

**KEMAMPUAN ISOLAT AKTINOMISETES MENGHASILKAN ENZIM
YANG DAPAT MERUSAK KULIT TELUR NEMATODA PURU-AKAR *Meloidogyne* spp.**

***THE ABILITY OF ACTINOMYCETES ISOLATE TO PRODUCE ENZYMES
WHICH DAMAGE ROOT-KNOT NEMATODE *Meloidogyne* spp. EGG SHELL***

Bambang Rahayu TP.*

Laboratorium Nematologi, Fakultas Pertanian, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

Donny Widiyanto, Sebastián Margino

Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Pertanian, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

Mulyadi

Laboratorium Nematologi, Fakultas Pertanian, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

**Penulis untuk korespondensi. E-mail: bambangrahayu@yahoo.com*

ABSTRACT

Soil microbes including actinomycetes are known to produce various hydrolytic enzymes and antibiotics that can be used as biological controlling agents nematode. Therefore, surveys conducted in several areas in Yogyakarta, Central Java and East Java, to search for actinomycetes with chitinolytic, proteolytic, and chitino-proteolytic activity. Isolation of Actinomycetes produced 84 isolates, and most was obtained from shrimp head waste (26 isolates). After the selection based on their ability to hydrolyze chitines and protein in the medium, those with the highest chitin and protein hydrolysis activity, are consecutive PSJ 27, TL 8, and TL 10 isolates. Test results of crude enzyme produced by selected isolates against root-knot nematode eggshell, showed that the isolates that have chitino-proteolytic activity (TL 10), is a highly effective isolate in damage eggshell. There are three types of damage to the nematode eggs. In the young eggs, crude enzyme preparation causing damage on vitelline and chitin layers. In the older eggs, preparation of crude enzyme cause premature hatching.

Key words: actinomycetes, antibiotics, biological controlling agents, chitinolytic, chitino-proteolytic, eggshell, hydrolytic enzymes, proteolytic

INTISARI

Sebagian mikrobia tanah, termasuk aktinomisetes, diketahui mampu menghasilkan berbagai enzim hidrolitik dan antibiotik yang dapat dimanfaatkan sebagai agens pengendalian hayati nematoda. Oleh karena itu, survei dilakukan di beberapa daerah di Yogyakarta, Jawa Tengah, dan Jawa Timur untuk mencari aktinomisetes yang mempunyai aktivitas kitinolitik, proteolitik dan kitino-proteolitik. Isolasi aktinomisetes menghasilkan 84 isolat, dan yang terbanyak diperoleh dari limbah kepala udang (26 isolat). Setelah dilakukan seleksi berdasarkan kemampuannya menghidrolisis kitin dan protein dalam medium, yang mempunyai aktivitas hidrolisis protein, kitin, protein dan kitin tertinggi berturut-turut adalah isolat PSJ 27, TL 8, dan TL 10. Hasil uji enzim kasar yang dihasilkan isolat terpilih terhadap perusakan kulit telur nematoda puru-akar menunjukkan bahwa isolat yang memiliki aktivitas kitino-proteolitik (TL10) merupakan isolat yang sangat efektif dalam merusak kulit telur. Terdapat tiga tipe kerusakan pada telur nematoda. Sediaan enzim kasar menyebabkan kerusakan atau terkoyaknya lapisan vitelin dan lapisan kitin pada telur muda. Pada telur yang sudah tua, sediaan enzim kasar menyebabkan pecahnya lapisan kulit telur yang menyebabkan penetasan yang prematur.

Kata kunci: agen pengendalian hayati, aktinomisetes, antibiotik, enzim hidrolitik, kitinolitik, kitino-proteolitik, kulit telur, proteolitik

