dal-Bianco Lamas Costa

**VIÇOSA- MINAS GERAIS
2022**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa

T

V297u
2022
Vargas, Brizza Fernandes dos Santos, 1998-
Utilização de resíduos da indústria de cultivo de cogumelos
comestíveis como indutores de vias de resistência a nematoides
em plantas de soja / Brizza Fernandes dos Santos Vargas. –
Viçosa, MG, 2022.
1 dissertação eletrônica (64 f.): il.

Inclui apêndice.

Orientador: José Humberto de Queiróz.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, 2022.

Referências bibliográficas: f. 51-60.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.705>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Nematoda em plantas - Controle biológico.
2. Nematode-das-galhas. 3. Soja - Doenças e pragas - Controle
biológico. 4. Resíduos agrícolas. I. Queiróz, José Humberto de,
1958-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de Pós-Graduação
em Bioquímica Aplicada. III. Título.

CDD 22. ed. 632.6257

Bibliotecário(a) responsável: Alice Regina Pinto Pires CRB-6/2523

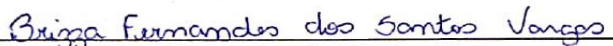
BRIZZA FERNANDES DOS SANTOS VARGAS

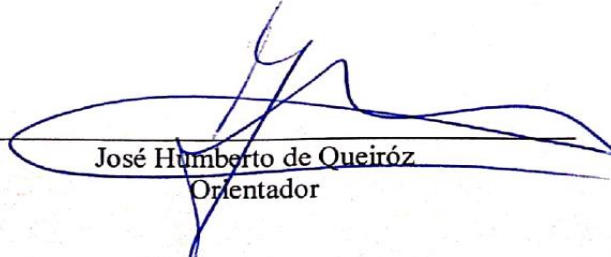
**UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS DA INDÚSTRIA DE CULTIVO DE COGUMELOS
COMESTÍVEIS COMO INDUTORES DE VIAS DE RESISTÊNCIA A NEMATÓIDES
EM PLANTAS DE SOJA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 29 de agosto de 2022.

Assentimento:


Brizza Fernandes dos Santos Vargas
Autora


José Humberto de Queiróz
Orientador

AGRADECIMENTOS

Aos membros da minha família pelo apoio e compreensão.

Ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica Aplicada por esta oportunidade.

Ao meu orientador Professor José Humberto pela confiança e apoio.

Ao professor Maximiller pelo acolhimento, paciência e grandes ensinamentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa de estudos.

À Universidade Federal de Viçosa por me permitir ensino de qualidade e realização de sonhos.

Ao Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) por toda estrutura fornecida.

Aos colegas do Laboratório de Metabolismo e Fermentação do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.

A todos meus companheiros do Laboratório de Genética Bioquímica de Plantas.

Aos membros da banca examinadora que disponibilizaram seu tempo e conhecimento.

À empresa Urakami pelo fornecimento dos resíduos fúngicos utilizados neste trabalho.

A todos que diretamente ou indiretamente auxiliaram nesta caminhada tornando o processo mais leve.

RESUMO

VARGAS, Brizza Fernandes dos Santos M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2022. **Utilização de resíduos da indústria de cultivo de cogumelos comestíveis como indutores de vias de resistência a nematoides em plantas de soja.** Orientador: José Humberto de Queiróz. Coorientador: Maximiller Dal-Bianco Lamas Costa.

A soja é uma importante cultura para a economia brasileira, que passou a ocupar, em 2020, a posição de maior produtor mundial do grão. Como a maioria das culturas, a soja também apresenta pragas que interferem na produção, na qualidade e no desenvolvimento. Entre os inimigos da soja se encontram os fitonematoides, vermes microscópicos, que retiram nutrientes das plantas, gerando deficiências nutricionais. Entre os fitonematoides estudados por parasitar a soja está o *Meloidogyne incognita*, conhecido como nematoide-das-galhas. Para manejar estas pragas é necessário a utilização de medidas de controle diversas, por exemplo, associação de resistência genética, rotação de culturas e controle biológico, por exemplo, utilizando fungos nematófagos. A inoculação dos fungos na soja pode induzir a plantas a apresentarem mecanismos de defesa contra possíveis patógenos, ativando ou reprimindo a expressão de determinados genes. Utilizando RT-qPCR analisamos de genes marcadores de fitormônios: JAR1 (Ácido jasmônico), ETR (Etileno), SAMT (Ácido salicílico), ATAF1 (Ácido abscísico); e também dois genes que antes foram associados a infecção por nematoides: HS1-PRO1 e CHS. Realizamos as análises de tratamentos com nematoides, resíduos fúngicos (*Pleurotus eryngii* e *Lentinula edodes*), e nematoides e resíduos fúngicos de forma concomitante, em plantas de soja da cultivar Desafio. A inoculação de *M. incognita* levou ao aumento da expressão dos genes marcadores de Ácido jasmônico e etileno, e redução da expressão do marcador de ácido abscísico. Verificou-se ainda aumento na expressão do gene CHS, enzima chave na biossíntese de flavonoides, com ação antimicrobiana. Os resíduos quando adicionados sem a presença do nematoide induziram genes presentes nas vias relacionadas aos hormônios vegetais, como Ácido salicílico, Ácido jasmônico e etileno. Em contrapartida, quando associados ao nematoide, prevalece a ativação da via de Ácido abscísico, utilizando *P. eryngii*, e Ácido salicílico no tratamento com *L.edodes*. A associação do resíduo de *L. edodes* e nematoides também levou ao aumento da expressão genica de HS1-PRO1, marcador de resistência em beterraba contra *Heterodera schachtii*. Os resíduos fúngicos além da ação nematicida já comprovada, aparentemente apresentam grande potencial como eliciadores de respostas de defesa na soja, induzindo a expressão de genes importantes das vias de hormônios vegetais.

Palavras-chave: Controle de fitonematoides. Nematóide-das-galhas. Resíduos agroindustriais.
Elicidores de resistência.

ABSTRACT

VARGAS, Brizza Fernandes dos Santos M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2022. **Use of edible mushroom industry residues as inducers of nematode resistance pathways in soybean plants.** Adviser: José Humberto de Queiróz. Co-adviser: Maximiller Dal-Bianco Lamas Costa.

Soybean is an important crop for the Brazilian economy, which in 2020 became the world's largest producer of grain. Like most crops, soybeans also have pests that interfere with production, quality, and development. Among the enemies of soybeans are phytonematodes, microscopic worms that remove nutrients from plants, generating nutritional deficiencies. Among the phytonematodes studied for parasitizing soybeans is *Meloidogyne incognita*, known as root-knot nematode. To manage these pests, it is necessary to use different control measures, for example, the association of genetic resistance, crop rotation, and biological control, for example, using nematophagous fungi. The inoculation of fungi in soybean can induce plants to present defense mechanisms against possible pathogens, activating or repressing the expression of certain genes. Using RT-qPCR, we analyzed phytohormone marker genes: JAR1 (Jasmonic acid), ETR (Ethylene), SAMT (Salicylic acid), ATAF1 (Abscisic acid); and also two genes that were previously associated with nematode infection: HS1-PRO1 and CHS. We performed analyzes of treatments with nematodes, fungal residues (*Pleurotus eryngii* and *Lentinula edodes*), and nematodes and fungal residues concomitantly in soybean plants of the Desafio cultivar. Inoculation of *M. incognita* led to increased expression of jasmonic acid and ethylene marker genes, and reduced expression of the abscisic acid marker. There was also an increase in the expression of the CHS gene, a key enzyme in the biosynthesis of flavonoids, with antimicrobial action. The residues when added without the presence of the nematode induced genes present in the pathways related to plant hormones, such as salicylic acid, jasmonic acid, and ethylene. On the other hand, when associated with the nematode, the activation of the abscisic acid pathway prevails, using *P. eryngii*, and salicylic acid in the treatment with *L.edodes*. The association of the *L. edodes* residue and nematodes also led to an increase in the gene expression of HS1-PRO1, a resistance marker in beet against *Heterodera schachtii*. Fungal residues, in addition to the already proven nematicide action, apparently have great potential as elicitors of defense responses in soybeans, inducing the expression of important genes in plant hormone pathways.

Keywords: Control of phytonematodes. Root-knot nematode. Agroindustrial residues.
Resistance Elicitors.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	9
2. REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1. Soja	11
2.2. Fitonematoides.....	12
2.3. <i>Meloidogyne spp.</i>	13
2.4. Controle de fitonematoides	15
2.5. Fungos nematófagos	17
2.6. <i>Pleurotus eryngii</i>	20
2.7. <i>Lentinula edodes</i>	22
2.8. Resistência vegetal a fitopatógenos	23
2.9. Fitormônios	25
3. OBJETIVO GERAL.....	28
3.1. Objetivos específicos	28
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
4.1. Obtenção dos resíduos de cogumelos comestíveis	29
4.2. Obtenção e preparo do inóculo de <i>Meloidogyne incognita</i>	29
4.3. Preparo do material vegetal	29
4.4. Planejamento experimental em casa de vegetação	29
4.5. Inoculação dos nematoides e resíduos fúngicos	30
4.6. Extração de RNA e síntese do cDNA	30
4.7. Genes para RTq-PCR.....	31
4.8. RTq-PCR	32
4.9. Análise dos dados	32
5. RESULTADOS	33
5.1. Expressão de ETR em plantas de soja	33
5.2. Expressão de JAR1 em plantas de soja.....	35
5.3. Expressão de ATAF1 em plantas de soja	37
5.4. Expressão de SAMT1 em plantas de soja.....	39
5.5. Expressão de CHS em plantas de soja	41
5.6. Expressão de Hs1pro-1 em plantas de soja.....	43
6. DISCUSSÃO	46
7. CONCLUSÃO.....	50

1. INTRODUÇÃO

No ano de 2020, o Brasil tornou-se o maior produtor mundial de soja, representando mais de um terço da produção total. Além de ser considerado o principal país exportador do grão, também é o segundo principal exportador de óleo e farelo (BALBINOT JUNIOR et al., 2022; USDA, 2022). Apesar de todo investimento e pesquisa, o cultivo de soja apresenta inúmeros fatores bióticos e abióticos que interferem na produtividade, dentre eles podemos citar as inúmeras doenças que acometem a soja. Os causadores de doenças incluem aqueles que atacam as folhas, vagens, grãos, plântulas, hastes, pecíolos e as raízes, como os fitonematoides. (HENNING et al., 2014; HOFFMANN-CAMPO et al., 2000).

Os fitonematoides representam aproximadamente 15% das espécies já descritas de nematoides, e são responsáveis por perdas agrícolas estimadas em R\$ 35 bilhões por ano no Brasil, sendo que apenas na cultura de soja são estimadas R\$16,2 bilhões (SBN, 2017).

Os nematoides associados ao cultivo de soja estão incluídos em aproximadamente 50 gêneros distintos da qual se destaca *Meloidogyne* (*melon* = melão; *gyne* = fêmea). Neste gênero já foram catalogadas mais de 2.000 espécies de plantas no mundo consideradas como hospedeiras (DIAS et al., 2010; HALFED-VIEIRA et al., 2016; MOURA, 2016). A maioria dos nematoides-das-galhas são encontrados nas raízes, na zona de 5 a 25 centímetros abaixo da superfície, e são disseminados principalmente pela água ou solos grudados em equipamentos agrícolas. Além das perdas agrícolas e difícil manejo, as meloidoginose representam altos gastos com ações preventivas de controle e redução do valor de mercado de muitas colheitas de raízes (AGRIOS, 2005; MOURA, 2016).

O controle de fitonematoides é complexo e necessita de ações de manejo integrado, baseados em quatro pilares: genético, químico, cultural e biológico (DIAS-ARIEIRA et al., 2022). Dessa forma integrar diferentes métodos de controle levando em consideração as características ecológicas e econômicas da cultivar, maximiza o potencial em reduzir a população destes vermes, visto que sua irradiação é praticamente impossível. (DE OLIVEIRA e ROSA., 2019).

Assim como os fitonematoides se alimentam de tecidos vegetais, também servem como fonte de alimento a inimigos naturais presentes na microflora do solo; são eles, as bactérias, nematoides predadores, protozoários, ácaros, colêmbolas, tardígrados e os fungos nematófagos (CARNEIRO, 1992). Os organismos genericamente chamados de inimigos naturais podem ser inoculados no solo ou ainda, podem ser admitidas medidas que tornem o solo favorável ao seu desenvolvimento (FERRAZ e BROWN, 2016). A utilização de fungos nematófagos para

controle biológico já vem sendo adotada, por compartilharem a capacidade de atacar os nematoides (ovos, juvenis e adultos) usando-os como nutrientes. São divididos em cinco grupos: predadores, endoparasitas, produtores de dispositivos de ataque, oportunistas (ovicidas), e fungos produtores de toxinas (LIU; XIANG; CHE, 2009; SOARES; SUFIATE; QUEIROZ, 2018). Dentre estes fungos, estão aqueles utilizados na alimentação humana, os cogumelos comestíveis. A utilização do resíduo da produção de cogumelos comestíveis pode ter como finalidade o controle de fitonematoides. A indústria produz por ano aproximadamente 5 kg de resíduo a cada 1 kg de cogumelo produzido, sendo que anualmente a produção mundial de cogumelos ultrapassa 25 milhões de toneladas. O material restante da produção pode apresentar toxinas e ainda estruturas de ataque dos fungos, sendo possível a utilização no controle dos nematoides. Destacando que este substrato é biodegradável, diferentemente dos diversos defensivos agrícolas utilizados atualmente (HAHN et al., 2019; NIAZI e GHAFLOOR, 2021).

Além da ação nematicida, alguns microrganismos também estão relacionados a promoção do crescimento das plantas, podem favorecer a solubilização de nutrientes e ainda ativar mecanismos de defesa (LIMA et al., 2019). Dessa forma, nossa hipótese é que a inoculação de resíduos fúngicos pode alterar a expressão gênica de plantas de soja, induzindo genes relacionados à defesa. Sendo assim, utilizando resíduos fúngicos de *Pleurotus eryngii* e *Lentinula edodes*, o objetivo proposto foi observar variações na expressão gênica de folhas de soja, utilizando marcadores relacionados às vias hormonais e genes relacionados a nematoides, inoculando *Meloidogyne incognita* em plantas de soja.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Soja

A soja, cujo nome científico é *Glycine max* (L.) Merr. é uma leguminosa pertencente à família *Fabaceae*, assim como o feijão e a ervilha. A soja é planta herbácea, dicotiledônea com estrutura formada por conjunto de parte aérea e raízes. Seu desenvolvimento é dividido em dois períodos, vegetativo (semeadura ao florescimento) e reprodutivo (florescimento à colheita). Desenvolvem vagens que ao amadurecer alteram da cor verde ao amarelo-pálido, marrom-claro, marrom ou cinza; contendo em média cinco sementes (lisas, elípticas ou globosas), que dão origem aos principais produtos fabricados e comercializados a partir da soja (MUNDSTOCK e THOMAS, 2005; NEPOMUCENO; FARIAS; NEUMAIER, 2021).

A utilização da soja na alimentação é datada há mais de 5.000 anos. Sua introdução no Brasil ocorreu em 1882, porém apenas 60 anos depois obteve sucesso, quando avaliada em regiões com características favoráveis à sua adaptação. Desde então, vem se mantendo como produto fundamental na agricultura brasileira e peça-chave no agronegócio nacional, incluindo investimentos em estruturas de armazenagem, processamento, transporte e exportação da soja e derivados (APROSOJA, 2012; GAZZONI e DALL'AGNOL, 2018).

A soja representa um marco no desenvolvimento agroindustrial do Brasil, que pode ser dividido em duas fases: antes da soja (até 1970) e depois da soja (anos 1970 até os dias atuais) – surgimento do Brasil agroempresarial (GAZZONI e DALL'AGNOL, 2018; HIRAKURI et al., 2019). O crescimento na produção de soja pode ser explicado por alguns fatores como: elevado teor de proteínas na alimentação humana, fonte para produção da proteína animal, considerável teor de óleo utilizado na alimentação humana, fabricação de biocombustíveis, cultivo automatizado e mecanizado, aumento de tecnologias; e ainda o fato da soja ser uma *commodity* padronizada, ou seja, pode ser produzida e exportada em diversos países (HIRAKURI e LAZZAROTTO, 2014).

As sementes podem ter como destino o mercado externo ou o esmagamento para a obtenção de produtos derivados. Por exemplo, o farelo de soja que juntamente com o milho constitui 80% da matéria utilizada para fabricação de ração animal. Ainda podemos citar o óleo extraído da semente, que representa cerca de 15% do destino dos grãos da soja, que darão origem ao óleo de cozinha, margarina, temperos e gordura vegetal (APROSOJA). Ressalta-se ainda o uso na alimentação humana (bebidas prontas – sucos e leites à base de soja, chocolates e massas) e geração de bens de consumo (tintas, vernizes e maquiagens) (APROSOJA, 2012;

HIRAKURI et al., 2019; NETO, 2017). Além disso, a soja ao longo dos anos se tornou o principal produto utilizado na geração de biodiesel no Brasil, permanecendo como principal matéria-prima empregada há mais de uma década.

No Brasil em 25 safras analisadas – 1996/1997 a 2020/2021- observou-se aumentos significativos na área e produtividade em todos os estados, apesar de inúmeros fatores limitantes, como eventos climáticos, redução da duração do ciclo de desenvolvimento da soja, surgimento e/ou aumento de doenças, etc. (BALBINOT JUNIOR et al., 2022).

De acordo com o Boletim da safra de grãos do 10º Levantamento 2021/2022 é esperada 124.47,8 milhões de toneladas na produção total de soja. Em relação a exportação estima-se um total de 75,23 milhões de toneladas (CONAB, 2022). Grande parte deste avanço na produtividade da soja se deve ao fator melhoramento genético. A geração de novas cultivares apresenta elevada aceitação no mercado, incluindo aquelas que possuem melhor adaptação, elevado potencial produtivo, resistência ao acamamento, adaptabilidade a solos e climas distintos, resistência a pragas e doenças, etc. Isso possibilitou o crescimento da produção do grão no país, desde sua introdução como commodities até os dias atuais (SILVA, 2018; VOLPATO, 2016).

Entretanto, mesmo com grandes avanços algumas interferências podem ocorrer, como o aumento de pragas e doenças. No Brasil, aproximadamente quarenta doenças em soja causadas por fungos, bactérias, vírus e nematoides já foram identificadas. Apenas nematoides, mais de cem espécies já foram associadas ao cultivo de soja (DIAS et al., 2010).

2.2. Fitonematoides

Os nematoides são animais invertebrados pertencentes ao filo Nematoda (ou Nemata), conhecidos por serem vermes alongados, subcilíndricos apresentando as extremidades afiladas. O corpo é coberto por uma cutícula incolor, na qual sofre sucessivas mudas nos estádios juvenis. Podem ser encontrados em diversos ambientes naturais, desde que haja umidade suficiente assegurando sua sobrevivência. Embora a maioria dos nematoides sejam microscópicos, o tamanho é variável, incluindo animais de 0,2 mm a mais de 8 m de comprimento (FERRAZ, 2011; FERRAZ e BROWN, 2016).

Segundo os hábitos alimentares podem ser separados em três grupos: vida livre, parasitas de animais (zooparasitas) e parasitas de plantas (fitonematoides). Os fitonematoides atacam todas espécies de plantas cultivadas na terra, porém por falta de conhecimento dos

agricultores acerca de sua presença e danos econômicos que podem ocasionar, as consequências geradas são ainda maiores (FERRAZ; SANTOS, 1995; GRIGOLLI e ASMUS, 2014).

Algumas características levaram os nematologistas a denominar os fitonematoides como "os inimigos invisíveis das plantas". Alguns destes aspectos podem ser citados como, serem animais microscópicos (0,2 a 3,0 mm de comprimento), a preferência por parasitar sistemas radiculares e ocorrência de sintomas inespecíficos. Este último acarreta em tratamentos inadequados (como a aplicação de fertilizantes ou defensivos agrícolas), ao final gerando gastos ao agricultor sem resultados efetivos (FERRAZ e BROWN, 2016).

Os fitonematoides não se disseminam por conta própria, normalmente se espalham através da transferência humana, irrigação com água contaminada, máquinas e veículos contaminados. Como estes vermes são praticamente impossíveis de serem erradicados o melhor a se fazer é evitar sua introdução na área a ser cultivada (PINHEIRO et al., 2010; SOARES e DO NASCIMENTO., 2021).

Os danos ocasionados por estes parasitas parecem ter origem nas secreções salivares injetadas nas plantas durante a alimentação. Perfuram a parede celular, injetam a saliva na célula e retiram nutrientes. Além do dano mecânico ocasionado, espécies que se alimentam nas raízes geram sintomas de deficiências nas partes aéreas, pela falta de água e nutrientes. Ademais os fitonematoides ainda podem favorecer a entrada de outros patógenos a partir dos ferimentos causados (AGRIOS, 2005).

