



ALAN RODRIGUES TEIXEIRA MACHADO

**DESENVOLVIMENTO DE NOVOS MÉTODOS
PARA CONTROLE DE NEMATÓIDES
FITOPARASITAS**

**LAVRAS-MG
2010**

ALAN RODRIGUES TEIXEIRA MACHADO

**DESENVOLVIMENTO DE NOVOS MÉTODOS PARA CONTROLE DE
NEMATÓIDES FITOPARASITAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Denilson Ferreira de Oliveira

LAVRAS-MG

2010

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Machado, Alan Rodrigues Teixeira.

Desenvolvimento de novos métodos para controle de nematóides fitoparasitas / Alan Rodrigues Teixeira Machado. – Lavras : UFLA, 2010.

107 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2010.

Orientador: Denílson Ferreira de Oliveira.

Bibliografia.

1. Metabólitos. 2. Resistência. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 631.86

ALAN RODRIGUES TEIXEIRA MACHADO

**DESENVOLVIMENTO DE NOVOS MÉTODOS PARA CONTROLE DE
NEMATÓIDES FITOPARASITAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 17 de agosto de 2010.

Dr. Vicente Paulo Campos UFLA

Dra. Luciana de Matos Alves Pinto UFLA

Dr. Denilson Ferreira de Oliveira
Orientador

**LAVRAS-MG
2010**

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Química (DQI), pela oportunidade concedida para a realização do Mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos.

Aos professores do Departamento de Química da UFLA, pelos ensinamentos transmitidos.

RESUMO

Dentre os fitopatógenos que afetam a produtividade agrícola, encontram-se os nematóides pertencentes ao gênero *Meloidogyne*, os quais constituem o grupo com maior importância econômica na agricultura. O grande número de hospedeiros e a interação com outros organismos patogênicos colocam tais nematóides entre os principais patógenos responsáveis pela limitação da produtividade agrícola mundial. Como os métodos atualmente disponíveis para o controle de fitonematóides apresentam desvantagens como a dificuldade de aplicação em algumas localidades e o custo elevado, existe uma demanda cada vez maior por novas metodologias menos onerosas e que não contaminem o homem e o ambiente com substâncias de alta toxicidade. Em decorrência, avaliou-se neste trabalho a possibilidade do uso de combinações de substâncias orgânicas voláteis (SOV's), disponíveis comercialmente, para aumentar a resistência de tomateiros e feijoeiros a *Meloidogyne incognita*. Além disso, buscou-se averiguar, pelo emprego de métodos colorimétricos, se o aumento da resistência poderia estar associado à produção de carboidratos, aminoácidos, alcalóides e fenóis. Testes *in vivo* indicaram que as combinações de jasmona + jasmonato de metila, (Z)-hex-3-en-1-ol + (E)-hex-3-en-1-ol + (Z)-hex-2-en-1-ol + (E)-hex-2-enal, acetato de (E)-hex-2-enila + acetato de hexila e de *meso*-butano-2,3-diol + butano-1,2-diol + butano-1,3-diol + butano-1,4-diol, eram capazes de reduzir a população de *M. incognita* quando estas eram aplicadas na parte aérea de plantas de tomateiro. Já para feijoeiro, selecionou-se apenas a combinação de acetato de linalila + nerolidol. As exposições das plantas a todas as combinações de SOV's resultaram em alterações nas quantidades de alcalóides, aminoácidos, sacarose, carboidratos e fenóis. Para complementar o trabalho, também foram realizadas análises por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio, o que permitiu identificar várias substâncias nas raízes das plantas. Entretanto, não ficou bem esclarecido o mecanismo de ação destas substâncias nas plantas estudadas. Também foi realizado um estudo para quantificar vários metabólitos nas raízes de plantas de café resistentes e suscetíveis a nematóides, após exposição das mesmas a *Meloidogyne exigua*. Observou-se que a resistência de cafeeiro a este nematóide pode estar correlacionada com a maior produção de sacarose, fenólicos, ácido fumárico e ácido quínico e com a menor produção de alcalóides por parte da cultivar resistente, durante a formação do sítio de alimentação deste parasita.

Palavras-Chave: Nematóides. Metabólitos. Resistência.