PENGANTAR

Nematoda puru-akar, *Meloidogyne* spp., termasuk hama utama tanaman sayuran, khususnya anggota famili Solanaceae di seluruh dunia (Nicle, 1991; Sasser, 1980). Pada tanaman tomat, serangan nematoda puru-akar mengakibatkan kehilangan hasil sebesar 24-38% (Netscher & Sikora, 1990). Induk nematoda puru-akar berada di dalam jaringan akar mengeluarkan telur yang dimasukkan ke dalam

kantung gelatin yang merupakan massa telur terdiri atas 400-500 butir telur. Massa telur tersebut berada pada permukaan akar (Singh & Sitaramaiah, 1993). Telur nematoda merupakan salah satu stadium yang tahan terhadap keadaan lingkungan yang buruk dan tahan terhadap nematisida. Hanya telur dari seluruh bagian tubuh nematoda yang mengandung kitin (Miller & Sands, 1977). Kulit telur nematoda terdiri atas tiga lapisan: lapisan dalam adalah lapisan lipid, lapisan tengah adalah lapisan kitin dan lapisan yang

luar adalah lapisan vitelin (Bird & Bird, 1991). Lapisan vitelin merupakan lapisan yang terbentuk lebih dahulu daripada kedua lapisan yang lain dan tersusun dari bahan protein. Lapisan lipid tersusun dari senyawa proteolipid. Lapisan lipid sangat erat hubungannya dengan telur-telur yang sudah dibuahi. Pada jenis nematoda yang bersifat partenogenetik umumnya tidak mempunyai lapisan lipid, kecuali pada jenis *Meloidogyne* (Bird, & McClure, 1976). Lapisan kitin mengandung senyawa kitin dan merupakan lapisan paling tebal dibandingkan lapisan lainnya. Senyawa kitin tersebut tidak terdapat pada *oocytes* dan pada telur yang tidak dibuahi serta tidak terdapat dibagian tubuh nematoda lain. Lapisan kitin terbentuk karena stimulasi perkawinan (Chitwood & Chitwood, 1950), dan dapat terbentuk berasosiasi dengan protein (Bird & McClure, 1976).

Pengendalian nematoda puru-akar melalui stadia telur dengan memanfaatkan enzim protease dan kitinase ekstraseluler yang dihasilkan oleh mikrobia tanah sangat menjanjikan keberhasilannya mengingat lapisan kulit telur yang terdiri dari lapisan vitelin, kitin dan lipid. Mikrobia tanah mempunyai banyak kemungkinan untuk dijadikan agens pengendali telur nematoda puru-akar seperti jamur, aktinomisetes, dan bakteri (Becker & Schwinn, 1993; Dunne *et al.*, 1997a; Keel & Defago, 1997) karena dapat memproduksi enzim hidrolitik (Dunne *et al.*, 1997b, 1998; Thrane *et al.*, 1997). Tikhonov *et al.* (2002) melaporkan bahwa jamur *Verticillium chlamyosporium* dan *V. suchlassporium* dapat merusak kulit telur nematoda sista putih, *Globodera pallida*, melalui aktivitas enzim-enzim kitinolitik dan proteolitik yang dihasilkannya. Lapisan kitin kulit telur nematoda merupakan lapisan pelindung utama isi telur yang menjaga bentuk dan keutuhan telur. Jika lapisan tersebut rusak/cacat akibat aktivitas enzim kitinolitik maka telur dapat pecah atau menyebabkan penetasan prematur sehingga menurunkan viabilitas larva nematoda (Mercer *et al.*, 1992). Aktinomisetes merupakan bakteri gram positif berbentuk benang yang mampu menyintesis antibiotik dan memproduksi enzim hidrolitik ekstraseluler yang meliputi, nuklease, lipase, selulase, xilanase, lipase, kitinase, dan protease, yang berpengaruh terhadap nematoda (Park *et al.*, 2002; Miller & Sands, 1977; McCarthy & William, 1992). Penelitian ini dilakukan untuk mendapatkan isolat aktinomisetes yang mampu menghasilkan enzim perusak kulit telur nematoda puru akar.

BAHAN DAN METODE

Bahan Sumber Asal Isolat

Bahan yang digunakan sebagai sumber isolat berupa cuplikan tanah, limbah pengolahan udang, dan inokulum kompos, diambil dari beberapa daerah yaitu: Kecamatan Prambon (limbah pabrik petis), Sidoarjo dan Kecamatan Pare (limbah jamur), Kediri, Jawa Timur; Kecamatan Banguntapan (limbah pabrik pengolahan udang), Bantul, DI Yogyakarta; Kecamatan Tulung (tanah sawah), Kecamatan Klaten Utara (tanah sawah) dan Kecamatan Ngawen (tanah sawah), Klaten, Jawa Tengah, inokulum kompos STARDEC, dan inokulum kompos buatan petani Muntilan.