Estes parasitas podem ser classificados em: ectoparasitos quando permanecem no solo durante a alimentação, como *Helicotylenchus*; endoparasitos quando ficam imersos nas raízes para se alimentar, como por exemplo, os gêneros *Meloidogyne* e *Pratylenchus*; e semiendoparasitos quando permanecem com parte do corpo externo à planta durante a alimentação, como as fêmeas maduras de *Heterodera glycines* e *Tylenchulus semipenetrans*. Os parasitas ainda podem ser classificados em migradores ou sedentários, quando os adultos se locomovem nas plantas e no solo, ou aqueles que perdem a locomoção após estabelecer o parasitismo na planta hospedeira, respectivamente (FERRAZ, 2011).

Os principais nematoides de importância para agricultura brasileira pertencem a ordem Tylenchida. Nessa ordem podem ser citados algumas espécies como *Heterodera glycines* (nematóide de cisto da soja), *Pratylenchus brachyurus* (nematóide das lesões), *Rotylenchulus reniformis* (nematóide reniforme) e *Meloidogyne* spp. (nematóides das galhas) (DIAS et al., 2010; FERRAZ et al., 2001; FERRAZ e BROWN, 2016).

2.3. *Meloidogyne* spp.

Em *Meloidogyne* estão os conhecidos nematoides-das-galhas (*root-knot nematodes*) consideradas as espécies problemáticas devido às características como alto grau de polifagia e ampla distribuição geográfica (FERRAZ e BROWN, 2016). Neste gênero já foram catalogadas mais de 2.000 espécies de plantas no mundo consideradas como hospedeiras (DIAS et al., 2010; HALFED-VIEIRA et al., 2016; MOURA, 2016).

A interação entre as espécies de *Meloidogyne* e as plantas ocasionam sintomas característicos, sendo a doença popularmente conhecida no Brasil como meloidoginose (MOURA, 2016).

No Brasil, a plantação de soja que é considerada uma das principais culturas agrícolas, é fortemente afetada pelo parasitismo destes nematoides. Nas plantas é possível averiguar manchas em reboleiras, com plantas pequenas e amareladas, além de apresentarem as vezes manchas cloróticas ou necrose entre nervuras – folha “carijó”. O tamanho da planta pode não ser reduzido, mas no florescimento nota-se abortamento de vagens e amadurecimento prematuro (DIAS et al., 2010). Dessa forma, a importância de controlar os nematoides vem aumentando, devido aos problemas fitossanitários ocasionados por sua presença (GRIGOLLI e ASMUS, 2014).

O principal sintoma observado na presença destes nematoides é a formação de tecidos tumorais ou neoplásticos nas raízes, que são conhecidos como galhas. As galhas são protuberâncias nas raízes, que se formam onde estão as fêmeas. Dentro destas galhas estão presentes as fêmeas de coloração branco-pérola, que apresentam formato de pera (DE OLIVEIRA e ROSA, 2019; SEIXAS et al., 2020).

No Brasil destacam-se duas espécies: *Meloidogyne javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949 e *Meloidogyne incognita* (Kofoid e White, 1919) Chitwood, 1949, sendo que esta última é considerada uma espécie de máxima relevância no contexto de importância econômica nos diversos continentes (DIAS et al., 2010; FERRAZ e BROWN, 2016). *Meloidogyne incognita* é encontrado por todas regiões, se expandindo juntamente com o cultivo de soja, representando 23,1% das espécies do gênero nas áreas de plantio (SOARES e DO NASCIMENTO., 2021).

Com o intuito de controlar os nematoides, é necessário o conhecimento acerca de seu ciclo de vida, assim pode-se utilizar de estratégias eficazes de manejo. As fêmeas dos nematoides-das-galhas são endoparasitas sedentárias, apresentando corpo obeso com dois ovários longos e bem desenvolvidos. São capazes de originar cerca de 400 ovos que são mantidos em matriz gelatinosa, que é comumente observada externamente à raiz. Após completar a embriogênese, dentro dos ovos estão os juvenis de 1º estágio (J1), ao passar por

ecdise formam juvenis de 2º estágio (J2) de corpo filiforme sendo a forma infectante típica do gênero. Esta forma móvel eclode do ovo e sai no solo em busca de raízes das plantas hospedeiras, com auxílio de enzimas degrada a parede celular vegetal, penetrando na raiz. Migram intercelular e intracelularmente até atingir o parênquima vascular, com o estilete injeta secreções esofágicas em algumas células, causando alterações morfológicas e fisiológicas. Ocorre a formação de células gigantes multinucleadas (conhecidas como nutridoras) ao redor do sítio de alimentação, formando um tecido denominado cenócito. Os nematoides passam a se nutrir do citoplasma destas células modificadas que fornecem os nutrientes para desenvolvimento do parasita, que a partir deste momento se torna sedentário, com formato salsichoide, ocorrendo sucessivamente três outras ecdises formando J3, J4 e adultos (machos e/ou fêmeas). As populações são basicamente constituídas por fêmeas, sendo encontrados machos apenas em condições ambientais especiais. Na forma adulta normalmente o macho sai da raiz, enquanto a fêmea continua seu desenvolvimento até atingir formato globoso e iniciar a produção da massa de ovos, com ou sem fertilização do macho. A duração do ciclo depende das condições, mas no geral, em ambientes favoráveis, com temperatura à 25°C, é consumado em três a quatro semanas (ABAD et al., 2008; FERRAZ et al., 2001; FERRAZ, 2011; FERRAZ e BROWN, 2016; FONTES e VALADARES-INGLIS, 2020; PINHEIRO; CARVALHO; VIEIRA, 2010; PINHEIRO et al., 2012).

2.4. Controle de fitonematoides

Entre as técnicas de manejo destaca-se o uso de cultivares resistentes, considerada uma das aplicações mais efetivas e seguras ao meio ambiente. O principal benefício desta técnica é o impedimento ou redução da reprodução do patógeno nas raízes da planta. Na soja, já são conhecidas fontes de resistência para os nematoides das galhas e nematoide de cisto da soja, embora ainda escassas cultivares resistentes que apresentam todas as características desejadas. O desenvolvimento de cultivares resistentes normalmente é trabalhoso e leva tempo, e ainda assim não representa uma estratégia de diminuição da população no solo (ARIAS et al., 2022; SILVA et al., 2014). Dessa forma juntamente com utilização de cultivares resistentes devem ser adotadas outras medidas como a rotação de culturas e manejo adequado do solo. A rotação de culturas é um processo acessível que consiste em alternar em determinada área o cultivo de plantas não hospedeiras em áreas infestadas por nematoides, preferencialmente com sistemas radiculares distintos, trazendo benefícios para o sistema produtivo (GONÇALVES et al., 2007).

A principal técnica ainda utilizada para controle de fitonematoides é a aplicação de agrotóxicos. Com o uso generalizado nas mais diferentes condições ambientais, muitos problemas começaram a ser percebidos e diagnosticados, como a ocorrência de resíduos em alimentos, contaminação de solos e lençóis freáticos, efeito em organismos não visados, intoxicação de aplicadores, além do potencial carcinogênico de compostos presentes em suas formulações. Consequentemente o uso indiscriminado e incorreto dos agrotóxicos chega diretamente à mesa do consumidor (BARON et al., 2019; WAICHMAN, 2012).

De forma geral, o controle de nematoides deve ser uma medida que provoque a redução nos níveis populacionais, mantendo-os durante o tempo necessário em patamares, nos quais não causem danos significativos às culturas. Além disso torna-se importante a busca de produtos alternativos com baixa toxicidade e que não ocasione a poluição do meio ambiente, como técnicas de controle biológico e indução de resistência utilizando bactérias e fungos nematófagos, por exemplo. (FERRAZ e BROWN, 2016; SANTOS et al., 2018).

O controle biológico passou a ser utilizado afim de gerar alternativas ao desenvolvimento sustentável da agricultura, e aumento da pressão imposta pela população sobre o uso de agrotóxicos. Proposto pela primeira vez no século XIX com objetivo de controlar espécies causadores de doenças ou pragas propagadas por insetos (BARON et al., 2019).

O controle biológico de doenças de plantas pode ser definido de forma simplificada como afirmam Betiol, Maffia e Castro (2014, p. 92) “O controle de um microrganismo patogênico, por outro organismo, geralmente chamado de antagonista”. Os mecanismos de controle do antagonista sobre o patógeno podem envolver parasitismo, predação, competição e antibiose (DE SOUZA et al., 2015). O controle biológico ocorre de maneira natural nos ecossistemas, com a ação de antagonistas sobre as presas ou hospedeiros, porém é possível através da ação humana, facilitar a ação dos agentes de controle, por exemplo, bactérias e fungos (FONTES e VALADARES-INGLIS, 2020; PAL e GARDENER, 2006).

O controle biológico no Brasil é promissor, em quantidade e qualidade, uma vez que sua utilização em grandes culturas deverá crescer, sendo nas culturas de soja, milho, cana-de-açúcar, algodão e café as maiores expectativas de crescimento para os próximos anos (CROPLIFE, 2021).

A comercialização de produtos biológicos ainda é impedida por diversos fatores, desde a falta de investimento, concorrência com produtos químicos, inúmeras normas a serem cumpridas desde sua produção até armazenamento (BUENO et al., 2016). Ademais é uma técnica específica e demanda tempo para obtenção dos resultados esperados. Por exemplo, quando há compatibilidade, é possível utilizar o nematicida químico associado ao biológico. O

nematicida químico aplicado na semente trará efeito inicial da proteção reduzindo a infecção na raiz inicialmente, enquanto o biológico aplicado no sulco da semeadura, com princípio de ação mais lento com uso contínuo, pode se manter no solo e atuar durante todo ciclo da cultura (SOARES e DO NASCIMENTO, 2021). Sendo assim, em situações como estas citadas, um contexto de manejo integrado utilizando técnicas combinadas pode trazer benefícios e soluções a longo prazo (FERRAZ e SANTOS, 1995; FONTES e VALADARES-INGLIS, 2020).

Algumas vantagens podem favorecer o mercado de produtos biológicos como, aumento da detecção de pesticidas nos alimentos consumidos, diminuição da eficácia de produtos químicos, menos resíduos mantidos no ambiente, maiores exigências legais para produtos químicos, etc. (VIVIAN e QUERINO, 2020).

No caso do controle biológico de fitonematoides, a simples retirada da planta infectadas não diminui ou elimina os vermes. Muitos apresentam estruturas de resistência como ovos e cistos que ficam no solo armazenados (LIMA et al., 2019). Porém, com os riscos ocasionados pela utilização de nematicidas químicos, pesquisadores passaram a desenvolver bionematicidas, baseados em agentes biológicos como, bactérias, fungos e outros microrganismos. Os bionematicidas são basicamente direcionados ao controle dos ovos e fases infectantes presentes externamente às raízes da planta (LIMA et al., 2019). Os nematicidas químicos, além de não serem específicos também não afetam desenvolvimento dos ovos, devido as camadas de quitina que os tornam resistentes (BARON et al., 2019).

A produção de um bionematicida comercial é complexa pois se tem preocupações como a multiplicação *in vitro* do microrganismo, o “tempo de prateleira”, custos com avaliações de segurança e eficiência do produto, falta de orientação aos agricultores sobre o uso correto, faltam incentivos fiscais, além do demorado processo de registro nos órgãos governamentais. (FERRAZ e BROWN, 2016; VIVIAN e QUERINO, 2020).

2.5. Fungos nematófagos

Os fungos nematófagos (do grego *nemat-* ou *nemato* = fio + *phag* - do grego *phagos* - fágico = comer, ingerir) vem despertando interesse nos pesquisadores em diferentes partes do mundo em relação ao papel no controle biológico. Já são mais de 700 fungos nematófagos descritos incluídos em diferentes filos, dentre eles Ascomycota, Basidiomycota, Zygomycota e Chytridiomycota (DASGUPTA e KHAN, 2015; LI et al., 2015; SOARES; SUFIATE; QUEIROZ, 2018).

Os fungos nematófagos já foram encontrados em todas regiões do mundo, em vários tipos de solo e principalmente naqueles ricos em matéria orgânica. Isso ocorre devido ao fato da maioria dos fungos nematófagos serem parasitas facultativos, ou seja, tem a capacidade de se alimentar de matéria orgânica proveniente principalmente de organismos mortos presentes no solo (Saprotrofia) (JANSSON e LOPEZ-LLORCA, 2004).

Outra descoberta interessante em relação aos fungos é sua presença frequente na rizosfera de leguminosas (soja, ervilha, etc) em comparação ao solo sem raízes, o que pode ser explicado a presença de fitonematoides, que geram aumento ou alteração da exsudação radicular nessas plantas. Ao se alimentar de nematoides parasitas de plantas, os fungos garantem uma vantagem nutricional e realizam controle biológico, por isso a importância do crescimento dos fungos nematófagos na rizosfera (NORDBRING-HERTZ; JANSSON; TUNLID, 2011).

De maneira geral, os fungos nematófagos são divididos em três grupos: fungos predadores, fungos endoparasitas e fungos oportunistas (ovicidas). Os fungos predadores apresentam diferentes tipos de armadilhas, como redes de hifas, botões e ramos adesivos, anéis constritores e não constritores, redes tridimensionais adesivas ao longo do micélio; que são utilizados para capturar por adesão ou mecanicamente os nematoides (SAXENA, 2018). Após aprisionamento, ocorre penetração das hifas na cutícula do nematoide, crescimento das hifas e digestão dos conteúdos internos, um fungo predador comum é *Arthrobotrys oligospora* (MOTA; CAMPOS; DE ARAUJO, 2003).

São mais de 200 espécies já descobertas de fungos predadores, podendo capturar nematoides no primeiro estágio larval ou fase adulta, ainda assim apresentam capacidade saprófita relativamente boa (AHMAD et al., 2021). Estes fungos apresentam algumas características desfavoráveis como incapacidade de competir em ampla gama de condições do solo e serem sensíveis à mudanças no ambiente (NORDBRING-HERTZ; JANSSON; TUNLID, 2011; SIDDIQUI e MAHMOOD, 1996).

Os fungos endoparasitas são frequentemente parasitas obrigatórios, com alta especificidade pelo hospedeiro, e apresentam ainda fraca capacidade saprofítica competitiva. Os endoparasitas produtores de conídios utilizam seus esporos para infectar os hospedeiros, que após engolidos por eles, se alojam no trato digestivo e ocasionam a morte do nematoide. Existem também, os endoparasitas produtores de zoósporos, que produzem esporos móveis, que se ligam a cutícula do nematoide (JANSSON e LOPEZ-LLORCA, 2004; MOTA; CAMPOS; DE ARAUJO, 2003; SAXENA, 2018). Estes fungos endoparasitas quase não produzem micélio no solo e completam seu ciclo de vida dentro do corpo do hospedeiro, como

exemplo, o fungo *Drechmeria coniospora* (NORDBRING-HERTZ; JANSSON; TUNLID, 2011).

Os fungos oportunistas colonizam o conteúdo do ovo ou a larva ainda em desenvolvimento no interior. Massas de ovos liberados no solo são vulneráveis à deterioração e colonização, assim como fêmeas obesas. Ao entrar em contato, o fungo forma um apressório que adere a casca do ovo. As hifas penetram, através de pequenos poros na camada vitelínica, se expandem através das camadas quitínica e lipídica (MOTA; CAMPOS; DE ARAUJO, 2003). A camada lipídica se torna dispersa e a camada de quitina se torna vacuolizada, então hifas endógenas passam a emergir do ovo e produzem conidióforos (fonte de conídios). Uma vez em contato com a massa de ovos estes fungos parasitam todos os ovos em estágios iniciais de desenvolvimento. Devido ao parasitismo de ovos, os fungos oportunistas impedem danos as plantas e são eficientes contra nematoides que produzem grandes quantidades de ovos (HALFED-VIEIRA et al., 2016; SIDDIQUI e MAHMOOD, 1996).

São considerados mais eficientes no biocontrole de nematoides que os outros dois grupos anteriores, como exemplo de fungo oportunista pode ser citado *Pochonia chlamydosporia* (JANSSON e LOPEZ-LLORCA, 2004).

Apesar dos grupos citados serem amplamente conhecidos, estudos recentes propõe a classificação dos fungos nematófagos em 5 grupos. Além dos três tipos citados anteriormente, acrescentam-se os fungos produtores de toxinas e fungos produtores de dispositivos de ataque (LIU; XIANG; CHE, 2009; SOARES; SUFIATE; QUEIROZ, 2018). Os fungos produtores de toxinas são capazes de imobilizar os nematoides através de metabólitos tóxicos (alcalóides, peptídeos, terpenóides, esteróis, compostos alifáticos e quinonas) (FRANCISCO et al., 2021) antes que ocorra a penetração das hifas através da cutícula dos nematoides. Essas substâncias podem exercer efeitos na eclosão, mobilidade e capacidade de penetração dos nematoides em seus hospedeiros. Como exemplos podem ser citados os fungos do gênero *Pleurotus*, pertencentes ao filo Basidiomycota (CARVALHO, 2017; RODRÍGUEZ-BARRERA et al., 2021).

Os fungos produtores de dispositivos de ataque apresentam estruturas parecidas com espadas afiadas que causam danos à cutícula, levando ao vazamento do conteúdo interno do corpo do nematoide. Demonstra-se assim que ocorre força mecânica para imobilizar e matar nematoides, e a partir do dano, a ocorrência da colonização completa por hifas fúngicas (LUO; LI; LI; PAN; ZHANG, 2006; SOARES; SUFIATE; QUEIROZ, 2018). Um dos tipos de dispositivo de ataque já estudado são os acantócitos, produzidos por espécies de *Stropharia*,

que auxiliam na proteção e ainda na suplementação nutricional do fungo (LUO; LI; LI; PAN; ZHANG, 2006).

A potencialidade da utilização de fungos nematófagos vem sendo demonstrado em inúmeros artigos, alguns fungos testados com eficácia comprovada podem ser citados como: *Helicomyces roseus*, *Pseudohalonestria lignicola*, *Phomatospora berkeleyi* (DONG et al., 2004), *Hypsizygyus marmoreus* (SOARES et al., 2019), *Pochonia chlamydosporia* (HAHN et al., 2019; LOPES et al., 2007), *Paecilomyces lilacinus*, *Arthrobotrys oligospora*, *Monacrosporium eudermatum*, *Arthrobotrys musiformis* (SANTAMARIA et al., 2017), *Trichoderma spp.* (FREITAS et al., 2012), *Boletus sp.* e *Pleurotus pulmonarius* (WILLE et al., 2019).

Apesar de todos estudos realizados, comprovando a eficácia da utilização de fungos no controle biológico, a falta de interesse comercial no controle de nematoides impede maiores utilizações. No Brasil, até junho de 2022 existia 11 produtos biológicos à base de fungos para controle de fitonematoides registrados (BRASIL, 2022; SIDDIQUI e MAHMOOD, 1996).

Outro aspecto a ser levado em consideração seria o aproveitamento de resíduos da indústria, como por exemplo, aqueles gerados na produção de cogumelos comestíveis. O substrato pode apresentar toxinas e estruturas de predação, que pode atuar contra nematoides e também outros microrganismos fitopatogênicos presentes no solo. Além disso são biodegradáveis, não interferindo nos aspectos ambientais, sendo uma forma de descarte dos resíduos agroindustriais (HAHN et al., 2019).

São importantes novas pesquisas com intuito de elucidar mecanismos moleculares de interação entre os fitonematoides e fungos nematófagos, a fim de expandir a utilização do controle biológico de modo mais eficiente e seguro.

2.6. *Pleurotus eryngii*

Pleurotus eryngii é um basidiomiceto conhecido como cogumelo trompete rei ou cogumelo ostra rei. É um fungo comestível que apresenta grande quantidade de proteínas, carboidratos, vitaminas e ácidos graxos insaturados. Apresenta sabor agradável, alto valor nutricional e baixo teor calórico. Os polissacarídeos presentes nestes fungos têm se tornado alvo de pesquisa nos últimos anos explorando sua estrutura e fisiologia. Vários estudos tem sido realizados com diferentes partes do fungo, corpo de frutificação, micélio e substratos degradados. Alguns compostos bioativos produzidos por *Pleurotus* são capazes de estimular ou

complementar respostas imunes em hospedeiros, sendo o foco de várias pesquisas (RODRÍGUEZ-BARRERA et al., 2021).