ABSTRACT

Among the phytopathogens that affect agricultural productivity are the nematodes of the genus *Meloidogyne*, which constitute a group with high economical importance in agriculture. The large number of hosts and interactions with other pathogenic organisms place such nematodes among the main pathogens responsible for the limitation of world agricultural productivity. Since the currently available methods to control plant-parasitic nematodes present disadvantages such as the difficulty of nematicide application in some locals and high cost, there is an increasing demand for new and less onerous methodologies that do not contaminate humans and the environment with highly toxic substances. Consequently, combinations of commercially available volatile organic substances (VOS's), potentially useful to increase tomato and common bean plant resistance to *Meloidogyne incognita*, were evaluated in this work. Furthermore, we sought to verify, through the use of colorimetric methods, if the resistance increase could be associated to the production of carbohydrates, amino acids, alkaloids and phenols. *In vivo* tests indicated that the combinations of jasmone + methyl jasmonate, (Z)-hex-3-en-1-ol + (E)-hex-3-en-1-ol + (Z)-hex-2-en-1-ol + (E)-hex-2-enal, (E)-hex-2-enyl acetate + hexyl acetate and *meso*-butane-2,3-diol + butane-1,2-diol + butane-1,3-diol + butane-1,4-diol, were capable of reducing the population of *M. incognita* when applied to the aerial part of tomato plants. For common bean plants, only the combination of linalyl acetate + nerolidol was selected. The exposure of plants to all VOS's combinations caused alterations in the amount of alkaloids, amino acids, sucrose, carbohydrates and phenols. To complement the work, analyses by hydrogen nuclear magnetic resonance spectroscopy were also conducted, allowing the identification of various substances in the plant roots. However, the action mechanism of these substances in the plants studied was not very clear. Another study was also carried out to quantify various metabolites in the roots of coffee plants resistant and susceptible to nematodes, after their exposition to *Meloidogyne exigua*. Apparently, the resistance of coffee plant to this nematode can be correlated with the high sucrose, phenolic, fumaric acid and quinic acid production and with low alkaloid production by the resistant cultivar, during the formation of the feeding site by the parasite.

Keywords: Nematodes. Metabolites. Resistance.

LISTA DE FIGURAS

PRIMEIRA PARTE

Figura 1	Foto do juvenil do segundo estágio com aumento de 10 vezes.....	17
Figura 2	Exemplos de substâncias orgânicas voláteis de origem vegetal.....	20
Figura 3	Substâncias orgânicas voláteis liberadas por folhas infestadas por insetos que ativam o sistema de defesa de folhas intactas da planta atacada ou de suas vizinhas.....	22
Figura 4	Estrutura do 1,8-cineol, que pode ser liberado pelas raízes de plantas.....	24
Figura 5	Substâncias orgânicas voláteis produzidas por bactérias que aumentam a resistência de <i>Arabidopsis</i> a pragas e doenças....	24
Figura 6	Estrutura de aminoácidos ativos contra nematóides.....	26
Figura 7	Estruturas de alcalóides com propriedades nematicidas.....	32
Figura 8	Estruturas de alguns alcalóides inibidores da acetilcolinesterase.....	33
Figura 9	Estruturas de alcalóides cuja produção pelas plantas é estimulada por fungos.....	33
Figura 10	Fenóis com propriedades nematicidas.....	35

SEGUNDA PARTE – ARTIGO 1

Figura 1	Concentrações de alcalóides, aminoácidos, carboidratos solúveis, sacarose e fenóis, nas raízes de <i>Solanum lycopersicum</i> L e <i>Phaseolus vulgaris</i> L, cujas partes aéreas foram pulverizadas com soluções em Tween 80 a 1 % (g.mL ⁻¹)	
----------	--	--

¹) de jasmona + jasmonato de metila (1), (Z)-hex-3-en-1-ol + (E)-hex-3-en-1-ol + (Z)-hex-2-en-1-ol + (E)-hex-2-enal (2), acetato de (E)-hex-2-enila + acetato de hexila (3), *meso*-butano-2,3-diol + butano-1,2-diol + butano-1,3-diol + butano-1,4-diol (4), 3-hidroxibutanona + 4-hidroxibutanona (5) e acetato de linalila + nerolidol (6). Como controle foi empregado Tween 80 a 1% (g.mL⁻¹) (7). Barras seguidas pela mesma letra ou número em cada gráfico não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott e Knott ($P \leq 0,05$)..... 61