Media Isolasi dan Pengujian

Medium kitin agar (Hsu & Lockwood, 1975)

Komposisi medium:

K ₂ HPO ₄	0,7	gram
KH ₂ PO ₄	0,3	gram
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,5	gram
FeSO ₄ 7H ₂ O	0,01	gram
ZnSO ₄	0,001	gram
Agar	15 sampai 20	gram
Koloidal kitin	2,5	gram
Akuades	1	liter

pH media 7. Disterilkan pada 121°C, tekanan 1 atm selama 15 menit

Medium pati agar (Joetono *et al.*, 1980)

Komposisi medium:

Ekstrak daging	3	gram
Pati (<i>soluble starch</i>)	2	gram
Agar	15	gram
Akuades	1	liter

Campur bagian-bagian tersebut dalam aquadest, kemudian dididihkan dan atur pH 7,2 lalu disterilkan dengan *autoclave* pada suhu 121°C, tekanan 1 atm selama 15 menit.

Isolasi Aktinomisetes

Masing-masing bahan sumber isolat sebanyak 10 g dimasukkan ke dalam botol pengencer berisi 90 ml akuades steril (pengenceran 10⁻¹) dan digojok selama 30 menit pada suhu kamar. Kemudian dibuat seri pengenceran meliputi pengenceran 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, dan 10⁻⁵ ml⁻¹. Dari masing-masing pengenceran tersebut diambil 0,1 ml dan diinokulasikan pada medium kitin agar (Hsu & Lockwood, 1975), diratakan menggunakan *drygalski*, dan diinkubasikan pada suhu kamar. Koloni aktinomisetes yang tumbuh dimurnikan beberapa kali dengan metode goresan sampai

diperoleh isolat murni. Isolat tersebut dipindahkan dan dipelihara pada medium pati agar miring (Joetono *et al.*, 1980).

Seleksi Isolat Aktinomisetes

Seleksi isolat dilakukan berdasarkan hasil pengujian kemampuannya dalam menghidrolisis kitin dan protein.

Pengujian kemampuan isolat dalam menghidrolisis kitin. Isolat aktinomisetes diinokulasikan pada medium kitin agar (Hsu & Lockwood, 1975) dalam cawan petri dengan cara tusukan dan diinkubasi pada suhu kamar selama 7 hari. Koloni yang membentuk zona jernih menunjukkan bahwa isolat tersebut mampu menghidrolisis kitin (kitinolitik). Untuk membedakan kemampuan masing-masing isolat dalam menghidrolisis kitin, dilakukan dengan menghitung rasio diameter zona jernih dengan diameter koloni.

Pengujian kemampuan isolat dalam menghidrolisis protein. Isolat aktinomisetes diinokulasikan pada medium *skim milk agar* (Joetono *et al.*, 1980) dalam cawan petri dengan cara tusukan dan diinkubasi pada suhu kamar selama 7 hari. Koloni yang membentuk zona jernih menunjukkan bahwa isolat tersebut mampu menghidrolisis protein (proteolitik). Untuk membedakan kemampuan masing-masing isolat dalam menghidrolisis protein, dilakukan dengan menghitung rasio diameter zona jernih dengan diameter koloni.

Pengujian Kemampuan Isolat dalam Merusak Kulit Telur

Pengujian kemampuan perusakan telur oleh masing-masing isolat dilakukan mengikuti metode *microwell assay* seperti yang diuraikan oleh Nitao *et al.* (1999) yang memerlukan sediaan telur nematoda dan enzim kasar (*crude enzyme*) isolat aktinomisetes. Perbanyakan telur nematoda dilakukan mengikuti metode seperti yang telah diuraikan oleh Meyer *et al.* (2004), sedangkan penyediaan enzim kasar isolat aktinomisetes mengikuti metode seperti yang diuraikan oleh Hsu & Lockwood (1975).