Dentre as funcionalidades relacionadas ao *P. eryngii* estão as atividades antioxidantes, antitumorais, imunorreguladoras, antibacteriana, anti-inflamatória, hipoglicemiante, imunomoduladoras, e também na regulação do metabolismo lipídico (ZHANG et al., 2020). Cogumelos do gênero *Pleurotus* produzem metabólitos secundários com atividades anti-helmíntica contra parasitas gastrointestinais. Por exemplo, no estudo realizado utilizando *P. eryngii* e sua ação nematicida contra *Haemonchus contortus* (Parasita de pequenos ruminantes), polióis identificados afetaram a eclosão de ovos. Além da análise in vitro, sobre larvas que demonstrou alterar a motilidade. Os nematoides ainda apresentaram em seus corpos úlceras e contrações internas (CRUZ-ARÉVALO et al., 2020). Esses fungos são produtores de toxinas, que formadas a partir das hifas ao entrarem em contato com nematoides, penetram em seu corpo tornando-os inativos.

Diversas pesquisas demonstram a atividade nematicida deste fungo contra fitonematoide, apresentando algumas características interessantes como, o cultivo rápido e produção de proteases. Efeitos antagônicos foram percebidos quando ao penetrar seus micélios em nematoides, liberam proteases que degradam a cutícula dos mesmos. (CHAIYADIT e CHAIRIN, 2022). O fungo *P. eryngii* reduziu de maneira significativa in vitro, o número de larvas de *Panagrellus spp.* utilizando extrato (fervido e não fervido) e também o inóculo do fungo. Ocorreu ainda redução no número de ovos inteiros de *Meloidogyne javanica*, utilizando extrato de *P. eryngii*, ocorrendo eclosão precoce, formação de vacúolos, devido as atividades quitinolíticas e proteolíticas (SUFIATE et al., 2017). Outro estudo, demonstrou que o uso do extrato aquoso e filtrado do meio líquido da cultura de *P. eryngii*, reduziu eclosão de ovos de *M. javanica*. Além disso afetou o desenvolvimento e mobilidade de J2, o mesmo foi observado quando realizaram testes de interação com micélio de *P. eryngii*. (HAHN et al., 2019).

Oliveira (2020) avaliou extratos aquosos de vários resíduos fúngicos, incluindo de *P. eryngii*, os quais apresentaram atividade nematicida contra *M. incognita*, causando mais de 95% de morte dos nematoides após 72 horas. Ainda, estes extratos incorporados ao solo diminuíram a quantidade de ovos e galhas nas raízes de soja. Extratos enzimáticos também foram produzidos e testados quanto atividade quitinolítica, que apresentando resposta positiva pode explicar o porquê da ação nematicida destes resíduos.

Em um estudo in vitro utilizando *Pleurotus spp.* no controle de *M. incognita* demonstrou-se que após 48 horas, houve inibição da eclosão dos ovos, mortalidade de juvenis e ainda produção de nematotoxina após 12 horas de incubação (CHAIYADIT e CHAIRIN,

2022). A utilização do filtrado de cogumelos frescos *Pleurotus ostreatus* na concentração de 15g/100 ml após 72 horas levou a mortalidade de 58% de juvenis de *M. incognita*. Além disso, reduziu a reprodução do nematoide, melhorou o crescimento e produtividade do feijão-caupi, e ainda a redução de galhas (YOUSSEF e EL-NAGDI, 2021).

2.7. *Lentinula edodes*

Também conhecido como shitake, o fungo *Lentinula edodes* é um cogumelo comestível nativo da Ásia, onde é fortemente cultivado e consumido. Além de apresentar sabor salgado, é considerado um alimento com baixas calorias, fonte de fibras e vitamina B. É um basidiomiceto considerado medicinal, sendo consumido há mais de 2000 anos, apresentando funções no sistema imunológico, redução de colesterol, diabetes, além da capacidade in vitro como antioxidante e antitumoral (ANAMIKA e ARCHANA., 2022).

Hearst et al (2009) realizaram estudos direcionados a ação antifúngica e antibactericida do extrato aquoso de *L. edodes* e verificaram potencial efeito contra 85% dos microorganismos testados. Esse fungo ainda é pouco estudado quanto à sua função nematicida, mesmo com sua eficácia comprovada. Por exemplo, a utilização dos resíduos da produção de shiitake foram capazes de reduzir a porcentagem de larvas de *Panagrellus spp.* em comparação ao grupo controle, comprovando ação nematicida (FERREIRA et al., 2022). O micélio de *L. edodes* também ocasionou mortalidade in vitro de larvas L3 de *Haemonchus contortus* com a porcentagem de 93,93% em relação ao controle, utilizando extratos hidroalcolicos, houve a redução das larvas em 19,67% em 48 horas e 49,5% após 72 horas (COMANS-PÉREZ et al., 2021).

Outro trabalho utilizando filtrado de meio líquido e extrato aquoso de *Lentinula edodes* causaram a mortalidade de J2 de *Meloidogyne javanica*, ainda a interação com micélio levou a imobilização dos nematoides em dois isolados utilizados (HAHN et al., 2019). O filtrado de *L. edodes* (1000 ppm) inibiu a eclosão em 85.6% de *M. incognita* após 72 horas, e ainda causou 81.2% na mortalidade de juvenis (POORNIMA e BALAMURALI., 2021). Em alface cultivar ‘Saia Véia’, utilizando filtrado do meio de cultivo do Shiitake, houve redução de larvas J2 e diminuição das galhas formadas por *M. incognita*. Alguns filtrados apresentaram ação nematicida enquanto outros atividade nematostática (SANTANA-SANTOS et al., 2022). Esses resultados encontrados podem ser explicados pela produção de compostos bioativos por estes fungos. São capazes de romper a massa gelatinosa de ovos, alterando a eclosão e ainda nos juvenis infectantes, as aberturas presentes em seus corpos podem facilitar a penetração de

toxinas levando à morte (THEMUHI et al., 2020). O resíduo fúngico do cogumelo *Lentinula edodes* também foi estudado por Oliveira (2020) apresentando grande potencial nematicida e atividade de quitinases.

2.8. Resistência vegetal a fitopatógenos

As plantas apresentam estruturas de defesa pré-existentes contra patógenos, sendo estas estruturais e químicas. As defesas estruturais incluem cera e cutícula (quantidade e qualidade), estômatos (tamanho, localização e forma), presença de células de paredes espessas, presença de camada de pelos. As ceras e os pelos podem vir a apresentar um efeito repelente, enquanto a cutícula espessa pode aumentar a resistência à infecção em patógenos que realizam penetração direta. As plantas são capazes de liberar substâncias em seu ambiente, acima do solo e superfície de raízes, que parecem inibir certos patógenos antes mesmo da infecção como compostos fenólicos, taninos, fitoalexinas, etc. Há por exemplo, a ocorrência de proteínas chamadas fitocistatinas, que inibem proteinases cisteínicas presentes no sistema digestivo de nematoides, que são produzidas em diversas plantas (AGRIOS, 2005).

Os indivíduos dentro das espécies podem variar nível de resistência, podendo haver variedades mais ou menos suscetíveis; enquanto outras podem ser menos resistentes, e alguns indivíduos totalmente resistentes. Estas características dependem de alguns fatores como o tipo e quantidade de genes de resistência presentes na planta e condições ambientais. Quando a planta é resistente ao patógeno significa que a mesma apresenta genes de resistência (R) compatíveis com genes de avirulência (AVR) específicos do patógeno. Os genes R reconhecem eliciadores específicos de patógenos, resultando na produção de moléculas sinalizadoras, desencadeando reações localizadas e a resposta de hipersensibilidade (VERHAGEN; VAN LOON, PIETERSE, 2006).

A reação de hipersensibilidade se caracteriza como uma resposta rápida e localizada, esta reação leva a morte induzida das células da planta afetada, considerada uma forma de morte celular programada. Além dessa resposta no local da infecção, as plantas desenvolvem resistência sistêmica eficaz contra infecções do mesmo patógeno e patógenos não relacionados. Algumas moléculas sinalizadoras transmitem para outras células, e assim o sinal é translocado para partes distais da planta, desencadeando genes de resposta e defesa, chamados genes de resistência adquirida sistêmica (AGRIOS, 2005; TON et al., 2002; VERHAGEN; VAN LOON; PIETERSE, 2006).

A resistência sistêmica adquirida (RSA) diz respeito à reação de resistência na planta em razão da infecção por um elicitor parasita ou patogênico. É caracterizada pelo acúmulo de ácido salicílico (AS). Os principais componentes da via do AS levam à resistência a doenças a partir da expressão de genes que codificam as proteínas relacionadas a patogênese (*PR-proteins*). Ainda alguns destes genes ativam as outras vias, mediada por ácido jasmônico e etileno. Além do ácido salicílico, acredita-se que a transdução de sinais seja realizada por oligogalacturonídeos liberados das paredes celulares das plantas, ácido jasmônico, ácidos graxos, etileno e outros (AGRIOS, 2005; BARROS et al., 2010; FONTES e VALADARES-INGLIS, 2020).

As plantas apresentam outro tipo de resistência além da RSA, a denominada Resistência Sistêmica Induzida (RSI). Este tipo de resistência pode se desenvolver como uma resposta a agentes benéficos, simbioses, abióticos, etc. Ela é expressa não apenas no local da indução, mas sistematicamente nas partes da planta como próprio nome sugere. A Resistência Sistêmica Induzida é regulada por vias de sinalização principalmente através das moléculas de ácido jasmônico, etileno. Os hormônios citados são importantes na regulação da defesa, visto que as plantas com os genótipos afetados à resposta destes hormônios, são mais suscetíveis à infecção por certos patógenos virulentos. Em interações hospedeiro-patógeno as plantas reagem com aumento da produção dessas substâncias, e ocorrência da ativação de genes relacionados a defesa em busca de bloquear a infecção (AGRIOS, 2005; PIETERSE et al., 2014; TON et al., 2002).

Apesar de serem tratados como sinônimos RSA e RSI apresentam uma grande diferença, enquanto “adquirida” diz respeito a indução da resistência a partir elicitores de patógenos/parasitas, o termo “induzido” se refere a indução de resistência por agentes benéficos, simbioses ou abióticos. A RSA é uma resposta secundária de RSI após resposta hipersensível a patógenos avirulentos (BARROS et al., 2010; MÉTRAUXS, 2001).

O tratamento com componentes, compostos (orgânicos ou inorgânicos) ou produtos microbianos pode ocasionar a resistência sistêmica induzida. Essa indução é considerada um mecanismo indireto já que o agente não atua direto no patógeno, mas estimula mecanismos de defesa na planta contra o mesmo. Através do contato com moléculas presentes nos microrganismos (bactérias, fungos, etc.) ou produzidas por eles, podem vir a gerar o desencadeamento de respostas de defesa. O mesmo eliciador utilizado pode ser capaz de induzir respostas em diferentes espécies vegetais, contra diversos patógenos (FONTES e VALADARES-INGLIS, 2020). Como exemplo podemos citar a utilização de basidiomicetos que vem apresentando grande potencial no controle de doenças, diretamente e indiretamente,

umentando níveis de resistência da planta (OLIVEIRA, 2015; WALTERS; RATSEP; HAVIS, 2013).

2.9. Fitormônios

As plantas são expostas a diversas condições ambientais, sendo assim precisam se adaptar e adotar mecanismos para reconhecer sinais e gerar respostas aos imprevistos. Uma das abordagens utilizadas são os fitormônios que medeiam respostas a estresses bióticos e abióticos e apoiam as plantas assegurando condições vitais. Dentre os fitormônios que atuam na defesa, os mais conhecidos são etileno (ET), ácido abscísico (ABA), ácido jasmônico (JA) e ácido salicílico (SA). JA, ET, ABA e AS são conhecidos por respostas de defesa contra diversos patógenos e pragas.

O etileno é um fitormônio encontrado nas condições ambientais no estado gasoso. Através da ligação a receptores vários efeitos são observados nas plantas. Apresenta a metionina como precursor através da ação de enzimas como Ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano sintase (ACS) e Ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano oxidase (ACO) gerando etileno ao final. A formação de ACC em etileno ocorre apenas em condições aeróbias. Após sintetizado o etileno se difunde por toda a planta se ligando aos receptores e ainda se difunde causando efeito em plantas vizinhas. Sua resposta é regulada negativamente pelos receptores através de CTR1 (*Constitutive Triple Response 1*). Ao ser acionado sinaliza a jusante para que ocorra supressão das respostas na ausência do hormônio. Quando o etileno está presente, CTR1 é inativado, ocorre desencadeamento de respostas através de proteínas que controlam genes responsivos ao etileno. Uma resposta bem conhecida do etileno é a resposta tripla, que gera crescimento reduzido da raiz e hipocótilo, hipocótilo espesso e gancho apical exagerado (AKBAR et al., 2021; MA e DONG; 2020). São também efeitos conhecidos pelo etileno: senescência, amadurecimento de fruto, germinação de sementes, abscisão, estresses de frio, determinação de sexo, desenvolvimento da flor. Em coordenação com outros hormônios como AS, ABA e JA regulam respostas de defesas. O seu papel contra ataques de patógenos é conhecido em diversas espécies de plantas, principalmente contra agentes necrotróficos, biotróficos e hemibiotróficos (AKBAR et al., 2021; BINDER; 2020; RAMEGOWDA et al., 2020).

O ácido jasmônico é derivado de lipídeos. O substrato para sua síntese é o ácido α -linolênico (18:3) (α -LeA) liberado de galactolipídeos de membranas do cloroplasto (WASTERNAK E HAUSE., 2013). Ele é reconhecido como inibidor do crescimento vegetal embora apresente inúmeras funções. Está envolvido na germinação de sementes, senescência

de folhas, crescimento de raízes, pode induzir a abertura estomática, etc. (BARI e JONES., 2009). Vários elementos do ambiente podem levar a síntese de JA e mediar respostas contra estresses, desencadeando a expressão de genes de defesa. Estudos demonstram que sua concentração aumenta localmente em resposta a patógenos ou danos (herbívoros, danos mecânicos, etc.) (RUAN et al., 2019). Quando aplicado em pequenas doses pode levar ao aumento da resistência contra patógenos em plantas. Tanto em respostas locais quanto sistêmicas sinais de JA estão envolvidas. Pesquisas demonstram que JA e ET funcionam sinergicamente com frequência após inoculação do patógeno, estimulando expressão de genes de defesa, normalmente associados contra agentes necrotróficos e herbivoria (AKBAR et al., 2021).

O ácido salicílico (AS) é um metabólito secundário com inúmeras funções celulares. Pode ser formado a partir da via dos fenilpropanoides ou pela via do isocorismato, sendo que esta última é predominante durante a infecção por patógenos. Desempenha papel no crescimento das plantas, floração, nodulação, germinação de sementes, transpiração, indução de resistência a doenças, respostas aos estresses bióticos e abióticos, fotossíntese (ARIF et al., 2020; ASGHARI e AGHDAM, 2010). No caso de microrganismos biotróficos e hemibiotróficos ocorre a resistência mediada pela sinalização de AS, gerando resposta hipersensitiva. O ácido salicílico está associado ao acúmulo de espécies reativas de oxigênio, que causa morte tecidual e também a síntese de lignina no local da infecção. Sua aplicação exógena ativa vários genes relacionados à defesa, incluindo as proteínas PR (relacionados a patogênese) contra diversos patógenos, além de compostos fenólicos (AKBAR et al., 2021). Está associado a resistência sistêmica adquirida (SAR), na qual a planta gera um sinal no local da infecção, percorre através dos sistemas vasculares e sinaliza respostas de defesa em locais não infectados. Seu nível varia de espécie, planta, órgão, além do estágio de desenvolvimento e estresses ambientais (ARIF et al., 2020). Juntamente com JA, o ácido salicílico faz parte de vias de sinalização relacionados à resistência. A aplicação concomitante de JA e AS em baixa quantidade estimula a expressão de genes marcadores de forma sinérgica, embora as vias JA/ET e AS sejam antagônicas, já foram relatadas estas interações (AKBAR et al., 2021; BARI e JONES., 2009).

Por último, o ácido abscísico (ABA), um hormônio vegetal reconhecido principalmente por atuar nas respostas de estresses abióticos nas plantas, é sintetizado através da via dos terpenos ou terpenóides, a partir da rota do ácido mevalônico ou através da rota do metileritritol fosfato (OLIVEIRA et al., 2010) Seu papel mais explorado é a germinação de sementes, maturação do embrião e ainda dormência. Está relacionado com respostas das plantas a

estresses abióticos, como seca, frio, salinidade e perda de água. Enquanto a luz estimula a abertura dos estômatos, a indução de ABA pode levar ao fechamento estomático, com aumento da concentração de Ca^{2+} no citoplasma, auxilia na diminuição de perda de água, além do ajuste constante de absorção de CO_2 para fotossíntese ao longo do dia, minimizando a transpiração. Também pode estimular produção de H_2O_2 (Peróxido de hidrogênio) que seria um intermediário para fechar os estômatos (BARI e JONES., 2009; WASILEWSKA et al., 2008). Outros estudos vêm abordando sua participação nas respostas de defesa planta-patógeno, sendo considerado um regulador negativo contra vários patógenos necrotróficos e biotróficos. Pode controlar de maneira positiva fechando os estômatos ou induzindo deposição de calose dependendo da fase de infecção. Também pode estimular a produção de ROS (espécies reativas de oxigênio) e ainda suprimir as defesas dependentes de AS, regulando aquelas dependentes de JA. Pode desempenhar papel nas interações mutualísticas compatíveis de plantas com micorrizas e bactérias rizosféricas. Em outros estudos sua aplicação exógena aumenta a suscetibilidade de espécies a bactérias e fungos patogênicos (AKBAR et al., 2021). Dependendo da interação planta-patógeno, estresse abiótico ou qualquer interferente vai ocorrer modulação e interação entre os hormônios vegetais, desempenhando papéis positivos ou negativos, promovendo da maneira mais eficaz mecanismos de defesa e sobrevivência.

3. OBJETIVO GERAL

Avaliar possíveis alterações na expressão de vias de resposta a fitormônios em soja, devido às interações com *Meloidogyne incognita* e resíduos do cultivo de fungos.

3.1. Objetivos específicos

- Determinar a influência dos resíduos do cultivo de fungos na expressão gênica da soja, por meio da técnica de RT-qPCR;
- Analisar a expressão gênica de: Hs1pro-1, JAR1, ETR, SAMT1, CHS e ATAF1, em plantas de soja após inoculação de *Meloidogyne incognita*;
- Verificar alterações na expressão dos genes Hs1pro-1, JAR1, ETR, SAMT1, CHS e ATAF1, após inoculação de *M. incognita* concomitantemente com resíduos fúngicos
- Avaliar a utilização de resíduos fúngicos como prováveis eliciadores de resistência em soja contra *M. incognita*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Obtenção dos resíduos de cogumelos comestíveis

Os resíduos dos cogumelos comestíveis pertencentes ao filo *Basidiomycota*, foram cedidos pelo Grupo Urakami, Mogi das Cruzes, São Paulo – Brasil. Neste trabalho foram utilizados dois diferentes resíduos: Eryngii (*Pleurotus eryngii*) e Shiitake (*Lentinula edodes*).

4.2. Obtenção e preparo do inóculo de *Meloidogyne incognita*

Os fitonematoides foram multiplicados em plantas de soja [*Glycine Max* (L.) Merrill], da cultivar Desafio sendo mantidos em casa de vegetação do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), da Universidade Federal de Viçosa. Para preparo do inóculo foi utilizado a metodologia de Boneti e Ferraz (1981). As raízes infectadas foram cortadas em pedaços de aproximadamente 1,0 cm de comprimento. Em seguida, trituradas em liquidificador por 20 segundos acrescidas de solução aquosa de hipoclorito de sódio a 0,5%. Posteriormente verteu-se a suspensão em peneira de 200 *mesh* acoplada a outra de 500 *mesh*. Feito isso lavou-se a peneira de 500 *mesh* abundantemente com água de torneira e foram recolhidos os nematoides retidos com auxílio de pisseta com água.

4.3. Preparo do material vegetal

Para cultivo das plântulas, foram selecionadas sementes da variedade Desafio que foram semeadas em vasos plásticos de 500 mL. O substrato utilizado continha uma mistura na proporção de 1:1 (v/v) de solo e areia previamente autoclavados a fim de evitar contaminação. O substrato foi autoclavado a 120° C durante uma hora, sendo o processo repetido após 24 horas.