Figura 2 Metabólitos identificados e quantificados nas raízes de tomateiros (*Solanum lycopersicum* L.) com o uso da espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio. As plantas foram pulverizadas com combinações de jasmona + jasmonato de metila (1), (Z)-hex-3-en-1-ol + (E)-hex-3-en-1-ol + (Z)-hex-2-en-1-ol + (E)-hex-2-enal (2), acetato de (E)-hex-2-enila + acetato de hexila (3), *meso*-butano-2,3-diol + butano-1,2-diol + butano-1,3-diol + butano-1,4-diol (4), 3-hidroxibutanona + 4-hidroxibutanona (5), acetato de linalila + nerolidol (6) e com solução de Tween 80 a 1 % (g.mL⁻¹) (7), que foi empregado como controle. Barras com a mesma letra, em cada gráfico, não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott e Knott ($P \leq 0,05$)..... 62

Figura 3 Metabólitos identificados e quantificados nas raízes de feijoeiros (*Phaseolus vulgaris* L.) com o uso da espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio. As plantas foram pulverizadas com combinações

de jasmona + jasmonato de metila (1), (Z)-hex-3-en-1-ol + (E)-hex-3-en-1-ol + (Z)-hex-2-en-1-ol + (E)-hex-2-enal (2), acetato de (E)-hex-2-enila + acetato de hexila (3), *meso*-butano-2,3-diol + butano-1,2-diol + butano-1,3-diol + butano-1,4-diol (4), 3-hidroxiбутанона + 4-hidroxiбутанона (5), acetato de linalila + nerolidol (6) e com solução de Tween 80 a 1 % (g.mL⁻¹) (7), que foi empregado como controle. Barras com a mesma letra, em cada gráfico, não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott e Knott ($P \leq 0,05$)..... 63

Figura 4 Escores das análises de componentes principais dos espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio dos extratos das raízes de *Phaseolus vulgaris* (a) e *Solanum lycopersicum* (b) (Tx.y, sendo “x” correspondente ao tratamento e “y” o número da repetição). Plantas pulverizadas com jasmona + jasmonato de metila (tratamento 1), (Z)-hex-3-en-1-ol + (E)-hex-3-en-1-ol + (Z)-hex-2-en-1-ol + (E)-hex-2-enal (tratamento 2), acetato de (E)-hex-2-enila + acetato de hexila (tratamento 3), *meso*-butano-2,3-diol + butano-1,2-diol + butano-1,3-diol + butano-1,4-diol (tratamento 4), 3-hidroxiбутанона + 4-hidroxiбутанона (tratamento 5) e acetato de linalila + nerolidol (tratamento 6). Como controle foi empregado o extrato das raízes de plantas pulverizadas com solução de Tween 80 a 1 % (g.mL⁻¹), correspondendo ao tratamento 7 64

Figura 5 Mortalidade de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita* após exposição a extratos de raízes de tomateiros (*Solanum lycopersicum* L) ou feijoeiros

(*Phaseolus vulgaris* L), cujas partes aéreas foram previamente pulverizadas com as seguintes combinações de substâncias orgânicas voláteis dissolvidas em solução aquosa de Tween 80 a 1 % (g.mL⁻¹):jasmona + jasmonato de metila (1), (Z)-hex-3-en-1-ol + (E)-hex-3-en-1-ol + (Z)-hex-2-en-1-ol + (E)-hex-2-enal (2), acetato de (E)-hex-2-enila + acetato de hexila (3), meso-butano-2,3-diol + butano-1,2-diol + butano-1,3-diol + butano-1,4-diol (4), 3-hidroxiutanona + 4-hidroxiutanona (5) e acetato de linalila + nerolidol (6). O extrato das raízes de plantas pulverizadas com solução de Tween 80 a 1 % (g.mL⁻¹) e solução de Tween 80 a 1 % (g.mL⁻¹), correspondendo respectivamente aos tratamentos 7 e 8, foram usados como controles. Barras com a mesma letra ou número, em cada gráfico, não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott e Knott ($P \leq 0,05$) 65