Perbanyakan telur nematoda puru akar (Meloidogyne incognita). Nematoda puru akar dibiakkan pada tanaman tomat (*Lycopersicon esculentum*) yang ditumbuhkan di rumah kaca. Bibit tanaman tomat berumur 3 minggu diinokulasi dengan telur nematoda puru akar *M. incognita* dan biomassa telur dipanen setelah 2 bulan. Massa telur nematoda dicuci dengan air steril, dimasukkan ke dalam *erlenmeyer*, ditambah natrium hipoklorida,

diaduk, dan dicuci/dibilas dengan air steril menggunakan botol semprot pada saringan 500 mesh (Meyer *et al.*, 2004).

Penyediaan enzim kasar. Isolat terpilih ditumbuhkan pada medium kitin cair (Hsu & Lockwood, 1975) pada suhu kamar selama 3 hari. Sediaan enzim kasar diperoleh setelah biakan disentrifugasi pada kecepatan 5800 g selama 20 menit dan disaring menggunakan kertas saring 0,2 μm . Kandungan protein supernatan dianalisis berdasarkan metode seperti yang diuraikan oleh Bradford (1976) dengan bovine serum albumin sebagai standar. Selanjutnya enzim kasar dipekatkan dengan cara liofilisasi dan disimpan pada suhu -20°C sampai digunakan.

Microwell assay. Telur nematoda sebanyak ± 100 butir dimasukkan ke dalam gelas sirakus yang berisi filtrat (sediaan enzim kasar) dalam 500 μl 10 mM buffer fosfat pH 7 dan suhu 30°C . Sebagai kontrol, telur nematoda dimasukkan ke dalam gelas sirakus yang berisi air steril dan larutan buffer fosfat. Tingkat kerusakan kulit telur diamati setelah diinkubasikan selama 16 jam.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dari 17 sumber isolat diperoleh 84 isolat aktinomisetes yang dapat dikelompokkan menjadi 3 macam isolat yaitu isolat yang mampu menghidrolisis kitin, protein, dan keduanya (Tabel 1).

Terdapat 60 isolat aktinomisetes yang mampu menghidrolisis kitin dan protein sekaligus, 20 isolat yang hanya mampu menghidrolisis kitin, dan 4 isolat yang hanya mampu menghidrolisis protein. Kelompok isolat yang mampu menghidrolisis kitin dan protein, terutama didapatkan dari tanah sawah Klaten, Jawa Tengah yang menggunakan pupuk kandang dan tanah limbah pabrik petis Sidoarjo, Jawa Timur. Di kedua macam sumber isolat tersebut kemungkinan banyak tersedia bahan organik berupa kitin dan protein sehingga memberikan lingkungan yang cocok untuk berkembangbiaknya aktinomisetes yang memiliki kemampuan menghidrolisis kitin sekaligus protein.

Seluruh Isolat yang diperoleh tersebut di atas selanjutnya ditentukan kemampuan hidrolitiknya. Diperoleh 14 isolat yang memiliki kemampuan hidrolitik sebesar ≥ 2 (Tabel 2).

Isolat yang memiliki kemampuan tertinggi dalam menghidrolisis kitin, protein, dan kitin-protein berturut turut adalah PSJ-27, TL-8, dan TL-10. Ketiga isolat tersebut diperoleh dari tanah sawah Klaten, Jawa Tengah yang menggunakan pupuk kandang (TL) dan tanah limbah pabrik petis

Tabel 1. Jumlah dan macam isolat berdasarkan kemampuan menghidrolisis protein dan kitin