4.4. Planejamento experimental em casa de vegetação

O planejamento experimental ocorreu em blocos ao acaso, com três repetições (planta/vaso) por tratamento em um total de 36 plantas. Os tratamentos realizados foram os seguintes:

1. Planta controle
2. Planta inoculada com *Meloidogyne incognita*
3. Planta inoculada com resíduo fúngico de *Pleurotus eryngii*
4. Planta inoculada com resíduo fúngico de *Lentinula edodes*
5. Planta inoculada com *Meloidogyne incognita* e resíduo fúngico de *Pleurotus eryngii*
6. Planta inoculada com *Meloidogyne incognita* e resíduo fúngico de *Lentinula edodes*

4.5. Inoculação dos nematoides e resíduos fúngicos

Após sete dias do plantio, foram determinadas aleatoriamente três plantas para cada tratamento. Em plantas tratadas com resíduos fúngicos de *Lentinula edodes* ou *Pleurotus eryngii* foram depositadas 5 gramas de resíduo fúngico em cada repetição em aberturas feitas no solo próximas a raiz.

Em relação aos nematoides a calibragem do inóculo foi estimada aproximadamente em 500 nematoides por mililitro, observados por microscópio óptico, sendo que nas plantas inoculadas utilizamos 3 mL de suspensão, enquanto nas plantas controle foram inoculadas 3 mL de água destilada.

4.6. Extração de RNA e síntese do cDNA

As folhas e raízes das plantas foram coletadas em dois tempos para posterior extração, em cinco e dez dias após inoculação dos nematoides e resíduos. No entanto, durante o processo de extração do RNA total das raízes, ocorreram adversidades que impediram o prosseguimento da análise. Então o trabalho foi continuado utilizando as folhas das plantas de soja.

As folhas foram colocadas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer -80° C. As amostras de aproximadamente 100 mg de folha de soja foram maceradas e transferidas para tubos de 1,5 mL. O RNA total foi extraído utilizando *Trizol*® (*Invitrogen*) segundo informações do fabricante. Após extração o RNA foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop 2000 (*Thermo Fisher Scientific*). A integridade do RNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose na concentração de 1,7%. A corrida eletroforética utilizando tampão TBE (1X) permaneceu aproximadamente 25 min a 70v.

Após averiguação da qualidade do RNA, seguiu-se o tratamento com DNase I, Amplification Grade (*Invitrogen*TM) para remoção de possível DNA genômico contaminante. Utilizando 1µg de RNA, gerou 10 µL de RNA tratado com DNase.

Para realizar a síntese do cDNA, utilizou-se os 10 µL de RNA tratado, 1 µL de *primers* oligo(dT)12-18 (Sigma Aldrich, São Paulo, SP) e 1 µL de dNTP (10 µM). A solução foi aquecida a 65°C por cinco minutos, e resfriada em gelo por 1 min.

Posteriormente, foram adicionados 4 µL de tampão 5x, 2 µL de DTT (0,1 M), 1 µL de RNase OUT. A solução foi homogeneizada e incubada a 37°C por 2 min. Em banho-maria acrescentou-se 1 µL de *Transcriptase Reversa M-MLV* (Moloney Murine Leukemia Vírus) (*Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA*) permanecendo a 37°C por 1 hora, para síntese do cDNA correspondente. Para inativar a enzima por aquecimento, os tubos permaneceram por 15 min a 70°C.

4.7. Genes para RTq-PCR

Para definição dos genes da soja e genes normalizadores que seriam utilizados foram feitas buscas na literatura. Os *primers* marcadores foram selecionados de artigos que retratavam diferentes tipos de estresses em plantas de soja. Definimos quatro genes relacionados a quatro fitormônios distintos: etileno - ETR (ARRAES et al., 2015), ácido jasmônico - JAR1 (SELIG et al., 2016), ácido abscísico - ATAF1 (SELIG et al., 2016) e ácido salicílico - SAMT1 (LIN et al., 2013). E ainda dois genes que foram relacionados à resistência à nematoide: CHS e Hs1pro-1 (MORALES et al., 2009) (Tabela 1). Enquanto os dois genes endógenos escolhidos, são utilizados e validados na literatura: CYP e ACT11 (Tabela 2).

Tabela 1. Sequências dos *primers forward* e *reverse* utilizados para amplificação pela técnica de RT-qPCR

GENE	LOCUS ID	PRIMER FORWARD	PRIMER REVERSE	REFERÊNCIA
ETR	Glyma.19g40090	5'- ATGGATGCCTTCAAGAAGTGG -3'	5'- ATGGATGCCTTCAAGAAGTGG-3'	Arraes et al., 2015
JAR1	Glyma.16g03010.1	5'- ACACCAAGATTCTCCTAGCTGC-3'	5'- AGGATCCGTCCTCCATTCA-3'	Selig et al., 2016
ATAF1	Glyma.02g26480	5'- GCCTGTACTTCGAGGCTTCC-3'	5'- GAAACTCGCTGTTGCCCTG-3'	Selig et al., 2016
SAMT1	Glyma.02g06070	5'-GTGAAATTGGAAGTTCTTAAAGAAGGA-3'	5'-CAGATTCAAAGTCTAGAGCATTCCAC-3'	Lin et., 2013
CHS	Glyma.11g011500	5'- CAGGCACAAAGGGCAGAAG-3'	5'- GGTTGGTGGGTTTGCAATT-3'	Morales et al., 2009
Hs1pro-1	Glyma.11g228100	5'- GACCTCTGGCTCTGGATTTCG-3'	5'- AGGAATGAGTACTTGTGTTGGA-3'	Morales et al., 2009

Tabela 2. Sequência dos primers forward e reverse dos genes endógenos utilizados pela técnica de RT-qPCR.

GENE ENDÓGENO	LOCUS ID	PRIMER FORWARD	PRIMER REVERSE	REFERÊNCIA
CYP	Glyma.12G024700	5'- ACGACGAAGACGGAGTGG-3'	5'- CGACGACGACAGGCTTGG -3'	Li et al., 2012
ACT11	Glyma.18G290800	5'- ATCTTGACTGAGCGTGGTTATTCC-3'	5'- GCTGGTCCTGGCTGTCTCC -3'	Hu et al., 2009

4.8. RTq-PCR

As amplificações foram feitas utilizando equipamento de PCR em tempo real 7500 (*Applied Biosystems*), do Laboratório de Biotecnologia do Cafeeiro, situado no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO). Utilizando 5 µL de *SYBR Green PCR Master Mix (Life Technologies)*, 1 µL de cDNA diluído na proporção de 1:10, e 4 µL dos *primers* específicos (1,6 mM) citados na tabela 1 e 2, totalizando ao final 10 µL em cada poço. As reações foram realizadas da seguinte maneira: 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C e 40 ciclos de 94°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Utilizamos controles negativos na placa, sem adição de cDNA e outros sem adição de *primers*, confirmando a ausência de contaminação.

4.9. Análise dos dados

Para quantificação dos genes escolhidos, utilizamos dois genes de controle endógeno (tabela 2) para posterior normalização dos dados. Utilizamos a técnica descrita por Hellemans e colaboradores (2007). Para confirmar os valores obtidos na expressão gênica, foi aplicado ANOVA de uma via. Utilizando o software GraphPad Prism (versão 8.0.1) realizamos Teste de Tukey (p -valor < 0,05) e Teste t de Student (p -valor < 0,05). A análise de variância (ANOVA) seguido do teste Tukey foi utilizado para comparação entre as médias de todos os tratamentos, enquanto através do teste T de Student analisamos as diferenças entre duas médias de tratamentos. As análises foram feitas de modo independente para cada gene.

5. RESULTADOS

5.1. Expressão de ETR em plantas de soja

Na análise de expressão genica podemos observar que ao inocular *Meloidogyne incognita* em plantas de soja, após dez dias há um aumento na transcrição de ETR, aproximadamente 2,9 vezes maior que nas plantas controle (Fig. 1). Resultado parecido com o encontrado por Bhattarai et (2008) ao inocular *M.incognita* em tomate quando observou regulação positiva de ETR1 em plantas suscetíveis e resistentes, após 24 horas. A inoculação de *Pseudomonas syringae pv. actinidiae (Psa)*, causador do cancro bacteriano em Kiwi também induziu um aumento na expressão de ETR1 em 2,2 vezes após inoculação (SILVA et al., 2021). ETR1 também foi regulado positivamente em soja induzida por frio e ferimentos mecânicos (ZONGMING et al., 2007).

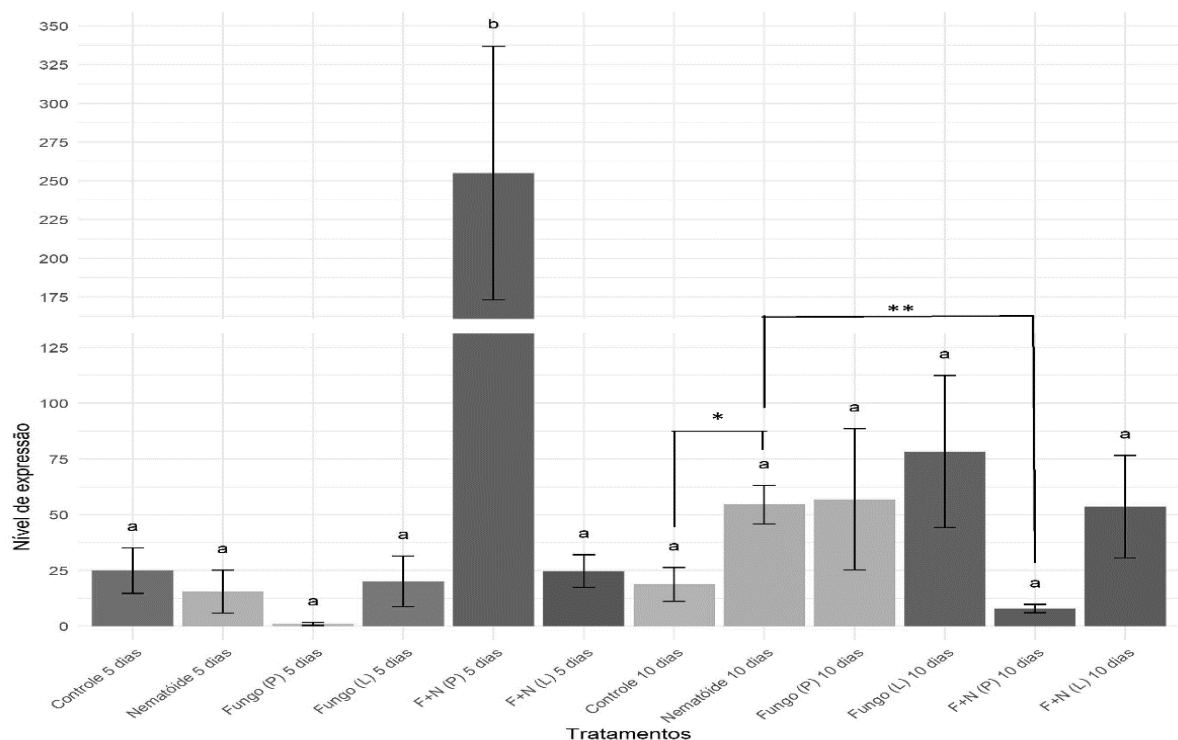


Figura 1 - Níveis de expressão do gene ETR obtidos por RT-qPCR. A expressão foi realizada através das folhas da cultivar Desafio coletadas após cinco (5D) e dez (10D) dias de tratamento. As siglas utilizadas nos gráficos são referentes a: N= nematoides, F= resíduo fúngico, quando associado ao (L)= resíduo fúngico de *Lentinula edodes*, e quando associado ao (P)= resíduo fúngico de *Pleurotus eryngii*. Cada barra representa a variação na expressão gênica dos valores médios de Ct derivados de duas repetições técnicas, derivadas de três repetições biológicas de cada tratamento. Sendo assim, a variação foi calculada utilizando o método $2^{-\Delta Ct}$, sendo normalizados através dos genes endógenos (ACT11 e CYP). As barras representam os valores de desvio padrão, letras diferentes indicam

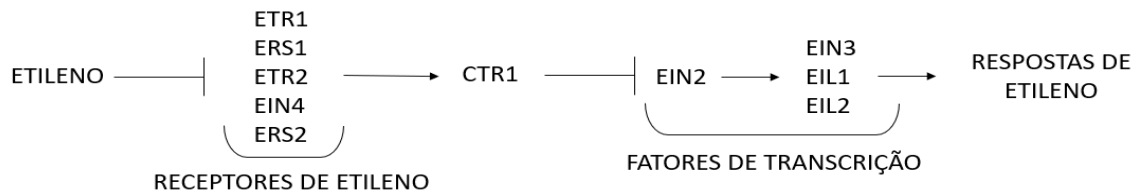
diferenças significativas entre os tratamentos através do Teste de Tukey ($P < 0,05$). Os asteriscos ligando os tratamentos significam diferenças estatísticas através do teste T de Student, em que o nível de significância se dá por: (*) $p \leq 0,05$; (**) $0,01 \leq p < 0,05$.

O tratamento com resíduo fúngico de *Pleurotus eryngii* após dez dias, causou redução na expressão do gene ETR em plantas de soja controle se comparado às plantas inoculadas com *M.incognita* (Fig. 1). Pesquisas realizadas com mutantes de perda de função e transgenia de receptores em arábido e tomate demonstram que a redução dos níveis de receptores pode resultar na maior capacidade de respostas ao etileno, aumentando a sensibilidade ao hormônio (HUA e MEYEROWITZ, 1998; TIEMAN et al., 2000). Plântulas de arábido submetidas ao estresse salino e osmótico apresentaram redução nos transcritos, mostrando que ocorreu a ativação das respostas do etileno quando em estresse (ZHAO e SCHALLER., 2004).

O tratamento que proporcionou maior diferencial na expressão gênica de plantas de soja ocorreu em cinco dias, com a inoculação de nematoides e resíduo de *P.eryngii*. Comparado a planta controle, o gene ETR é regulado aproximadamente 10 vezes mais (Fig. 1). Em estudo feito com videira, analisando a doença de Mal de Pierce (doença bacteriana causada por *Xylella fastidiosa*) e controle biológico com a cepa PsJN de *Paraburkholderia phytofirmans* (bactéria endofítica) observou-se baixa expressão de ETR em todos os tratamentos, exceto naquele coinoculado com as duas bactérias. Este resultado sugere que o controle ocorre por meio da indução de vias de resistência reduzindo respostas ao patógeno (BACCARI; ANTONOVA; LINDOW, 2018). Os tratamentos utilizando resíduo de *L. edodes*, não causaram efeitos significativos na expressão do gene ETR em plantas de soja, quando comparadas as plantas controle (Fig. 1).

ETR são genes que codificam para receptores de etileno pertencentes a via de transdução de sinais, descritos primariamente em *Arabidopsis thaliana*. Em arábido compreendem cinco membros: ETR1, ETR2, ERS1, ERS2 e EIN4. Além destas proteínas, estão presentes na principal via de sinalização uma proteína quinase CTR1, uma proteína EIN2, fatores de transcrição e de resposta ao etileno. Quando o etileno está presente se liga aos receptores, causando menor atividade de CTR1, que assim não inibe EIN2 levando a transcrição e ativação das respostas ao etileno (Fig. 2). Alguns estudos demonstram que estes são receptores que atuam de forma negativa, na ausência de etileno. Mutantes de perda tripla de receptores apresentam resposta constitutiva ao etileno, demonstrando que os receptores reprimem as respostas na ausência do etileno. Quando presente o etileno se liga e desativa os receptores, ativando a sinalização a jusante. (BINDER, 2020; WANG et al., 2017).

Figura 2 - Sinalização do etileno após a ligação do hormônio nos receptores presentes na membrana



Fonte: modificado de BINDER, 2020.

5.2. Expressão de JAR1 em plantas de soja

Neste estudo foi feita a quantificação do gene JAR1 em diferentes tratamentos. Se observado o tratamento inoculado com nematoides após cinco dias, há uma tendência na redução da expressão do gene JAR1 em plantas de soja (Fig. 3). Segundo SONG et al. (2021) esta redução na expressão é benéfica para os patógenos invasores. Kammerhofer et al. (2015) ao inocularem *Heterodera schachtii* em *Arabidopsis* observaram regulação negativa deste gene após 48 horas, juntamente com outros resultados alcançados, chegaram à conclusão que o nematoide é capaz de suprimir respostas dependentes de JA no início da infecção.

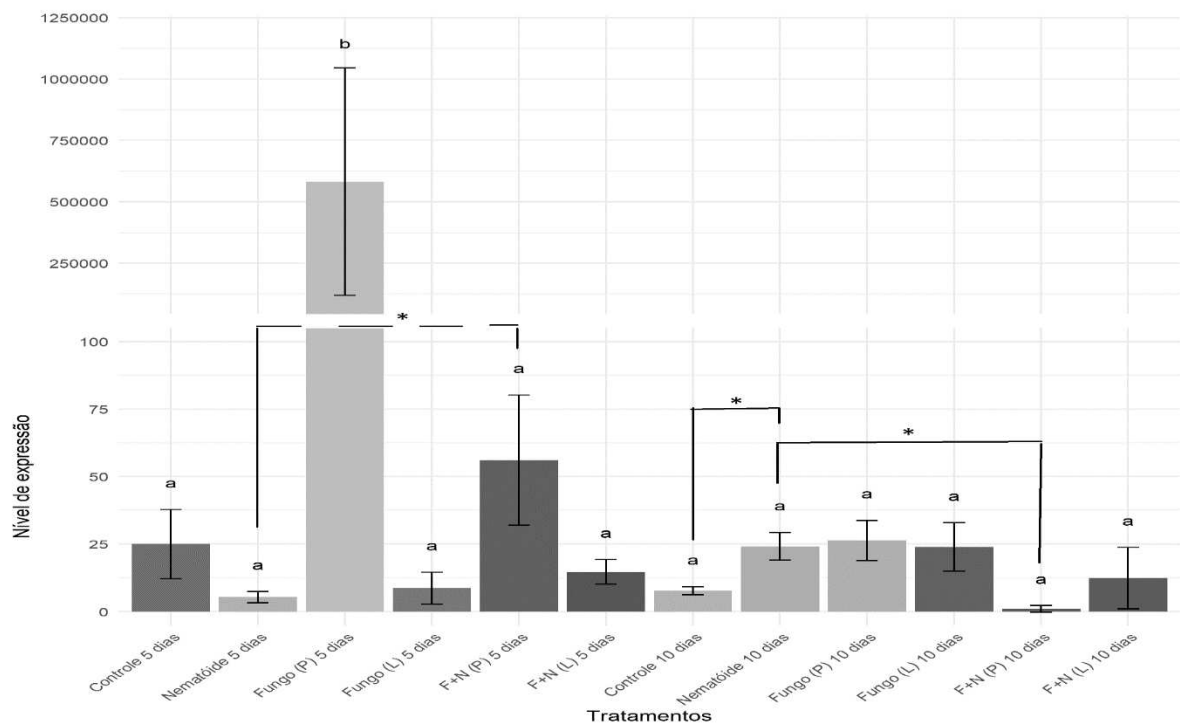


Figura 3 - Níveis de expressão do gene JAR1 obtidos por RT-qPCR. A expressão foi realizada através das folhas da cultivar Desafio coletadas após cinco (5D) e dez (10D) dias de tratamento. As siglas utilizadas nos gráficos são referentes a: N= nematoides, F= resíduo fúngico, quando associado ao (L)= resíduo fúngico de *Lentinula edodes*, e quando associado ao (P)= resíduo fúngico de *Pleurotus eryngii*. Cada barra representa a variação na expressão gênica dos valores médios de Ct derivados de duas repetições técnicas, derivadas de três repetições biológicas de cada tratamento. Sendo assim, a variação foi calculada utilizando o método $2^{-\Delta Ct}$, sendo normalizados através dos genes endógenos (ACT11 e CYP). As barras representam os valores de desvio padrão, letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos através do Teste de Tukey ($P < 0,05$). Os asteriscos ligando os tratamentos significam diferenças estatísticas através do teste T de Student, em que o nível de significância se dá por: (*) $p \leq 0,05$; (**) $0,01 \leq p < 0,05$.

Quando analisada a expressão gênica da planta de soja inoculada com nematoides em relação ao tratamento com *M.incognita* e resíduo de *P. eryngii*, observou-se aumento na expressão de mais de dez vezes após cinco dias. Podendo inferir que ao incluir o resíduo, eliciou a expressão deste gene nos primeiros dias de contato, induzindo respostas de defesa (Fig. 3). Nas plantas tratadas com *M.incognita* e resíduo de *P. eryngii*, após dez dias não foram observadas alterações relevantes na expressão gênica, gerando valores próximos ao da planta controle. A diferença mais expressiva ocorre na expressão das plantas tratadas com resíduo fúngico de *P.eryngii* aos cinco dias (Fig. 3). Em tomate também houve regulação crescente na expressão do gene JAR1 quando utilizado um bioagente contendo genes de *Bacillus velezensis*, avaliando resistência induzida (Vanthana et al., 2022).