ARTIGO 2

Figura 1 Concentrações de alcalóides, aminoácidos livres, carboidratos solúveis, sacarose e fenóis em raízes de mudas de cafeeiro resistente (IAPAR-59) e suscetível (Catuaí-Vermelho) a nematóides. As análises foram feitas após 0, 24, 48 e 96 h de exposição das raízes a *Meloidogyne exigua*. Barras com a mesma letra em cada gráfico não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott e Knott ($P \leq 0,05$) 90

Figura 2 Concentrações dos metabólitos identificados e quantificados por ressonância magnética nuclear de hidrogênio em raízes de cafeeiro resistente (IAPAR-59) e suscetível (Catuaí-Vermelho) a nematóides fitoparasitas. As análises foram

	feitas após 0, 24, 48 e 96 h de exposição das raízes a <i>Meloidogyne exigua</i> . Barras com a mesma letra em cada gráfico não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott e Knott ($P \leq 0,05$).....	92
Figura 3	Escores da análise de componentes principais dos espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio dos extratos das raízes de cultivares de cafeeiro resistente (Rx.y, sendo “x” correspondente ao tempo após a inoculação do nematóide e “y” o número da repetição) e suscetível (Sx.y, idem) a nematóides, após 0, 24, 48 e 96 horas da inoculação de 696 juvenis do segundo estágio de <i>Meloidogyne exigua</i> nas plantas.....	93
Figura 4	Mortalidade de juvenis do segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne exigua</i> expostos a extratos das raízes de mudas de cafeeiros resistentes (IAPAR-59) e suscetíveis (Catuaí-Vermelho) a nematóides, que foram inoculadas com <i>M. exigua</i> para com eles ficaram em contato durante 0, 24, 48 e 96 h. Barras com a mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott e Knott ($P \leq 0,05$)	94

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	
1	INTRODUÇÃO.....	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
2.1	Nematóides de galhas.....	16
2.2	Substâncias orgânicas voláteis empregadas como sinalizadoras por plantas.....	19
2.3	Substâncias orgânicas de origem vegetal ativas contra nematóides.....	25
2.3.1	Aminoácidos.....	25
2.3.2	Alcalóides.....	27
2.3.3	Fenóis.....	34
2.3.4	Carboidratos.....	36
	REFERÊNCIAS.....	38
	SEGUNDA PARTE – ARTIGOS	
	ARTIGO 1 influências de substâncias orgânicas voláteis na produção metabólita de <i>Solanum lycopersicum</i> e <i>Phaseolus vulgaris</i> e na resistência de tais plantas ao nematóide de galhas <i>Meloidogyne incognita</i>	46
1	RESUMO.....	46
2	ABSTRACT.....	47
3	INTRODUÇÃO.....	48
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	49
4.1	Substâncias orgânicas voláteis (SOV's).....	49
4.2	Inóculo do nematóide.....	50
4.3	Efeito <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> das (SOV's) sobre <i>Meloidogyne incognita</i>	50
4.4	Influência das substâncias orgânicas voláteis (SOV's) na produção metabólita das plantas.....	52
4.4.1	Quantificação de aminoácidos livre, carboidratos solúveis e sacarose.....	52
4.4.2	Quantificação de fenóis totais.....	54
4.4.3	Quantificação de alcalóides totais.....	54
4.4.4	Análise por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹ H).....	55
4.5	Atividade <i>in vitro</i> de extratos das raízes contra o nematóide....	56
4.6	Análise estatística.....	56
5	RESULTADOS.....	56
5.1	Efeito de substâncias orgânicas voláteis (SOV's) na população de <i>Meloidogyne incognita</i>	56