Sumber isolat	Total	Macam isolat		
		Kitinolitik	Proteolitik	Kitino-Proteolitik
Limbah jamur <i>Ganoderma lucidum</i> dari Pare, Kediri	5	0	0	5
Tanah sawah kecamatan Klaten Utara, Klaten	4	0	0	4
Stardec	6	0	0	6
Inokulum kompos	1	0	0	1
Tanah sawah kecamatan Tulung, Klaten	12	0	2	10
Tanah sawah kecamatan Ngawen, Klaten	3	0	0	3
Tanah limbah kepala udang (pabrik petis) kecamatan Prambon, Sidoarjo	26	2	0	24
Tanah <i>rhizosphere</i> tanaman tomat Wonocatur, Yogyakarta	3	2	0	1
Tanah limbah kepala udang desa Sareman, Bantul	10	2	2	6
Tanah sawah Kabupaten Kulon Progo	3	3	0	0
Tanah sawah daerah Yogyakarta	5	5	0	0
Tanah sawah daerah Bantul	2	2	0	0
Tanah sawah daerah Sleman	2	2	0	0
Terasi	2	2	0	0

Tabel 2. Isolat yang memiliki kemampuan menghidrolisis kitin dan protein ≥ 2

No.	Isolat	Kemampuan menghidrolisis	
		Kitin	Protein
1.	TL-6	2,00	2,15
2.	LUB-8	2,33	3,00
3.	TL-10	2,69	3,06
4.	PSJ-36	3,00	-
5.	PSJ-28	3,20	-
6.	SD-2	3,50	-
7.	PSJ-47	4,29	-
8.	PSJ-46	4,67	-
9.	IK	5,60	-
10.	PSJ-27	5,67	-
11.	LUB-4	-	4,67
12.	LUB-9	-	3,07
13.	TL-7	-	4,23
14.	TL-8	-	4,85

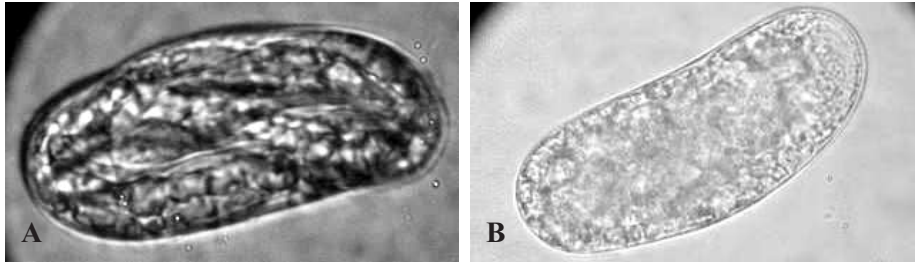
Sidoarjo, Jawa Timur (PSJ). Selanjutnya sediaan enzim kasar dari ketiga isolat tersebut diuji kemampuannya dalam merusak kulit telur nematoda.

Sediaan enzim kasar dari isolat-isolat yang memiliki aktivitas proteolitik dan proteo-kitinolitik (TL-8 & TL-10) mampu merusak lapisan kulit telur, sedangkan sediaan enzim kasar dari isolat yang hanya memiliki aktivitas kitinolitik, tidak dapat merusak lapisan kulit telur. Lapisan kitin terdapat di bagian tengah diantara lapisan vitelin dan lipid, hal ini diduga merupakan penyebab tidak mampunya sediaan enzim kasar dari isolat yang hanya memiliki aktivitas kitinolitik (PSJ-27) dalam merusak kulit telur nematoda (Gambar 1)