Em nenhum tratamento com resíduo de *L.edodes*, observou-se alteração na expressão de JAR1 nas plantas de soja (Fig. 3). De certa forma é um resultado interessante, visto que na maioria dos experimentos inoculando patógenos há redução na expressão deste gene, sejam nas primeiras horas ou dias. Em um estudo avaliando a sinalização de JA em tomate inoculado com *M.incognita* concluiu-se que houve aumento na produção de JA e JA-Ile tanto em raízes quanto em folhas após o período de 24 dias, demonstrando que há sinalização sistêmica (WANG et al., 2019). No presente trabalho, utilizamos as folhas e podemos inferir que as mudanças ocorridas após o contato das raízes com os microrganismos em questão, influenciaram de maneira sistêmica a transcrição do gene JAR1.

Os jasmonatos são produzidos a partir do ácido jasmônico (JA) que é sintetizado a partir do ácido α -linolênico (Fig. 4). O JA tem papel direto sobre o controle da produção de compostos de defesa em plantas, para conferir resistência a vários organismos, como nematoides, besouros, lagartas, herbívoros, patógenos necrotróficos e fungos mutualísticos. A enzima JAR1 (Ácido jasmônico-amino sintetase) promove a conjugação do ácido jasmônico com isoleucina

formando o jasmonato, jasmonoil-isoleucina (JA-Ile), que parece ser uma molécula responsável por ativar a sinalização (CAMPOS et al., 2014).

Figura 4 - Produção de jasmonoil-isoleucina a partir do ácido jasmônico através da ação da enzima JAR1.



Fonte: modificado de ALI et al., 2020.

5.3. Expressão de ATAF1 em plantas de soja

No presente trabalho avaliamos a expressão de ATAF1 como um gene responsivo a ABA. Após cinco dias de tratamento, a inoculação de *Meloidogyne incognita* não alterou a expressão de ATAF1 nas folhas de soja em relação as plantas controle. Após dez dias, a inoculação de *M. incognita* em plantas de soja gerou uma redução na expressão genica de aproximadamente 2,4 vezes quando comparada as plantas controle (Fig. 5).

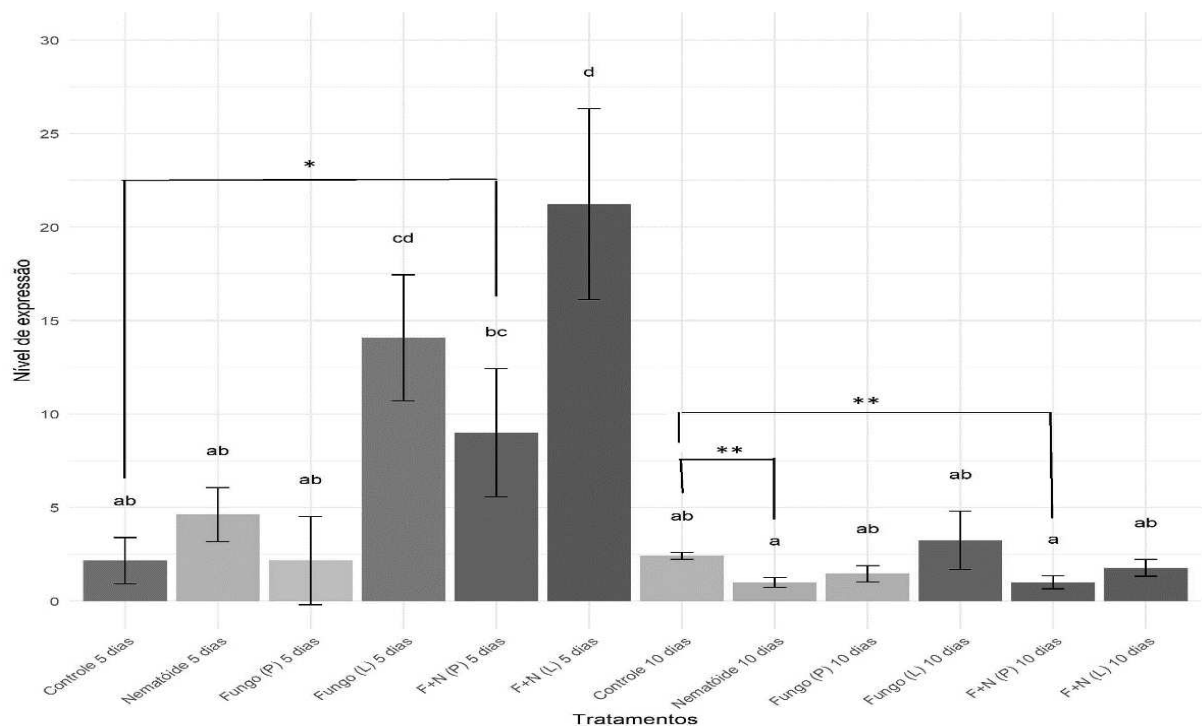


Figura 5 - Níveis de expressão do gene ATAF1 obtidos por RT-qPCR. A expressão foi realizada através das folhas da cultivar Desafio coletadas após cinco (5D) e dez (10D) dias de tratamento. As siglas utilizadas nos gráficos são referentes a: N= nematoides, F= resíduo fúngico, quando associado ao (L)= resíduo fúngico de *Lentinula edodes*, e quando associado ao (P)= resíduo fúngico de *Pleurotus eryngii*. Cada barra representa a variação na expressão gênica dos valores médios de Ct derivados de duas repetições técnicas, derivadas de três repetições biológicas de cada tratamento. Sendo assim, a variação foi calculada utilizando o método $2^{-\Delta Ct}$, sendo normalizados através dos genes endógenos (ACT11 e CYP). As barras representam os valores de desvio padrão, letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos através do Teste de Tukey ($P < 0,05$). Os asteriscos ligando os tratamentos significam diferenças estatísticas através do teste T de Student, em que o nível de significância se dá por: (*) $p \leq 0,05$; (**) $0,01 \leq p < 0,05$.

A inoculação do resíduo fúngico de *L. edodes* em plantas de soja, após cinco dias, aumentou a expressão de ATAF1 em aproximadamente 6,5 vezes em relação a planta controle. Se compararmos ainda com as plantas inoculadas com nematoide, as plantas inoculadas com *L.edodes* apresentaram 3 vezes mais expressão de ATAF1 (Fig. 5). Ao associar *M.incognita* e resíduo de *L.edodes*, a expressão de ATAF1 nas folhas de soja se torna ainda mais alterada, sendo 9,8 vezes mais expresso comparada ao controle, e 4,5 vezes mais expresso em relação a planta inoculada com nematoide (Fig. 5).

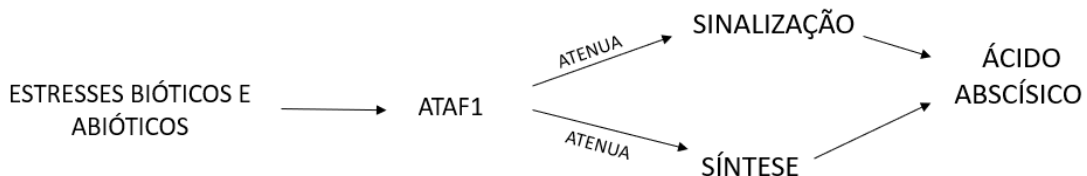
Selig et al. (2016) observaram um aumento na expressão de ATAF1 em plantas de soja, após 12 horas induzido através da alimentação por pulgões. Também foi observado por Studham e Macintosh (2013), após 7 dias o aumento na expressão de genes de biossíntese de ácido abscísico e também do marcador ATAF1 após infestação por pulgões da soja. Os autores expuseram que ao induzir a expressão destes genes por meio do uso dos pulgões, há supressão de resposta à AS e assim a infestação ocorre de forma efetiva nas plantas suscetíveis.

A utilização de *P.eryngii* em plantas de soja após cinco dias, não causaram alterações significativas na expressão gênica de ATAF1 comparado as plantas controle. Ao inocular o resíduo e *M.incognita* observou-se um aumento de 4 vezes na expressão deste gene. Em comparação, aos dez dias de tratamento, nas plantas tratadas com resíduo *P. eryngii* e *M.incognita* observou-se a redução na expressão de 2,4 vezes se comparada as plantas controle (Fig. 5).

Todos os tratamentos em dez dias contendo resíduo fúngico - Fungo (L), F+N (P), F+N (L)- exceto aquele contendo apenas *P.eryngii*, reduziram a expressão de ATAF1 nas folhas de soja, quando comparados os mesmos tratamentos em cinco dias.

ATAF1 é um fator de ativação de transcrição pertencente a uma família denominada NAC, que já foi associada a vários processos biológicos como desenvolvimento, transdução de sinal de estresse bióticos (Fungos necrotróficos, insetos) e abióticos (alta salinidade, estresse oxidativo, seca) e senescência (Fig. 6). Plantas transgênicas de *Arabidopsis* que superexpressam ATAF1, foram mais sensíveis a infecção por *Botrytis cinerea*, indicando papel negativo contra este fungo necrotrófico. Entretanto nessas plantas houve a maior indução de PR-1 (proteína relacionada a resistência adquirida sistêmica). Enquanto nas plantas ATAF1-1, mutantes para ATAF1, apresentaram baixa expressão de PR1. Demonstrando haver correlação negativa entre ATAF1 e resistência a doença de plantas (WU et al., 2009).

Figura 6 - Função do fator de transcrição ATAF1 na via relacionada ao ácido abscísico.



Fonte: de própria autoria.

5.4. Expressão de SAMT1 em plantas de soja

Neste trabalho avaliando a expressão genica do gene GmSAMT1 que codifica a enzima SAMT em soja, podemos verificar que não foram observadas diferenças significativas entre as plantas controle e aquelas inoculadas com *M.incognita* (Fig. 7). Assim como observado com *Heterodera glycines* (SCN), que pode causar diminuição do reconhecimento do sistema de defesa da soja, como consequência não desencadeia respostas no gene e assim ocorre menor produção de MeSA (LIN., 2013). Podemos supor que o mesmo ocorreu após inoculação de *M.incognita* nas plantas de soja. Nas plantas tratadas com resíduo de *P.eryngii* após cinco dias, obteve-se para o gene SAMT1 aproximadamente 5,3 vezes mais expressão que o analisado na planta controle. Em contrapartida se compararmos o mesmo tratamento após dez dias, houve redução em 11,8 vezes na expressão deste gene (Fig. 7).

O tratamento apenas com resíduo de *P.eryngii* após cinco dias aumentou a expressão de SAMT1 em plantas de soja aproximadamente 18,5 vezes mais, se comparado as plantas tratadas com resíduo fúngico e *M.incognita*. Esse resultado sugere que o uso unicamente do resíduo

fúngico consegue estimular respostas de defesa na soja, sendo o tratamento que apresentou maior expressão deste gene nas plantas de soja (Fig. 7).

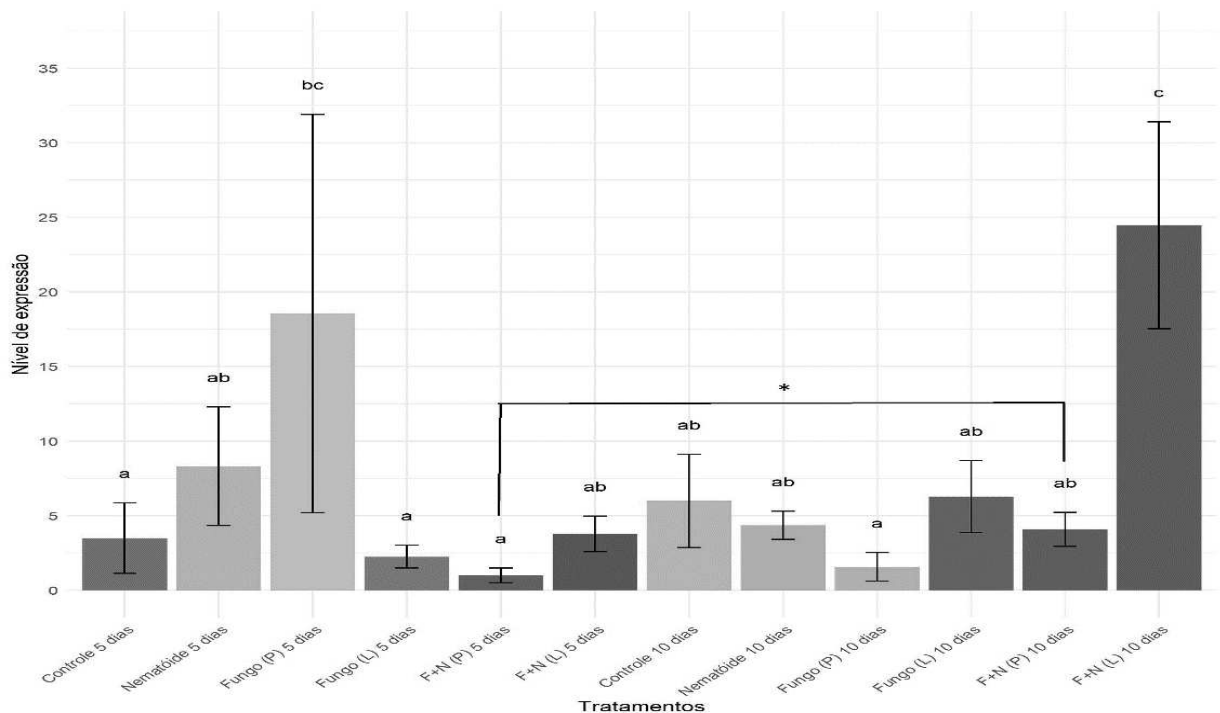


Figura 7 - Níveis de expressão do gene SAMT1 obtidos por RT-qPCR. A expressão foi realizada através das folhas da cultivar Desafio coletadas após cinco (5D) e dez (10D) dias de tratamento. As siglas utilizadas nos gráficos são referentes a: N= nematoides, F= resíduo fúngico, quando associado ao (L)= resíduo fúngico de *Letinula edodes*, e quando associado ao (P)= resíduo fúngico de *Pleurotus eryngii*. Cada barra representa a variação na expressão gênica dos valores médios de Ct derivados de duas repetições técnicas, derivadas de três repetições biológicas de cada tratamento. Sendo assim, a variação foi calculada utilizando o método $2^{-\Delta Ct}$, sendo normalizados através dos genes endógenos (ACT11 e CYP). As barras representam os valores de desvio padrão, letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos através do Teste de Tukey ($P < 0,05$). Os asteriscos ligando os tratamentos significam diferenças estatísticas através do teste T de Student, em que o nível de significância se dá por: (*) $p \leq 0,05$; (**) $0,01 \leq p < 0,05$.

Resultado interessante é encontrado quando comparamos a expressão de SAMT1 nas plantas inoculadas com *M.incognita* e resíduo de *L.edodes* após dez dias. Apresenta o maior aumento da expressão de SAMT, frente a todos os outros tratamentos do mesmo tempo (Fig. 7). Este resultado se assemelha ao trabalho utilizando a cepa Sneb207 de *Bacillus megaterium* no combate e indução de resistência em soja contra *Heterodera Glycines* (SCN). Avaliando o gene GmSAMT1 verificou-se aumento no valor da expressão quando as sojas eram tratadas com a cepa e inoculadas com SCN. Além do marcador de AS, também houveram alterações na expressão dos genes das vias de ácido jasmônico e etileno (ZHOU et al., 2020).

Estudos demonstraram que GmSAMT1 em soja parece desempenhar papel na defesa contra *Heterodera glycines* (SCN), pois raízes de plantas suscetíveis que superexpressaram GmSAMT1 reduziram significativamente o desenvolvimento de SCN nas plantas (LIN et al., 2013). Além de outros trabalhos, como a comparação do transcriptoma em RNA-seq feito por Zhang et al. (2017), onde foi observado fortemente a indução de GmSAMT1 em 54,5 vezes nas raízes infectadas de S54 (Genótipo resistente) se comparadas ao controle, enquanto S67 (Genótipo suscetível) aumentou apenas 8,1 vezes a expressão. Alterações ocorridas nos demais tratamentos não citados, não resultaram em diferenças estatísticas consideráveis.

A enzima SAMT (ácido salicílico carboxil metiltransferase) é responsável por catalisar a adição de um grupo metil à molécula de Ácido salicílico (AS) formando ao final salicilato de metila (MeSA) (Fig. 8). MeSA é um metabolito secundário volátil encontrado nas plantas que pode levar a indução da produção de AS em outras plantas afim de ativar genes de resistência e relacionados a patogênese. O MeSA também pode ser convertido novamente em AS após transmitir sistemicamente o sinal de resposta de defesa (LIN et al., 2013).

Figura 8 - Formação de salicilato de metila através da incorporação de um grupo metil na molécula de ácido salicílico pela enzima SAMT1.



Fonte: modificado de KOO et al., 2007.

5.5. Expressão de CHS em plantas de soja

Neste trabalho pode-se notar que ocorreu a indução da expressão genica de plantas de soja em contato com *M. incognita* após 10 dias, aproximadamente 1,7 vezes se comparado as plantas controle (Fig. 9). Morales et al. (2009) utilizando parental de soja resistente (PI595099) e ainda populações de genótipos também resistentes (JF 7002 e JF 7027) demonstraram aumento na expressão de CHS quando inoculados com *Meloidogyne javanica*. Esta alteração também foi encontrada por Khanna et al. (2019), utilizando tomate inoculado com *M. incognita*, observaram aumento na expressão de CHS se comparado à planta não inoculada. Eles utilizaram duas rizobactérias (*Pseudomonas aeruginosa* e *Burkholderia gladioli*) avaliando a

alteração de vários genes, sendo que nos tratamentos que apresentaram nematoides inoculados e rizobactérias observou-se um aumento na expressão de CHS.

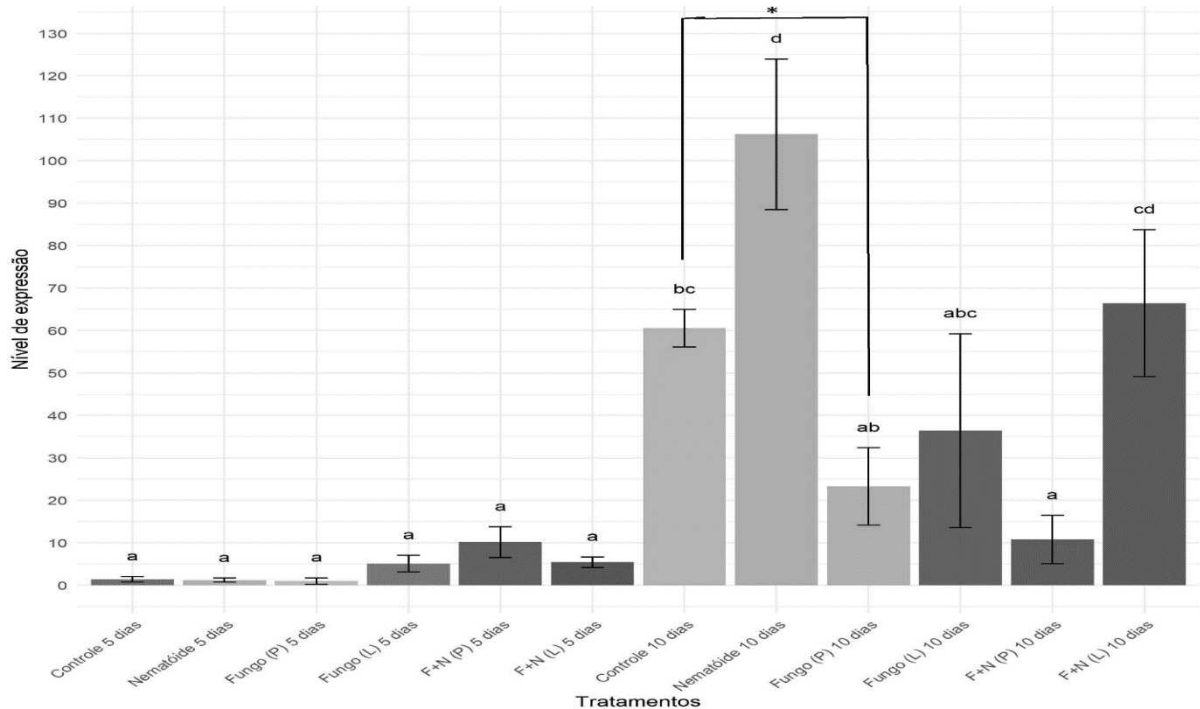


Figura 9 - Níveis de expressão do gene CHS obtidos por RT-qPCR. A expressão foi realizada através das folhas da cultivar Desafio coletadas após cinco (5D) e dez (10D) dias de tratamento. As siglas utilizadas nos gráficos são referentes a: N= nematoides, F= resíduo fúngico, quando associado ao (L)= resíduo fúngico de *Lentinula edodes*, e quando associado ao (P)= resíduo fúngico de *Pleurotus eryngii*. Cada barra representa a variação na expressão gênica dos valores médios de Ct derivados de duas repetições técnicas, derivadas de três repetições biológicas de cada tratamento. Sendo assim, a variação foi calculada utilizando o método $2^{-\Delta Ct}$, sendo normalizados através dos genes endógenos (ACT11 e CYP). As barras representam os valores de desvio padrão, letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos através do Teste de Tukey ($P < 0,05$). Os asteriscos ligando os tratamentos significam diferenças estatísticas através do teste T de Student, em que o nível de significância se dá por: (*) $p \leq 0,05$; (**) $0,01 \leq p < 0,05$.