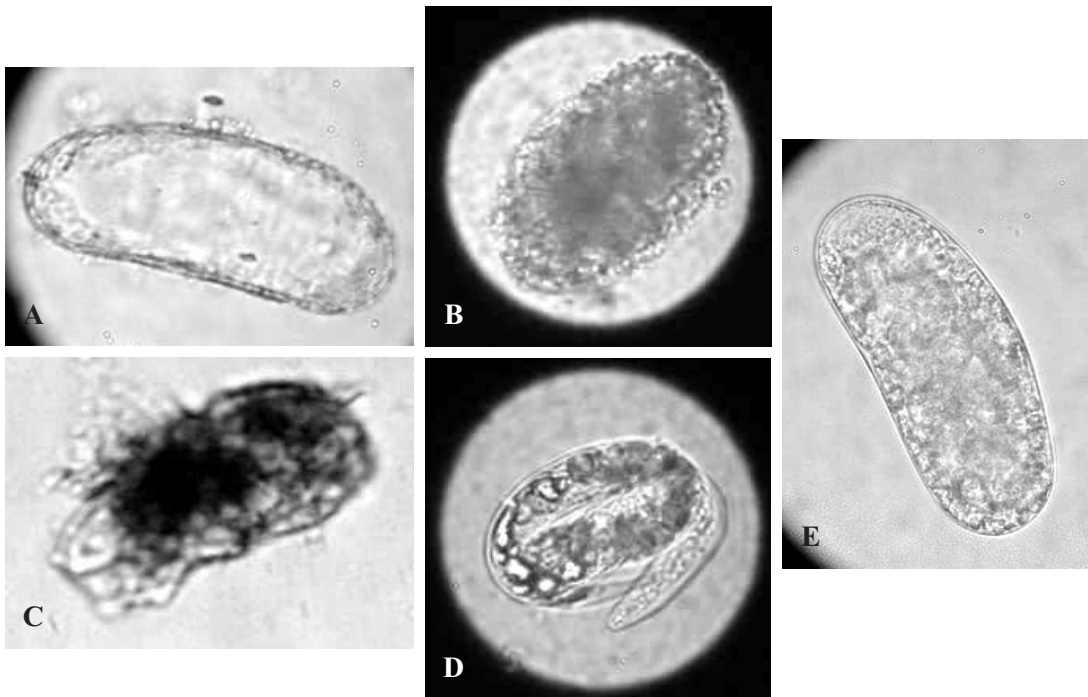
Pada Gambar 1 kulit telur terlihat utuh hal tersebut karena aktivitas kitinolitik dari isolat PSJ

27 tidak mampu menghidrolisis lapisan protein sebagai kulit telur terluar (Bird & Bird, 1991). Walaupun demikian keberadaan enzim kitinase dalam media dapat mematikan larva yang menetas (Rodríguez-Kabana *et al.*, 1983; Mian *et al.*, 1982; Godoy *et al.*, 1983).

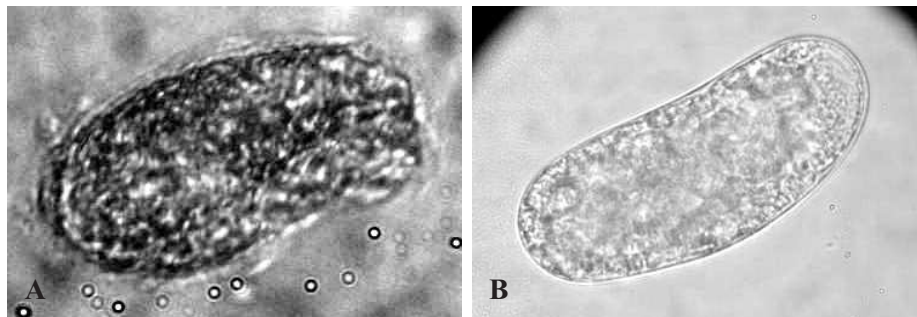
Kerusakan telur nematoda akibat perlakuan dengan sediaan enzim kasar dari isolat proteo-kitinolitik (TL-10) disajikan pada Gambar 2. Tampak bahwa kondisi kulit telur rusak parah, oleh aktivitas proteo-kitinolitik yang menghidrolisis kulit telur. Kerusakan pada telur yang masih muda (Gambar 2A, B) terlihat pada lapisan kulit terluar vitelin yang tersusun dari bahan protein dan lapisan kulit kedua dari bahan kitin. Kerusakan kulit telur terjadi sampai dindingnya pecah (Gambar 2C). Kerusakan pada telur yang sudah tua (Gambar 2D)



Gambar 1. Tipe kerusakan kulit telur yang diperlakukan dengan enzim kasar kitinolitik isolat PSJ 27 (A) dan kontrol (B)



Gambar 2. Tipe kerusakan kulit telur Nematoda puru-akar yang diperlakukan dengan enzim kasar kitino-proteolitik dari isolat TL 10; telur yang diperlakukan dengan enzim kasar (A, B, C, D) dan kontrol (E)



Gambar 3. Tipe kerusakan kulit telur yang diperlakukan dengan enzim kasar proteolitik dari isolat TL 8; telur yang diperlakukan dengan enzim kasar (A) dan kontrol (B)

mengakibatkan penetasan telur prematur dan akhirnya larva tersebut terus mati karena belum cukup umurnya untuk menetas.