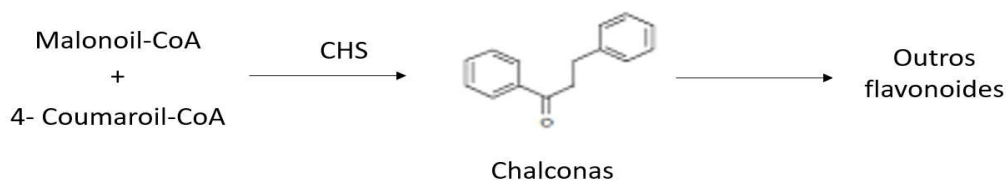
Outro trabalho utilizando sementes de soja revestidas com o caldo de fermentação da cepa Sneb183 (*Sinorhizobium fredii*) demonstrou aumento na expressão do gene CHS, após 7 e 14 dias de inoculação de *Heterodera glycines* (WANG et., 2020). Resultado diferente foi encontrado no presente trabalho, quando inoculado *L.edodes* e nematoides nas plantas de soja, a expressão deste gene, se manteve próxima ao valor das plantas controle após 10 dias (Fig. 9).

Ao utilizar o resíduo de *L.edodes*, observou-se redução na expressão de CHS em 2,9 vezes comparado as plantas inoculadas com *M.incognita*. Quando inoculado resíduos fúngicos

de *P. eryngii* ou ainda concomitante ao inóculo de *M.incognita*, a expressão do gene CHS foi reprimida nas folhas de plantas de soja (Fig. 9).

CHS é a sigla para chalcona sintase, uma enzima chave na biossíntese de flavonoides, como isoflavonoides e antocianina (Fig. 10). Estes flavonoides são considerados de grande importância para agricultura visto que alguns são considerados fitoalexinas. Estas moléculas são produzidas pelas plantas no metabolismo secundário com ação antimicrobiana. Normalmente enzimas que são responsáveis por sintetizar estas fitoalexinas, como CHS, se encontram em baixas quantidades em plantas saudáveis. São expressas a partir do contato com patógenos, herbivoria ou ainda por fatores abióticos, auxiliando a planta na defesa contra tal estresse. Em juvenis de fitonematoides, os flavonoides podem diminuir sua locomoção, repeli-los das raízes e até ocasionar a morte (CHIN et al., 2018; DAO et al., 201).

Figura 10 - Formação de chalconas através da ação da enzima CHS.



Fonte: modificado de PERES

5.6. Expressão de Hs1pro-1 em plantas de soja

As plantas de soja inoculadas com nematoides em 5 dias comparadas a 10 dias, resultaram em um aumento de 4,6 vezes na expressão do gene Hs1pro-1, levantando a hipótese de que houve a penetração dos J2 nas raízes da soja (Fig. 11). Assim como, Thureau et. (2003) afirmaram que a expressão deste gene ocorre apenas após a infecção do nematoide, estudando a infecção de *Heterodera schachtii* em beterraba.

GHAEMI et al (2020) utilizando beterraba sacarina, cultivar resistente analisaram raízes infectadas e não infectadas com *Heterodera schachtii*, sendo que este gene foi altamente expresso nas duas condições se comparadas a cultivar de beterraba suscetível. Diferente do presente trabalho, onde se utilizou apenas cultivar suscetível, houveram algumas variações na expressão deste gene, em diferentes tratamentos (Fig. 11).

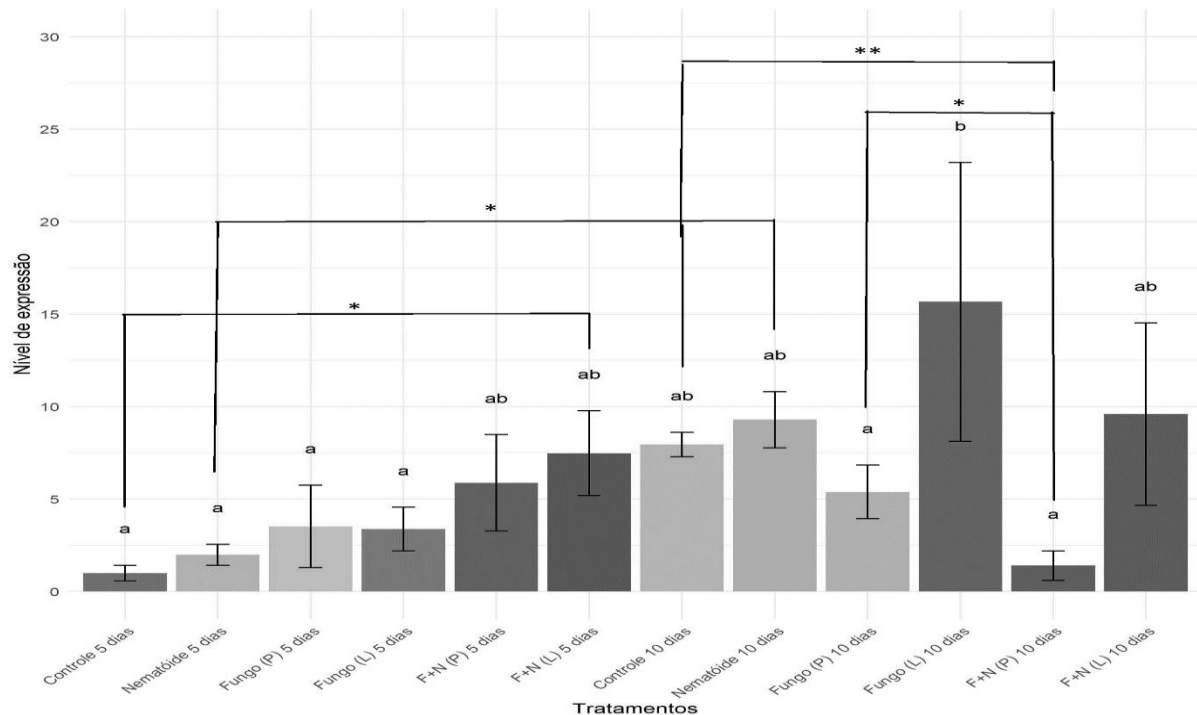


Figura 11 - Níveis de expressão do gene Hs1pro-1 obtidos por RT-qPCR. A expressão foi realizada através das folhas da cultivar Desafio coletadas após cinco (5D) e dez (10D) dias de tratamento. As siglas utilizadas nos gráficos são referentes a: N= nematoides, F= resíduo fúngico, quando associado ao (L)= resíduo fúngico de *Lentinula edodes*, e quando associado ao (P)= resíduo fúngico de *Pleurotus eryngii*. Cada barra representa a variação na expressão gênica dos valores médios de Ct derivados de duas repetições técnicas, derivadas de três repetições biológicas de cada tratamento. Sendo assim, a variação foi calculada utilizando o método $2^{-\Delta Ct}$, sendo normalizados através dos genes endógenos (ACT11 e CYP). As barras representam os valores de desvio padrão, letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos através do Teste de Tukey ($P < 0,05$). Os asteriscos ligando os tratamentos significam diferenças estatísticas através do teste T de Student, em que o nível de significância se dá por: (*) $p \leq 0,05$; (**) $0,01 \leq p < 0,05$.

As plantas tratadas com nematoides e resíduo fúngico de *P. eryngii* em 10 dias, comparada ao tratamento de plantas apenas com nematoides, levou a uma redução de aproximadamente 6,6 vezes na expressão genica de Hs1-pro1 (Fig. 6). Esse resultado pode levar em consideração a capacidade nematicida deste fungo, visto que o fungo potencialmente pode ter ocasionado a redução dos juvenis inoculados. Nas folhas das plantas de soja tratadas com resíduo de *P. eryngii* após 10 dias, observou-se o aumento de 3,8 vezes na expressão de Hs1pro-1, se comparado as plantas tratadas com o mesmo resíduo e nematoide (Fig. 11).

Hs1pro-1 é um gene de resistência encontrado em beterraba específico contra *Heterodera schachtii*, que se acredita pertencer a classe de genes de resistência (R). Este gene pode levar ao impedimento do ciclo de vida do nematoide, pois causa a degradação do sincício na planta hospedeira, estrutura alimentar, normalmente levando a morte do estágio J2.

(WENDLAND, 2003). Morales et al. (2009) observaram aumento na expressão de Hs1-pro1 em genótipos resistentes de soja inoculados com *Meloidogyne javanica* comparado aos não infectados, levantando a hipótese de que pode estar envolvido na degeneração das células gigantes formadas por nematoide das galhas.

No presente trabalho também não observamos diferenças significativas na expressão deste gene nas plantas controle e plantas inoculadas com *M.incognita*, assim como Morales et al. (2009) observaram em linhagem suscetível de soja (256-S) inoculada com *M.javanica*, níveis iguais na expressão de Hs1pro-1 em população inoculada e não inoculada.

A utilização do resíduo de *Lentinula edodes* em plantas de soja após 10 dias, aumentou a expressão de HS1-pro1 4,6 vezes se comparada ao mesmo tratamento após 5 dias (Fig. 11), o que leva a hipótese de que este resíduo pode atuar como eliciador, induzindo nas plantas respostas de defesa. As plantas de soja tratadas com nematoide e resíduo de *L.edodes* após 5 dias aumentou a expressão de HS1-pro1 em relação as plantas controle aproximadamente 7,4 vezes mais (Fig. 11). Comparando a ação dos dois resíduos associados ao nematoide, *Lentinula edodes* parece atuar na indução da resposta de defesa, associado ao gene HS1-pro1.

6. DISCUSSÃO

No presente trabalho verificamos que a inoculação de *Meloidogyne incognita* nas plantas de soja levou à ativação do gene marcador de etileno (ET) após dez dias. Também houve aumento na expressão do gene relacionado ao ácido jasmônico (JA). Podemos inferir que os dois hormônios atuaram de forma conjunta, mesmo que de forma sistêmica, visto que as folhas foram utilizadas durante esta pesquisa. Algumas pesquisas relacionadas a resposta das plantas a nematoides demonstram que JA está intimamente relacionado com ativação da via de defesa baseada em etileno, sendo este considerado o principal fitormônio envolvido na imunidade inata das plantas em resposta a nematoide das galhas (NAHAR et al., 2012).

A inoculação do resíduo fúngico de *P. eryngii* aos cinco dias parece ter ativado a via dos fitormônios etileno e ácido jasmônico (JA) através da alteração na expressão dos genes marcadores utilizados. Normalmente o etileno ativa a via de JA contra alguns patógenos, normalmente os necrotóficos porém, sua atividade varia dependendo da infecção, tecido e patógeno utilizado. Quando observamos a expressão do gene ETR1 em plantas de soja inoculadas com nematoide e o mesmo resíduo fúngico verificamos aumento considerável se comparada ao controle. O aumento na expressão do receptor de etileno pode ser uma forma da planta controlar as respostas ao hormônio que por algum motivo teve sua síntese aumentada. O hormônio etileno está associado em papéis positivos na defesa contra nematoide das galhas, em contrapartida quando associado a presença de nematoide do cisto apresenta importante papel na infecção e desenvolvimento dos nematoides (HU et al., 2017).

A redução na expressão de ETR1 nas plantas tratadas com nematoides e resíduo de *P. eryngii* comparadas ao tratamento apenas com nematoides pode ter relação com respostas de defesa da planta. A diminuição dos receptores pode indicar que a planta está ativando a sinalização responsiva ao etileno, e se neste caso houve a penetração do nematoide, o fitormônio em questão apresenta papel negativo para seu desenvolvimento (KAMMERHOFER et al., 2015).

O aumento na expressão de JAR1 aos cinco dias nas plantas de soja inoculadas com resíduo de *P. eryngii* é um ponto a ser estudado. O ácido jasmônico aumenta a expressão de inibidores de proteases e vias de metabolitos secundários, relacionados com atividade anti-herbivoria. Como os nematoides também dependem de proteases assim como insetos é possível associar seu papel de defesa nas plantas (GHEYSEN E MITCHUM., 2019). _A tendência em ativação da via do ácido jasmônico no tratamento contendo resíduo de *P. eryngii* e nematoides aos cinco dias parece ser algo favorável. O aumento deste hormônio parece reduzir o

desenvolvimento de fêmeas quando aplicado de forma endógena, enquanto mutações na biossíntese gera efeito contrário. Além do papel significativo contra nematoide das galhas observado em arroz. A aplicação de metil jasmonato (MeJa) reduziu galhas, enquanto mutantes foram mais suscetíveis (Nahar et al., 2011).

O ácido salicílico é importante no processo de infecção de *H. schachtii*, mas durante desenvolvimento do sincício e diferenciação dos nematoides apresenta papel negativo (KAMMERHOFER et al., 2015). A alteração na expressão de SAMT1 em plantas de soja tratadas com nematoides e resíduo de *L.edodes* após dez dias, gera a hipótese que o contato com os dois agentes inoculados aumentou a sinalização de ácido salicílico. Possivelmente, se houve infecção pelo nematoide, o resíduo fúngico em questão gerou respostas nas plantas, com aumento na expressão do gene marcador.

Em um trabalho com nematoides do cisto em tomate, os autores observaram aumento na expressão de genes relacionados ao ácido salicílico em cultivar resistente, acreditando que a resistência esteja associada a hormônio em questão. É então proposto que nas plantas suscetíveis ocorre alguma perturbação desta via, por exemplo, ação de outros fitormônios como etileno e ácido jasmônico (UEHARA et al., 2010). Outro trabalho obteve respostas parecidas, quanto a funcionalidade do ácido salicílico. A superexpressão do gene SAMT1 (associado ao AS) em plantas de soja suscetíveis, ocasionou na redução do desenvolvimento dos nematoides do cisto (LIN et al., 2013).

No presente trabalho observamos que a inoculação de *M. incognita* não causou grandes efeitos sobre o gene SAMT1, podendo gerar duas conclusões distintas. Primeiro, a ação dos outros fitormônios impedindo respostas do ácido salicílico, que inclusive podemos ressaltar as alterações positivas verificadas na via relacionada ao ácido jasmônico. Ou ainda, o mesmo observado em outro trabalho que retrata a falta de efeitos positivos do ácido salicílico na imunidade das plantas contra nematoides das galhas (NAHAR et al., 2011).

O marcador relacionado a via de ácido abscísico, ATAF1 apresentou redução na expressão nas plantas de sojas inoculadas com nematoides após dez dias em relação as plantas controle. Este hormônio desempenha papéis complexos nas diversas respostas a estresses bióticos e abióticos. Sendo em alguns trabalhos associados ao aumento da patogenicidade e em outras com a resistência do vegetal (NAHAR et al., 2012).

A inoculação do resíduo fúngico de *P. eryngii* após cinco dias em plantas de soja levou ao aumento na expressão do gene JAR1, marcador de ácido jasmônico. Este gene codifica a enzima que catalisa a formação de JA-isoleucina (JA-Ile), forma ativa nas respostas de defesa. Em trabalho com tomateiro inoculado com *M. incognita* foi verificado aumento no acúmulo de

JA e JA-Ile nas folhas, demonstrando que a resistência basal depende de JA produzido também na parte aérea (WANG et al., 2019). Apenas o resíduo de *P. eryngii* impulsionou a expressão de JAR1, enquanto quando associado ao nematoide não forneceu resultados distintos ao controle. A presença do nematoide pode ter ocasionado no impedimento da expressão de JAR1.

Em cinco dias foram observados aumentos na expressão do gene marcador de ABA, nos tratamentos de plantas contendo resíduos dos dois fungos: *P. eryngii* e *L.edodes* quando de forma concomitante com nematoides. Em um trabalho com plantas de arroz onde a biossíntese de ABA foi inibida ou ainda a aplicação exógena, houve aumento na formação das galhas e desenvolvimento do nematoides (KYNDT et al., 2017). No caso aqui tratado, o aumento na expressão de ATAF1 provavelmente ocorreu através do contato do resíduo fúngico com as raízes das plantas de soja e não por infecção dos nematoides. Chegamos a esta conclusão a partir do fato que as plantas inoculadas apenas com nematoides não apresentaram aumento na expressão.

O gene Hs1pro-1 relacionado a resistência a *H. schatti* em beterraba açucareira não gerou resultados significativos na maioria dos tratamentos utilizados. Este gene já foi testado em plantas de soja resistentes quando inoculadas com *M. javanica*, havendo aumento na expressão do mesmo (MORALES et al., 2009). Os autores sugerem que este aumento poderia estar relacionado com degeneração das células gigantes, assim como ocorre com os sincícios da beterraba. No presente trabalho, a associação do resíduo fúngico de *L. edodes* e nematoides induziu a expressão de Hs1pro-1 nas folhas das plantas de soja após cinco dias, resultado interessante, visto que sua indução ocorre em plantas resistentes e utilizamos uma cultivar suscetível para análise. Estudos complementares podem ser realizados para averiguar a causa deste aumento e o efeito sobre os nematoides.

No presente trabalho, avaliamos também a expressão do gene CHS (codifica a enzima chalcona sintase, presente na biossíntese de flavonoides) nas folhas de plantas de soja. Observamos o aumento na expressão após dez dias de inoculação com *M.incognita*, que pode estar associado a tentativa de penetração nas raízes. Este gene normalmente está expresso em baixas condições em tecidos sem estresse, sendo sua expressão aumentada quando em contato com patógenos, luz ultravioleta, etc. Em relação aos nematoides os produtos desta via podem ter diversas funcionalidades como atrair ou repelir das raízes, diminuir seus movimentos e até mata-los. A produção de flavonoides também pode ser aumentada devido a ação de hormônios como ácido salicílico, ácido jasmônico, auxina, etileno, etc. (CHIN et al., 2018; DAO et al., 2011). Nos tratamentos utilizando resíduo fúngico de *P. eryngii* sozinho, ou em associação com nematoides após dez dias gerou a redução na expressão de CHS em plantas de soja. Este

resultado pode ter sido gerado devido a ação dos compostos presentes no resíduo fúngico sobre os juvenis, impedindo que chegassem as raízes e penetrassem. Este gene foi expresso em plantas de soja resistente inoculadas com *M. javanica* (MORALES et al., 2009; WENDLAND., 2005).

7. CONCLUSÃO

- ✓ A inoculação de *Meloidogyne incognita* em plantas de soja, após dez dias, levou ativação da via relacionada ao Ácido jasmônico. Observamos a redução da atividade das vias relacionadas ao Etileno e Ácido abscísico e aumento da expressão do gene CHS, que codifica chalcona sintase, enzima chave na biossíntese de flavonoides, com ação antimicrobiana.
- ✓ A inoculação do resíduo de *L. edodes* após cinco dias evidencia a ativação da via relacionada ao Ácido abscísico, com aumento na expressão de ATAF1 nas folhas de plantas de soja.
- ✓ Ao inocular resíduo fúngico de *Lentinula edodes* e *Meloidogyne incognita* após cinco dias verificou-se aumento na expressão de ATAF1 (Ácido abscísico) nas folhas de plantas de soja.
- ✓ A inoculação de *L. edodes* e *M. incognita* após cinco dias em plantas de soja ocasionou o aumento na expressão de Hs1pro-1 nas folhas, condição verificada apenas neste tratamento.
- ✓ Ao inocular resíduo fúngico de *Lentinula edodes* e *Meloidogyne incognita*, após dez dias, em plantas de soja, observou-se aumento na expressão do gene SAMT1, e provavelmente ativação da via relacionada ao Ácido salicílico nas folhas.
- ✓ A inoculação do resíduo fúngico de *Pleurotus eryngii* em plantas de soja, após cinco dias, podem ativar as vias relacionadas ao Ácido salicílico, Ácido jasmônico e Etileno.
- ✓ Ao inocular resíduo fúngico de *Pleurotus eryngii* e *M. incognita* em plantas de soja, após cinco dias, ocorre ativação da via relacionada ao Ácido abscísico nas folhas.
- ✓ Ao inocular resíduo fúngico de *Pleurotus eryngii* e *Meloidogyne incognita*, após dez dias, observou-se a redução da expressão do gene relacionado ao Ácido abscísico (ATAF1) e também dos genes Hs1pro-1 e CHS nas folhas de plantas de soja.
- ✓ De forma geral, a inoculação dos resíduos fúngicos ou ainda simultaneamente com *Meloidogyne incognita*, demonstrou ativar vias relacionadas aos hormônios vegetais, e possivelmente gera respostas de defesa nas folhas de plantas de soja.

REFERÊNCIAS

- ABAD, P. et al., Genome sequence of the metazoan plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. **Nature Biotechnology**, v. 26, n. 8, p. 909-915, 2008.
- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. Elsevier Academic Press. 5 ed. p. 952, 2005.
- AHMAD, G. et al. Biological control: a novel strategy for the control of the plant parasitic nematodes. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 114, p. 885-912, 2021.
- AKBAR, F. et al. The role of phytohormones in combating biotic stress. **Plant Growth Regulators for Climate-Smart Agriculture**, p. 187–206, 2021.
- ALI, M. S.; BAEK, K. H. Jasmonic acid signaling pathway in response to abiotic stresses in plants. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 2, 2 jan. 2020.
- ANAMIKA, R.; ARCHANA, T. Shiitake mushroom (*Lentinula edodes*): an importante macrofungus with pharmacological activities. **International Journal of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine**. v. 10, n. 2, 2022.
- APROSOJA**. Associação dos Produtores de Soja e Milho de Mato Grosso. A história da soja. 2012. Disponível em: <<http://www.aprosoja.com.br/soja-e-milho/a-historia-da-soja>>. Acesso em: 27 jul. 2022.
- ARIAS, C. A. A.; CAMPO, C. B. H.; SOARES, R. M.; MEYER, M. C. Contribuição do melhoramento genético da soja para o manejo de doenças e pragas. IN: MEYER, M. C. BUENO, A. F. MAZARO, S. M. DA SILVA, J. C. **Bioinsumos na cultura da soja**. 1 ed. Brasília: EMBRAPA SOJA, 2022. p. 53-72.
- ARIF, Y. et al. Salicylic acid in relation to other phytohormones in plant: A study towards physiology and signal transduction under challenging environment. **Environmental and Experimental Botany**, v. 175, p. 104040, 2020.
- ARRAES, F. B. M. et al. Implications of ethylene biosynthesis and signaling in soybean drought stress tolerance. **BMC Plant Biology** 2015 15:1, v. 15, n. 1, p. 1–20, 2015.
- ASGHARI, M.; AGHDAM, M. S. Impact of salicylic acid on post-harvest physiology of horticultural crops. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, n. 10, p. 502–509, 2010.
- BACCARI, C.; ANTONOVA, E.; LINDOW, S. Biological control of pierce’s disease of grape by an endophytic bacterium. **Phytopathology**, v. 109, n. 2, p. 248–256, 2019.
- BALBINOT JUNIOR, A. A.; NEPOMUCENO, A. L.; HIRAKURI, M. H.; FRANCHINI, J. C.; DEBIASI, H.; COELHO, A. E. Análise da produção, área cultivada, produtividade e estabilidade produtiva da soja nos estados brasileiros em 25 safras (1996/1997 a 2020/2021). Londrina: Embrapa Soja. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Soja, 27) 20 p, 2022.
- BARI, R.; JONES, J. D. G. Role of plant hormones in plant defence responses. **Plant molecular biology**, v. 69, n. 4, p. 473–488, 2009.
- BARON, N.C.; RIGOBELLO, E.C.; ZIED, D.C. Filamentous fungi in biological control: current status and future perspectives. **Chilean journal of agricultural research**, v.79, n. 2, p. 307–315, 2019.

- BARROS, F. C.; SAGATA, E.; FERREIRA, L. C. C.; JULIATTI, F. C. Indução de resistência em plantas contra fitopatógenos. **Bioscience Journal**, v. 26, n. 2, p. 231-239, 2010.
- BHATTARAI, K. K. et al. Tomato susceptibility to root-knot nematodes requires an intact jasmonic acid signaling pathway. **Molecular plant-microbe interactions: MPMI**, v. 21, n. 9, p. 1205–1214, 2008.
- BINDER, B. M. Ethylene signaling in plants. **Journal of Biological Chemistry**, v. 295, n. 22, p. 7710–7725, 2020.
- BONETI, J. I. S.; FERRAZ, S. Modificação do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de raízes de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.6, p. 553, 1981.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **AGROFIT**. 2022. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 7 jul. 2022.
- BUENO, V., H., P., LINS, JR., J., C., JUNIOR, A. M., SILVEIRA, L. C. P. **Controle biológico e manejo de pragas na agricultura sustentável**. Departamento de Entomologia/UFLA, Lavras, p. 52, 2016.
- CAMPOS, M. L.; KANG, J. H.; HOWE, G. A. Jasmonate-triggered plant immunity. **Journal of chemical ecology**, v. 40, n. 7, p. 657–675, 2014.
- CARNEIRO, R. G. Princípios e tendências do controle biológico de nematoides com fungos nematófagos. **Pesquisa agropecuária Brasileira**. Brasília, v.27, p.113-121, 1992.
- CARVALHO, Patrícia Honorato de. **Controle biológico e alternativo de *Meloidogyne incognita* e *M. Javanica* em tomateiro**. 2017. 98 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Fitopatologia, Departamento de Fitopatologia, Universidade de Brasília, Brasília, 2017. Disponível em: <[https://repositorio.unb.br/bitstream/10482/23402/1/2017_Patr%^c3%^adciaHonoratodeCarvalho.pdf](https://repositorio.unb.br/bitstream/10482/23402/1/2017_Patr%c3%adciaHonoratodeCarvalho.pdf)> Acesso em: 19 jul. 2022.
- CHAIYADIT, K.; CHAIRIN, T. Potential of edible mushroom *Pleurotus spp.* for controlling root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) and their cuticle degrading enzyme production. **Songklanakarinn Journal of Science and Technology**, v.44, n. 1, p. 60-65, 2022.
- CHIN, S.; BEHM, C. A.; MATHESIUS, U. Functions of flavonoids in plant–nematode interactions. **Plants**, v. 7, n. 4, 1 dez. 2018.
- COMANS-PÉREZ, R. J. et al. Biological control of sheep nematode *Haemonchus contortus* using edible mushrooms. **Biological Control**, v. 152, p. 104420, 2021.
- CONAB. Boletim da safra de grãos. Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos, Safra 2020/21 – Décimo levantamento. Companhia Nacional de Abastecimento. v.9, n. 10 Brasília, p.1-87, julho, 2022. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos>>. Acesso em: 06 agosto 2022.
- CROPLIFE. Cresce a adoção de produtos biológicos pelos agricultores brasileiros. **Croplife Brasil**. 2021. Disponível em: < <https://croplifebrasil.org/noticias/cresce-a-adocao-de-produtos-biologicos-pelos-agricultores-brasileiros/>>. Acesso em: 02 jul. 2022.

CRUZ-ARÉVALO, J. et al. Chemical composition of an anthelmintic fraction of *Pleurotus eryngii* against eggs and infective larvae (L3) of *Haemonchus contortus*. **BioMed Research International**, v. 2020, 2020.

DAO, T. T. H.; LINTHORST, H. J. M.; VERPOORTE, R. Chalcone synthase and its functions in plant resistance. **Phytochemistry Reviews**, v. 10, n. 3, p. 397, set. 2011.

DASGUPTA, M. K.; KHAN, M. R. Nematophagous Fungi: Ecology, Diversity and Geographical Distribution. In: ASKARY, T. H.; MARTINELLI, P. R. P. (ed.). **Biocontrol Agents of Phytonematodes**. Wallingford: CABI, p. 480, 2015.

DE OLIVEIRA, C. M. G; ROSA, J. M. O. **Nematoides Parasitos da Alface**. São Paulo: Instituto Biológico, 2019. 14 p. Disponível em: <http://www.biológico.agricultura.sp.gov.br/uploads/files/pdf/prosaf/apostilas/nematoides_alf ace.pdf> Acesso em: 12 abr. 2022.

DE SOUZA, V. H. M.; ROMA-LAMEDIA, C. C.; DE MELO, T. A.; REZENDE, D. C.; INOMOTO, M. M.; PASCHOLATI, S. F. Fitonematoides: controle biológico e indução de resistência. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. v. 23, p. 242-292, 2015.

DIAS, W. P.; GARCIA, A.; SILVA, J.F.V.; CARNEIRO, G.E.S. **Nematoides em soja: Identificação e Controle**. Londrina: Embrapa Soja, 1- 8 p. 2010. (Circular Técnica 76).

DIAS-ARIEIRA, C. R. SANTANA-GOMES, S. M. MIAMOTO, A. MACHADO, A. C. Z. Manejo biológico de nematoides. IN: MEYER, M. C. BUENO, A. F. MAZARO, S. M. DA SILVA, J. C. **Bioinsumos na cultura da soja**. 1 ed. Brasília: EMBRAPA SOJA, 2022. p. 345-358.

DONG, J. Y.; ZHAO, Z. X.; CAI, L.; LIU, S. Q.; ZHANG, H. R.; DUAN, M.; ZHANG, K. Q. Nematicidal effect of freshwater fungal cultures against the pine-wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. **Fungal Diversity**, v. 15, p. 123-133, 2004.

ESTADOS UNIDOS. Department of Agriculture. **USDA** - United States Department of Agriculture. Disponível em: < <https://www.usda.gov/> > . Acesso em: 06 Jun. 2022.

FERRAZ, L. C. C. B. Nematoides. In: AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; REZENDE, J. A. M. **Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos**. v. 1. 5. ed. São Paulo: Agronômica Ceres. p. 1-18, 2011.

FERRAZ, L. C. C. B.; ASMUS, G. L.; CARNEIRO, R. G.; MAZAFFERA, P.; SILVA, J. F. V. **Relações parasito-hospedeiro nas meloidoginoses da soja**. Londrina: Embrapa Soja: Sociedade Brasileira de Nematologia. 1. ed. p. 127, 2001.

FERRAZ, L. C. C. B.; BROWN, D. J. F (org.). **Nematologia de plantas: Fundamentos e importância**. Manaus: Norma Editora, 2016.

FERRAZ, S.; SANTOS, M. A. DOS. Controle Biológico de Fitonematoides pelo uso de fungos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 3, p. 283-314, 1995.

FERREIRA, J. M.; BRAGA, F. R.; SOARES, F. E. DE F. Nematicidal activity of the *Lentinula edodes*' spent mushroom compost. **South African Journal of Botany**, v. 146, p. 101-102, 2022.

FONTES, E. M. G.; VALADARES-INGLIS, M. C. (ed.). **Controle biológico de pragas da agricultura**. Brasília: Empraba, 1. ed. p. 510, 2020.

FRANCISCO, B. G. F. et al. Advances in the biological control of phytoparasitic nematodes via the use of nematophagous fungi. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 37, n. 3, p. 180, 2021.

FREITAS, M. A.; PEDROSA, E. M. R.; MARIANO, R. L. R.; MARANHÃO, S. R. V. L. Seleção de *Trichoderma spp.* como potenciais agentes para bioncontrole de *Meloidogyne incognita* em cana-de-açúcar. **Nematropica**, v. 42, n. 1, p. 115-122, 2012.

GAZZONI, D. L.; DALL'AGNOL, A. Paralelo entre a soja no mundo e no Brasil. In: **SOJA: quebrando recordes: CESB: 10 anos de máxima produtividade**. Sorocaba: CESB, 2018. p. 37-59.

GHAEMI, R. et al. Molecular insights into the compatible and incompatible interactions between sugar beet and the beet cyst nematode. **BMC Plant Biology**, v. 20, n. 1, p. 1–16, 2020.

GHEYSEN, G. MITCHUM, M. G. Phytoparasitic nematode control of plant hormone pathways. **Plant Physiology**, 179 (4), 1212–1226, 2019.

GONÇALVES, S. L. et al. **Rotação de culturas**. Embrapa, Circular Técnica, n. 45, 2007. Disponível em: < <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPSO-2009-09/27612/1/circotec45.pdf> >, acesso em: 02 jun. 2022.

GRIGOLLI, J. F. J.; ASMUS, G. L. Manejo de nematoides na cultura da soja. In: LOURENÇÃO, A. L. F.; GRIGOLLI, J. F. J.; MELOTTO, A. M.; PITOL, C.; GITTI, D. de C.; ROSCOE, R. (Ed.) **Tecnologia e produção: Soja 2013/2014**. Maracaju: Fundação MS, 2014.

HAHN, M. H. et al. Nematophagous mushrooms can be an alternative to control *Meloidogyne javanica*. **Biological Control**, v. 138, p. 104024, 2019.

HALFED-VIEIRA, B. A.; MARINHO-PRADO, J. S.; NECHET, K. L.; MORANDI, M. A. B.; BETTIOL, W. (ed.). **Defensivos Agrícolas Naturais: uso e perspectivas**. Brasília: Embrapa. 1. ed. 2016.

HEARST, R. et al. An examination of antibacterial and antifungal properties of constituents of Shiitake (*Lentinula edodes*) and Oyster (*Pleurotus ostreatus*) mushrooms. **Complementary Therapies in Clinical Practice**, v. 15, n. 1, p. 5–7, 2009.

HELLEMANS, J. et al. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. **Genome Biology**, v. 8, n. 2, p. 1–14, 2008.

HENNING, A. A.; ALMEIDA, A. M. R.; GODOY, C. V.; SEIXAS, C. D. S.; YORINORI, J. T.; COSTAMILAN, L. M.; FERREIRA, L. P.; MEYER, M. C.; SOARES, R. M.; DIAS, W. P. **Manual de identificação de doenças de soja**. Londrina: Embrapa Soja, 5 ed. p. 1-76, 2014. (Documentos 256).

HIRAKURI, H. M.; LAZZAROTTO, J. J. **O agronegócio da soja nos contextos mundial e brasileiro**. Documentos Embrapa, v. n. 349, p. 1–37, 2014.

HIRAKURI, M. H. et al. A Cultura da Soja no Brasil e metodologia utilizada para o diagnóstico. In: **Diagnóstico da produção de soja na macrorregião sojícola 4**. 1 ed. Londrina: Embrapa Soja, 2019. p. 11–23. (Documentos 412).

- HOFFMANN-CAMPO, C. et al. **Pragas da soja no Brasil e seu manejo integrado**. Circular Técnica. Embrapa Soja. n. 30, p. 70, 2000.
- HU, R. et al. Evaluation of putative reference genes for gene expression normalization in soybean by quantitative real-time RT-PCR. **BMC Molecular Biology**, v. 10, n. 1, p. 93, 2009.
- HU, Y. et al. Ethylene response pathway modulates attractiveness of plant roots to soybean cyst nematode *Heterodera glycines*. **Scientific Reports**, 7, 2017.
- HUA, J.; MEYEROWITZ, E. M. Ethylene Responses Are Negatively Regulated by a Receptor Gene Family in *Arabidopsis thaliana*. **Cell**, v. 94, n. 2, p. 261–271, 24 jul. 1998.
- JANSSON, H.; LOPEZ-LLORCA, L. V. Control of nematodes by fungi. In: ARORA, D. K. (ed.). **Fungal biotechnology in agriculture, food, and environmental applications**. New York: Dekker, p. 205-215, 2004.
- KAMMERHOFER, N. et al. Role of stress-related hormones in plant defence during early infection of the cyst nematode *Heterodera schachtii* in *Arabidopsis*. **The New phytologist**, v. 207, n. 3, p. 778–789, 1 ago. 2015.
- KHANNA, K. et al. Evaluation of the role of rhizobacteria in controlling root-knot nematode infection in *Lycopersicon esculentum* plants by modulation in the secondary metabolite profiles. **AoB PLANTS**, v. 11, n. 6, 1 nov. 2019.
- KOO, Y. J. et al. Overexpression of salicylic acid carboxyl methyltransferase reduces salicylic acid-mediated pathogen resistance in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Molecular Biology**, v. 64, n. 1–2, p. 1–15, 16 maio 2007.
- KYNDT, T. et al. Interplay between carotenoids, abscisic acid and jasmonate guides the compatible rice-Meloidogyne graminicola interaction. **Frontiers in Plant Science**, 8, 2017.
- LI, J.; ZOU, C.; XU, J.; JI, X.; NIU, X.; YANG, J.; HUANG, X.; ZHANG, K. Molecular mechanisms of nematode-nematophagous microbe interactions: basis for biological control of plant-parasitic nematodes. **Annual Review Of Phytopathology**, v. 53, n. 1, p. 67-95, 2015.
- LI, Q. et al. Validation of reference genes for real-time quantitative PCR normalization in soybean developmental and germinating seeds. **Plant Cell Reports**, v. 31, n. 10, p. 1789-1798, 2012.
- LIMA, I. M.; VENTURA, J. A.; COSTA, H.; ARPINI, B. S.; MARTINS, M. V. V. Bionematicidas contemporâneos: aplicabilidade e importância no manejo de fitonematoides em áreas agrícolas. **Incaper em Revista**, v. 10, p. 90-104, 2019.
- LIN, J. et al. Overexpression of a soybean salicylic acid methyltransferase gene confers resistance to soybean cyst nematode. **Plant Biotechnology Journal**, v. 11, n. 9, p. 1135–1145, 2013.
- LIU, X.; XIANG, M.; CHE, Y. The living strategy of nematophagous fungi. **Mycoscience**, v. 50, n. 1, p. 20-25, 2009.
- LOPES, E. A.; FERRAZ, S.; FERREIRA, P. A.; FREITAS, L. G.; DHINGRA, O. D.; GARDIANO, G.; CARVALHO, S. L. Potencial de Isolados de Fungos Nematófagos no Controle de *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, v. 31, n. 2, p. 20-26, 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.
- MA, Q.; DONG, C. H. Regulatory functions and molecular mechanisms of ethylene receptors and receptor-associated proteins in higher plants. **Plant Growth Regulation**. v. 93, n. 1, p. 39–52, 2020.
- MÉTRAUXS, J. P. Systemic acquired resistance and salicylic acid: current state of knowledge. **European Journal of Plant Pathology**, v. 107, n. 1, p. 13-18, 2001.
- MORALES, A. M. A. P.; LEMOS, E. G. M.; FUGANTI, R.; MARIN, S. R. R.; MARCELINO, F. C.; SILVA, J. F. V.; PEREIRA A. A.; NEPOMUCENO, A. L. Expressão de genes envolvidos na resistência da soja a *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, v. 33, n. 3, p. 226-234, 2009.
- MOTA, M. A.; CAMPOS, A. K.; DE ARAUJO, J. V. Controle biológico de helmintos parasitos de animais: estágio atual e perspectivas futuras. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, n. 3, v. 23, p. 93-100, 2003.
- MOURA, R. M.; O gênero *Meloidogyne* e a meloidoginose parte III – resenha histórica. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**. Recife. v. 13/14, p. 93-144, 2016/2017
- MUNDSTOCK, C. M.; THOMAS, A. L. **Soja: fatores que afetam o crescimento e o rendimento de grãos**. Biblioteca Setorial da Faculdade de Agronomia da UFRGS, p. 31, 2005.
- NAHAR, K. et al. The Jasmonate Pathway Is a Key Player in Systemically Induced Defense against Root Knot Nematodes in Rice. **Plant Physiology**, 157(1), 305–316, 2011.
- NAHAR, K. et al. Abscisic acid interacts antagonistically with classical defense pathways in rice-migratory nematode interaction. **The New Phytologist**, 196(3), 901–913, 2012.
- NEPOMUCENO, A. L.; FARIAS, J. R. B.; NEUMAIER, N. **CARACTERÍSTICAS DA SOJA**. EMBRAPA, 2021. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/en/agencia-de-informacao-tecnologica/cultivos/soja/pre-producao/caracteristicas-da-especie-e-relacoes-com-o-ambiente/caracteristicas-da-soja>> Acesso em: 27 jul. 2022.
- NETO, A. A. DE O. (org). **A produtividade da soja: análise e perspectivas**. Brasília: CONAB, v. 10, 2017.
- NIAZI, A. R.; GHAFOOR, A. Different ways to exploit mushrooms: A review. **All life**. v. 14, n. 1, p. 450–460, 2021.
- NORDBRING-HERTZ, B.; JANSSON, H.; TUNLID, A. Nematophagous fungi. **Els**, p. 1-13, 2011.
- OLIVEIRA, A. C. de. et al. **Ácido abscísico e o estresse abiótico**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 1 ed. p. 30, 2010. (Documentos 307).
- OLIVEIRA, A. C. **Extrato aquoso de shiitake na indução de resistência e controle de doenças de feijoeiro e videira**. 2015. 78 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Agronomia, Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, 2015. Disponível em:

<https://silo.tips/download/extrato-aquoso-de-shiitake-na-inducao-de-resistencia-e-controle-de-doenas-de-feij>. Acesso em: 19 jul. 2022.