Sediaan enzim kasar dari isolat yang memiliki aktivitas proteolitik (TL-8) mengakibatkan kerusakan pada lapisan vitelin telur nematoda, sehingga kulit telur tampak terkoyak (Gambar 3).

Menurut Bonants *et al.* (1995) enzim protease dapat mendegradasi lapisan kulit telur terluar nematoda (vitelin) sedangkan menurut Siddiqui *et al.* (2005) enzim protease mempunyai peranan yang besar dalam pengendalian hayati *M. incognita*, karena menghambat penetasan dan mematikan larva.

Melihat tipe kerusakan kulit telur yang dihasilkan dengan perlakuan enzim kasar, dapat dikatakan bahwa enzim kasar yang mempunyai aktivitas proteo-kitinolitik adalah yang terbaik dalam menghidrolisis kulit telur nematoda puru-akar. Dengan demikian isolat aktinomisetes terpilih (TL-10) yang menghasilkan enzim protease dan kitinase berpotensi menjadi agens pengendali nematoda puru-akar. Bagi petani sayur, khususnya petani tanaman tomat, dianjurkan menggunakan pupuk organik yang berasal dari kotoran ternak, limbah ikan, dan udang, karena pupuk organik tersebut mengandung aktinomisetes yang mampu mengendalikan nematoda puru-akar.

DAFTAR PUSTAKA

- Becker, J. O. & F.J. Schwinn. 1993. Control of Soil-borne Pathogens with Living Bacteria and Fungi: Status and Outlook. *Pesticide Science* 37: 355–363.
- Bird, A.F. & J. Bird. 1991. *The Structure of Nematodes*. Academic Press, Sandiego. 316 p.
- Bird, A.F. & M.A. McClure. 1976. The Tylenchid (Nematoda) Eggshell: Structure, Composition, and Permeability. *Parasitology* 72: 19–28.
- Bonants, P.J., P.F. Fitters, H. Thijs, E. den Belder, C. Waalwijk, & J.W. Henfling. 1995. A Basic Serine Protease from *Paecilomyces lilacinus* with Biological Activity against *Meloidogyne hapla* Eggs. *Microbiology* 141: 775–784.
- Bradford, M.M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for Quantification of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-dye Binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248–254.
- Chitwood, B.G. & M.B. Chitwood. 1950. *Introduction to Nematology*. Univ. Park Press, London. 332 p.
- Dunne, C., I. Delany, A. Fenton, & F. O’Gara. 1997a. Mechanisms Involved in Biocontrol by Microbial Inoculants. *Agronomie* 16: 721–729.
- Dunne, C., J.J. Crowley, Y. Moënne-Loccoz, D.N. Dowling, F.J. de Bruijn, & F. O’Gara. 1997b. Biological Control of *Pythium ultimum* by *Stenotrophomonas maltophilia* W81 is Mediated by an Extracellular Proteolytic Activity. *Microbiology* 143: 3921–3931.
- Dunne, C., Y. Moënne-Loccoz, J. McCarthy, P. Higgins, J. Powell, D.N. Dowling, & F. O’Gara. 1998. Combining Proteolytic and Phloroglucinol-producing Bacteria for Improved Biocontrol of Pythium-mediated Damping-off of Sugar Beet. *Plant Pathology* 47: 299–307.
- Godoy, G., R. Rodri’guez-Ka’bana, R. Shelby, & G. Morgan-Jones. 1983. Chitin Amendments for Control of *Meloidogyne arenaria* in Infested Soil. II. Effects on Microbial Populations. *Nematopica* 13: 63–74.
- Hsu, S.C. & J.L. Lockwood. 1975. Powdered Chitin Agar as a Selective Medium for Enumeration of Actinomycetes in Water and Soil. *Applied and Environmental Microbiology* 29: 422–426.
- Jutono, J. Soedarsono, S. Hartadi, S. Kabirun, S. Darmosuwito, & Soesanto, 1980. *Pedoman Praktikum Mikrobiologi Umum*. Departemen Mikrobiologi. Fakultas Pertanian. Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. 232 p.
- Keel, C. & Défago, G. 1997. Interactions Between Beneficial Soil Bacteria and Root Pathogens: Mechanisms and Ecological Impact. p. 27–46. In A.C. Gange & V.K. Brown (eds.), *Multitrophic Interactions in Terrestrial Systems*, Blackwell Scientific Publications, London.
- McCarthy, A.J. & S.T. Williams. 1992. Actinomycetes as Agents of Biodegradation in the Environment—a Review. *Gene* 115:189–192.
- Mercer, C.F., D.R. Greenwood, & J.L. Grant, 1992. Effect of Plant and Microbial Chitinases on the Eggs and Juveniles of *Meloidogyne hapla* Chidwood. *Nematologica* 8: 227–236.
- Meyer, S.L.F., N.H. Robin, Z.L. Xing, R.A. Humber, J. Juba, & J.K. Nitao. 2004. Activity of Fungal Culture Filtrates against Soybean Cyst Nematode and Root-knot Nematode Egg Hatch and Juvenile Motility. *Nematology* 6: 23–32
- Mian, I.H., G. Godoy, R.A. Shelby, R. Rodríguez-Kábana, G. Morgan-Jones. 1982. Chitin Amendments for Control of *Meloidogyne arenaria* in Infested Soil. *Nematopica* 12: 71–84.

- Miller, P.M. & D.C. Sands. 1977. Effect of Hydrolitic Enzymes on Plant Parasitic Nematodes. *Journal of Nematology* 9: 192–197.
- Nickle, W.R. 1991. *Manual of Agriculture Nematology*. Marcel Dekker, Inc. New York, N.Y. Pub. 1035 p.
- Netscher, C. & R.A. Sikora. 1990. Nematode Parasites of Vegetables. p. 237–283. In M. Luc, R.A. Sikora, & J. Bridge. (eds.), *Plant Parasitic Nematode in Subtropical and Tropical Agriculture*. C.A.B.Int. Inst. of Parasitol. London.
- Nitao, J.K., S.L.F. Meyer, & D.J. Chitwood. 1999. *In Vitro* Assays of *Meloidogyne incognita* and *Heterodera glycines* for Detection of Nematode Antagonistic Fungal Compound. *Journal of Nematology* 31: 172–183.
- Park, J.O., K.A. El-Tarabily, E.L. Ghisalberti, & K. Sivastithamparam. 2002. Pathogenesis of *Streptovorticillium albireticuli* on *Caenorhabditis elegans* and its Antagonism to Soil Borne Fungal Pathogens. *Letters in Applied Microbiology* 35: 361–365.
- Rodriguez-Kabana, R., G. Godoy, G. Morgan-Jones, & R. Shelby. 1983. The Determination of Soil Chitinase Activity: Conditions for Assay and Ecological Study. *Plant and Soil* 75: 95–106.
- Sasser, J.N. 1980. Root-knot Nematode: A Global Manace to Crop Production. *Plant Disease* 64: 36–41.
- Siddiqui I.A., D. Haas, & S. Heeb. 2005. Extracellular Protease of *Pseudomonas fluorescens* CHA0, a Biocontrol Factor with Activity against the Root-knot Nematode *Meloidogyne incognita*. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 5646–5649.
- Singh, R.S. & K. Sitaramaiah. 1993. *Plant Pathogens. The Plant Parasitic Nematodes*. Science Publisher Inc. USA. 316 p.
- Thrane, C., A. Tronsmo, & D.F. Jensen. 1997. Endo-1,3- β -glucanase and Cellulase from *Trichoderma harzianum*: Purification and Partial Characterization, Induction of and Biological Activity against Plant Pathogenic *Pythium* spp. *European Journal of Plant Pathology* 103: 331–344.
- Tikhonov, V.E., L.V. Lopez-Llorca, J. Salinas, & H. Jansson. 2002. Purification and Characterization of Chitinases from the Nematophagous Fungi *Verticillium chlamyosporium* and *V. suchlassporium*. *Fungal Genetics and Biology* 35: 67–78.