OLIVEIRA, S. P. **Utilização de resíduos industriais da produção de cogumelos comestíveis no controle biológico de *Meloidogyne incognita* em soja**. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Aplicada) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, p. 35. 2020.

PAL, K. K.; GARDENER, B. M.; Biological control of plant pathogens. **The Plant Health Instructor**, p. 1-25, 2006.

PERES, L. E. P.; **Metabolismo secundário**. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, USP –São Paulo, 2004. Disponível em: <[http://www2.ufpel.edu.br/biotecnologia/gbiotec/site/content/paginadoprofessor/ce5449dfcf0e02f741a5af86c3c5ae9a.pdf?PHPSESSID=e32d8df36f08f86ef80010a253f33762](http://www2.ufpel.edu.br/biotecnologia/gbiotec/site/content/paginadoprofessor/uploadsprofessor/ce5449dfcf0e02f741a5af86c3c5ae9a.pdf?PHPSESSID=e32d8df36f08f86ef80010a253f33762)> Acesso em: 15 set. 2022.

PIETERSE, C. M. J.; ZAMIOUDIS, C.; BERENDSEN, R. L.; WELLER, D. M.; VAN WEES, S. C. M.; BAKKER, P. A. H. M. Induced systemic resistance by beneficial microbes. **Annual Review Of Phytopathology**, v. 52, n. 1, p. 347-375, 2014.

PINHEIRO, J. B.; CARVALHO, A. D. F. de.; VIEIRA, J. V. **Manejo do nematoide-das-galhas (*Meloidogyne spp.*) em cultivos de cenoura na Região de Irecê - BA**. Brasília: Embrapa Hortaliças (Comunicado Técnico, 77) p. 7. 2010. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/139649/1/cot-77.pdf>> Acesso em: 25 jul. 2022.

PINHEIRO, J. B.; RODRIGUES, C. S.; CARVALHO, A. D. F.; PEREIRA, R. B. **Nematoides na cultura da batata-doce**. Brasília, Distrito Federal: Embrapa Hortaliças (Circular técnica, 105) 9 p. 2012. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/72268/1/ct-1051.pdf>> Acesso em: 25 jul. 2022.

POORNIMA, K; BALAMURALI, A. Inhibitory potential of ethyl acetate extract from mushrooms against root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*). **Journal of Entomology and Zoology Studies**, v. 9, n. 1, p. 528–534, 2021.

RAMEGOWDA, V. et al. Abiotic and biotic stress interactions in plants: A cross-tolerance perspective. **Priming-mediated stress and cross-stress tolerance in crop plants**, p. 267–302, 2020.

RODRÍGUEZ-BARRERA, T. M. et al. Edible mushrooms of the genus **Pleurotus** as biocontrol agents of parasites of importance for livestock. **Scientia Fungorum**, v. 52, p. 1375, 2021.

RUAN, J. et al. Jasmonic Acid Signaling Pathway in Plants. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 10, 2019.

SANTAMARIA, A.; DA SILVA, T. M.; RUIZ, J. G. C. L.; MARTINELLI, P. R. P.; COSTA, R. S. S. Uso de fungos nematófagos no controle de *Meloidogyne incognita* em berinjela. **Science and Technology Innovation in Agronomy**, v. 1, n. 1, p. 63-71, 2017.

SANTANA-SANTOS, I. V. et al. Comestible fungi and native microbiota in the control of gall-forming nematodes. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, v. 15, n. 2, 2022.

SANTOS, J. F. S.; TEIXEIRA, J. L.; SANTOS, J. Silva.; MENDONÇA, J. J.; SANTOS, T. A. C.; GÓIS, L. S.; LOPES, L. J. O.; SOUZA, A. L.; MARINO, R. H. Interação microbiana e

fertilizante Protector ® NM no controle de *Meloidogyne incognita*. **Scientia Plena**, v. 14, n. 10, p. 1-9, 2018.

SAXENA, G. Biological control of root-knot and cyst nematodes using nematophagous fungi. In: Giri, B., Prasad, R., Varma, A. (eds) **Root Biology. Soil Biology**, v. 52. Springer p. 221–237, 2018.

SBN. Sociedade Brasileira de Nematologia. Danos na produção de soja causados pelos nematoides, 2017. Disponível em: < <https://nematologia.com.br/index.php>>. Acesso em: 12 mar. 2022.

SEIXAS et al. Manejo de doenças. In: SEIXAS, C. D. S.; NEUMAIER, N.; BALBINOT JUNIOR, A. A.; KRZYZANOWSKI, F. C.; LEITE, R. M. V. B. C. **Tecnologias de produção de soja**. Embrapa Soja. p. 227- 263. 1ed. Londrina, 2020.

SELIG, P. et al. Jasmonate-dependent plant defenses mediate soybean thrips and soybean aphid performance on soybean. **Arthropod-Plant Interactions**, v. 10, n. 4, p. 273–282, 2016.

SIDDIQUI, Z. A.; MAHMOOD, I. Biological control of plant parasitic nematodes by fungi: a review. **Bioresource Technology**, v. 58, n. 3, p. 229-239, 1996.

SILVA, J. C. P.; TERRA, W.C.; FREIRE, E.S.; CAMPOS, V.P.; CASTRO, J.M.C. Aspectos gerais e manejo de *Meloidogyne enterolobii*. In: **Sanidade de Raízes**. Núcleo de estudos em Fitopatologia, 1ª edição, São Carlos, SP: Suprema Grafia e Editora, p. 59-77. 2014.

SILVA, F. M. Da. et al. Strategies to select soybean segregating populations with the goal of improving agronomic traits. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 40, n. 1, p. e39324, 2018.

SILVA, M. N. et al. Role of methyl jasmonate and salicylic acid in kiwifruit plants further subjected to *Psa* infection: biochemical and genetic responses. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 162, p. 258–266, 2021.

SOARES, F. E. F.; NAKAJIMA, V. M.; SUFIATE, B. L.; SATIRO, L. A. S.; GOMES, E. H.; FRÓES, F. V.; SENA, F. P.; BRAGA, F. R.; QUEIROZ, J. H. Proteolytic and nematicidal potential of the compost colonized by *Hypsizygus marmoreus*. **Experimental Parasitology**, v. 197, p. 16-19, 2019.

SOARES, F. E. F.; SUFIATE, B. L.; 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.

SOARES, P.; DO NASCIMENTO, D. Integrated nematode management of root lesion and root-knot nematodes in soybean in Brazil. In: SIKORA, R. A.; DESAEGER, J.; MOLENDIJK, L. (Ed.) **Integrated Nematode Management: State-Of-The-Art and Visions for the Future**. CABI, 2021.

SONG, H. et al. The *Meloidogyne javanica* effector Mj2G02 interferes with jasmonic acid signalling to suppress cell death and promote parasitism in Arabidopsis. **Molecular plant pathology**, v. 22, n. 10, p. 1288–1301, 1 out. 2021.

STUDHAM, M. E.; MACINTOSH, G. C. Multiple phytohormone signals control the transcriptional response to soybean aphid infestation in susceptible and resistant soybean plants. **Mol Plant Microbe Interact.** v. 26, n. 1, p. 116–129, 2012.

SUFIATE, B. L. et al. Nematicidal action of *Pleurotus eryngii* metabolites. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 12, p. 216–219, 1 out. 2017.

- THEMUHI, M. et al. In vitro screening of macro basidiomycetous fungi against root knot nematode, *Meloidogyne incognita*. **Journal of Entomology and Zoology Studies**, v. 8, n. 6, p. 641–644, 2020.
- THURAU, T. et al. The promoter of the nematode resistance gene Hs1 pro-1 activates a nematode-responsive and feeding site-specific gene expression in sugar beet (*Beta vulgaris L.*) and *Arabidopsis thaliana* **Plant Molecular Biology**. v. 52, n. 3, p. 643-660, 2003.
- TIEMAN, D. M. et al. The tomato ethylene receptors NR and LeETR4 are negative regulators of ethylene response and exhibit functional compensation within a multigene family. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 10, p. 5663–5668, 9 maio 2000.
- TON, J.; VAN PELT, J. A.; VAN LOON, L. C.; PIETERSE, C. M. J. Differential effectiveness of salicylate-dependent and jasmonate/ethylene-dependent induced resistance in *Arabidopsis*. **Molecular Plant-Microbe Interactions®**, v. 15, n. 1, p. 27-34, 2002.
- UEHARA, T. et al. Resistant and Susceptible Responses in Tomato to Cyst Nematode are Differentially Regulated by Salicylic Acid. **Plant and Cell Physiology**, 51(9), 1524–1536, 2010.
- VANTHANA, M. et al. Flagellin and elongation factor of *Bacillus velezensis* (VB7) reprogramme the immune response in tomato towards the management of GBNV infection. **Journal of virological methods**, v. 301, 1 mar. 2022.
- VERHAGEN, B. W. M.; VAN LOON, L. C.; PIETERSE, C. M. J. Induced disease resistance signaling in plants. floriculture, **Ornamental and Plant Biotechnology**, v. 3, p. 334-343, 2006.
- VIVIAN, R.; QUERINO, R. B. Mercado de agentes de controle biológico. In: FONTES, E. M. G.; VALADARES-INGLIS, M. C. (ed.). **Controle biológico de pragas da agricultura**. Brasília: Embrapa, 1. ed. p. 501-510, 2020.
- VOLPATO, L. **Seleção de progênies de soja para produção de grãos com uso de modelos mistos**. Dissertação, p.78, Universidade Federal de Viçosa – UFV, Viçosa, MG. 2016.
- WAICHMAN, A.V. A problemática do uso de agrotóxicos no Brasil: a necessidade de construção de uma visão compartilhada por todos os atores sociais. **Revista Brasileira de Saúde Ocupacional**. São Paulo, 37 (125): 17-50, 2012.
- WALTERS, D. R.; RATSEP, J.; HAVIS, N. D. Controlling crop diseases using induced resistance: challenges for the future. **Journal Of Experimental Botany**, v. 64, n. 5, p. 1263-1280, 2013.
- WANG, G. et al. Systemic root-shoot signaling drives jasmonate-based root defense against nematodes. **Current Biology**, v. 29, n. 20, p. 3430- 3438.e4, 21 out. 2019.
- WANG, Y. et al. Genome wide identification and expression profiling of ethylene receptor genes during soybean nodulation. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, 2017.
- WANG, Y. et al. iTRAQ-based proteomic analysis reveals the role of the biological control agent, *Sinorhizobium fredii* strain sneb183, in enhancing soybean resistance against the soybean cyst nematode. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 2002, 11 dez. 2020.
- WASILEWSKA, A. et al. An update on abscisic acid signaling in plants and more. **Molecular Plant**, v. 1, n. 2, p. 198–217, 2008.

- WASTERACK, C.; HAUSE, B. Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*. **Annals of Botany**, v. 111, n. 6, p. 1021–1058, 2013.
- WENDLAND, Adriane. **Expressão gênica da interação soja - *Meloidogyne javanica* via microarranjos de DNA**. 2005. 144 f. Tese (Doutorado) - Curso de Agronomia, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005
- WILLE, C. N.; GOMES, C. B.; MINOTTO, E.; NASCIMENTO, J. S. Potential of aqueous extracts of basidiomycetes to control root-knot nematodes on lettuce. **Horticultura Brasileira**, v. 37, n. 1, p. 54-59, 2019.
- WU, Y. et al. Dual function of Arabidopsis ATAF1 in abiotic and biotic stress responses. **Cell research**, v. 19, n. 11, p. 1279–1290, 2009.
- YOUSSEF, M. M. A.; EL-NAGDI, W. M. A. New approach for biocontrolling root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* on cowpea by commercial fresh oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*). **JJBS**, v. 14, n. 1, 2021.
- ZHANG, B. et al. Extraction, structure and bioactivities of the polysaccharides from *Pleurotus eryngii*: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 150, p. 1342–1347, 2020.
- ZHANG, H. et al. Comparative rna-seq analysis uncovers a complex regulatory network for soybean cyst nematode resistance in wild soybean (*Glycine soja*). **Scientific Reports 2017 7:1**, v. 7, n. 1, p. 1–14, 29 ago. 2017.
- ZHAO, X. C.; SCHALLER, G. E. Effect of salt and osmotic stress upon expression of the ethylene receptor ETR1 in *Arabidopsis thaliana*. **FEBS letters**, v. 562, n. 1–3, p. 189–192, 2004.
- ZHOU, Y. et al. Efficacy of *Bacillus megaterium* strain Sneb207 against soybean cyst nematode (*Heterodera glycines*) in soybean. **Pest management science**, v. 77, n. 1, p. 568–576, 2020.
- ZONGMING, X. et al. Cloning and expression of putative ethylene receptor genes in soybean plant. **Progress in natural Science**, v. 17, n. 10, p. 1152-1160, 2007.

APÊNDICE 1- Análise estatística

Tabela 3- Resultados da análise de variância – ANOVA, demonstrando as diferenças estatísticas entre os tratamentos em todos os genes testados.

Tratamentos – Gene	Valor de p
Hs1pro-1	0,0016
CHS	<0,0001
JAR1	0,0294
SAMT	0,0008
ATAF1	<0,0001
ETR	<0,0001

Tabela 4 – Resultados das análises de significância utilizando teste de Tukey entres os tratamentos realizados para cada gene.

Gene	Comparação entre tratamentos	Valor de p
Hs1pro-1	Controle 5D x Fungo (L)10D	0,0021
Hs1pro-1	Nematoide 5D x Fungo (L) 10D	0,0041
Hs1pro-1	Fungo (P) 5D x Fungo (L) 10D	0,0123
Hs1pro-1	Fungo (L) 5D x Fungo (L) 10D	0,0048
Hs1pro-1	Fungo (L) 10D x Fungo (P) 10D	0,0229
Hs1pro-1	Fungo (L) 10D x F+N (P) 10D	0,0027
CHS	Controle 5D x Controle 10D	0,0034
CHS	Controle 5D Nematoide 10D	<0,0001
CHS	Controle 5D x F+N (L) 10D	0,0015
CHS	Controle 10D x Nematoide 5D	0,0033
CHS	Nematoide 5D x Nematoide 10D	<0,0001
CHS	Nematoide 5D x F+N (L) 10D	0,0014
CHS	Fungo (P) 5D x Controle 10D	0,0032
CHS	Fungo (P) 5D x Nematoide 10D	<0,0001
CHS	Fungo (P) 5D x F+N (L) 10D	0,0014
CHS	Fungo (L) 5D x Controle 10D	0,0058
CHS	Fungo (L) 5D x Nematoide 10D	<0,0001
CHS	Fungo (L) 5D x F+N (L) 10D	0,0024
CHS	F+N (P) 5D x Controle 10D	0,0123
CHS	F+N (P) 5D x Nematoide 10D	<0,0001
CHS	F+N (P) 5D x F+N (L) 10D	0,0051
CHS	F+N (L) 5D x Controle 10D	0,0060
CHS	F+N (L) 5D x Nematoide 10D	<0,0001

CHS	F+N (L) 5D x F+N (L) 10D	0,0025
CHS	Controle 10D x Nematode 10D	0,0248
CHS	Controle 10D x F+N (P) 10D	0,0135
CHS	Nematode 10D x Fungo (P) 10D	0,0001
CHS	Nematode 10D x Fungo (L) 10D	0,0008
CHS	Nematode 10D x F+N (P) 10D	<0,0001
CHS	Fungo (P) 10D x F+N (L) 10D	0,0364
CHS	F+N (L) 10D x F+N (P) 10D	0,0055
JAR1	Controle 5D x Fungo (P) 5D	0,0268
JAR1	Nematode 5D x Fungo (P) 5D	0,0268
JAR1	Fungo (P) 5D x Fungo (L) 5D	0,0268
JAR1	Fungo (P) 5D x F+N (P) 5D	0,0268
JAR1	Fungo (P) 5D x F+N (L) 5D	0,0268
JAR1	Fungo (P) 5D x Controle 10D	0,0268
JAR1	Fungo (P) 5D x Nematode 10D	0,0268
JAR1	Fungo (P) 5D x Fungo (P) 10D	0,0268
JAR1	Fungo (P) 5D x Fungo (L) 10D	0,0268
JAR1	Fungo (P) 5D x F+N (P) 10D	0,0268
JAR1	Fungo (P) 5D x F+N (L) 10D	0,0268
SAMT	Controle 5D x Fungo (P) 5D	0,0432
SAMT	Controle 5D x F+N (L) 10D	0,0025
SAMT	Nematode 5D x F+N (L) 10D	0,0257
SAMT	Fungo (P) 5D x Fungo (L) 5D	0,0238
SAMT	Fungo (P) 5D x F+N (P) 5D	0,0272
SAMT	Fungo (P) 5D x Fungo (P) 10D	0,0350
SAMT	F+N (L) 10D x Fungo (L) 5D	0,0014
SAMT	F+N (L) 10D x F+N (P) 5D	0,0020
SAMT	F+N (L) 10D x F+N (L) 5D	0,0068
SAMT	F+N (L) 10D x F+N (L) 5D	0,0181
SAMT	F+N (L) 10D x Nematode 10D	0,0088
SAMT	F+N (L) 10D x Fungo (P) 10D	0,0026
SAMT	Fungo (L) 10D X F+N (L) 10D	0,0207
SAMT	F+N (P) 10D x F+N (L) 10D	0,0033
ATAF1	Controle 5D x Fungo (L) 5D	0,0013
ATAF1	Controle 5D x F+N (L) 5D	<0,0001
ATAF1	Nematode 5D x Fungo (L) 5D	0,0237
ATAF1	Nematode 5D x F+N (L) 5D	<0,0001
ATAF1	Fungo (P) 5D x Fungo (L) 5D	0,0032

ATAF1	Fungo (L) 5D x Controle 10D	0,0016
ATAF1	Fungo (L) 5D x Nematode 10D	0,0013
ATAF1	Fungo (L) 5D x Fungo (P) 10D	0,0018
ATAF1	Fungo (L) 5D x Fungo (L) 10D	0,0077
ATAF1	Fungo (L) 5D x F+N (P) 10D	0,0013
ATAF1	Fungo (L) 5D x F+N (L) 10D	0,0023
ATAF1	F+N (P) 5D x F+N (L) 5D	0,0010
ATAF1	F+N (P) 5D x Nematode 10D	0,0411
ATAF1	F+N (P) 5D x F+N (L) 10D	0,0411
ATAF1	F+N (L) 5D x Controle 10D	<0,0001
ATAF1	F+N (L) 5D x Nematode 10D	<0,0001
ATAF1	F+N (L) 5D x Fungo (P) 10D	<0,0001
ATAF1	F+N (L) 5D x Fungo (L) 10D	<0,0001
ATAF1	F+N (L) 5D x F+N (P) 10D	<0,0001
ATAF1	F+N (L) 5D x F+N (L) 10D	<0,0001
ETR	Controle 5D x F+N (P) 5D	<0,0001
ETR	Nematode 5D x F+N (P) 5D	<0,0001
ETR	Fungo (P) 5D x F+N (P) 5D	<0,0001
ETR	Fungo (L) 5D x F+N (P) 5D	<0,0001
ETR	F+N (P) 5D x F+N (L) 5D	<0,0001
ETR	F+N (P) 5D x Controle 10D	<0,0001
ETR	F+N (P) 5D x Nematode 10D	<0,0001
ETR	F+N (P) 5D x Fungo (P) 10D	<0,0001
ETR	F+N (P) 5D x Fungo (L) 10D	0,0004
ETR	F+N (P) 5D x F+N (P) 10D	<0,0001
ETR	F+N (P) 5D x F+N (L) 10D	<0,0001

Tabela 5 – Resultados das análises de significância utilizando teste t de Student. entres os tratamentos realizados para cada gene.

Gene	Comparação entre tratamentos	Valor de p
Hs1pro-1	Nematode 5D x Nematode 10D	0,0238
Hs1pro-1	Nematode 10D x F+N (P) 10D	0,0229
Hs1pro-1	F+N (P) 10D x Controle 10D	0,0020
Hs1pro-1	Controle 5D x F+N (L) 5D	0,0331
CHS	Controle 10D x Fungo (P) 10D	0,0350
JAR1	Nematode 5D x Nematode 10D	0,0410
JAR1	Controle 10D x Nematode 10D	0,0494
JAR1	Nematode 10D X F+N (P) 10D	0,0252

SAMT	F+N (P) 5D X F+N (P) 10D	0,0408
ATAF	Controle 5D x F+N (P) 5D	0,0312
ATAF	Controle 10D x Nematode 10D	0,0050
ATAF	Controle 10D x F+N (P) 10D	0,0080
ETR	Controle 10D x Nematode 10D	0,0160
ETR	Nematode 10D x F+N (P) 10D	0,0022
ETR	F+N (P) 10D x F+N (L) 10D	0,0333