5.2	Efeito <i>in vitro</i> de substâncias orgânicas voláteis (SOV's) sobre <i>Meloidogyne incognita</i>	57
5.3	Influências das substâncias orgânicas voláteis (SOV's) na produção metabólita nas raízes de <i>Solanum lycopersicum</i> e <i>Phaseolus vulgaris</i>	59
5.4	Atividade <i>in vitro</i> dos extratos das raízes contra <i>Meloidogyne incognita</i>	64
6	DISCUSSÃO.....	66
7	CONCLUSÃO.....	72
	REFERÊNCIAS	73
	ARTIGO 2: Variações metabólitas em raízes de cafeeiro expostas ao nematóide de galhas <i>Meloidogyne exigua</i>	79
1	RESUMO.....	79
2	ABSTRACT.....	80
3	INTRODUÇÃO.....	81
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	83
4.1	Inóculo do nematóide.....	83
4.2	Obtenção das mudas de cafeeiro.....	83
4.3	Montagem dos experimentos com mudas de cafeeiro	84
4.4	Quantificação de aminoácidos e carboidratos nas raízes de plantas de cafeeiro.....	84
4.5	Quantificação de fenóis nas raízes de plantas de cafeeiro.....	85
4.6	Quantificação de alcalóides nas raízes de plantas de cafeeiro...	86
4.7	Análise por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹ H).....	87
4.8	Atividade <i>in vitro</i> de extratos de raízes de plantas de cafeeiro contra o nematóide	87
4.9	Análise estatística.....	88
5	RESULTADOS.....	88
5.1	Quantificação de aminoácidos, carboidratos, fenóis e alcalóides nas raízes de plantas de cafeeiro.....	88
5.2	Análise por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹ H).....	91
5.3	Atividade <i>in vitro</i> de extratos de raízes de plantas de cafeeiro contra nematóide.....	93
6	DISCUSSÃO.....	94
7	CONCLUSÃO.....	99
	REFERÊNCIAS.....	101
	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	106

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

Todas as espécies de plantas cultiváveis são atacadas por fitonematóides, cuja presença no solo pode passar despercebida pelos agricultores devido ao seu tamanho reduzido e ao fato de nem sempre acarretarem sintomas visíveis nas plantas atacadas. Estima-se que perdas de até 12,7 % sejam ocasionadas na produção mundial de grãos por fitonematóides, dentre os quais se destacam aqueles do gênero *Meloidogyne*, que apresentam ampla distribuição geográfica e grande número de plantas hospedeiras. Além dos prejuízos diretos, tais parasitas podem debilitar a planta, tornando-a suscetível a outras doenças e, conseqüentemente, reduzindo ainda mais a produção agrícola (MOLINARI, 2009).

No Brasil há vários métodos alternativos para o controle de fitonematóides, mas infelizmente a eficiência dos mesmos é, em vários casos, inferior a observada para aqueles que empregam substâncias nematicidas de origem sintética com elevada toxicidade (DINARDO-MIRANDA et al., 2008). Como existe uma pressão por parte da sociedade para que o uso destas substâncias seja cada vez mais restrito, faz-se necessário buscar novas metodologias menos onerosas e que não contaminem o meio ambiente com substâncias de alta toxicidade (CHITWOOD, 2002).

A resistência de plantas a nematóides tem sido considerada uma potencial alternativa para o manejo de fitonematóides, principalmente aqueles do gênero *Meloidogyne*, que apresentam uma interação especializada com seus hospedeiros (ROBERTS, 2002). Em decorrência, é de grande importância estudar as influências de substâncias orgânicas voláteis (SOV's) na população de nematóides fitoparasitas em plantas, já que tais substâncias podem estar

relacionadas aos mecanismos de defesa de plantas contra organismos fitopatogênicos (ARIMURA et al., 2005; PARÉ et al., 2005). Também vale mencionar que o estudo dos mecanismos de resistência de plantas a nematóides, pode contribuir para o desenvolvimento de novos produtos mais eficientes e de menores toxicidades que aqueles atualmente empregados no controle de *Meloidogyne* spp. Ademais, poderá ser uma importante etapa para o desenvolvimento de novas cultivares a serem utilizadas em áreas infestadas com *Meloidogyne* spp.

Diante do exposto, um dos objetivos do presente trabalho consistiu em verificar se a população de *Meloidogyne incognita* (Kofoid e White, 1919) Chitwood, 1949, em tomateiros (*Solanum lycopersicum* L., 1753) e feijoeiros (*Phaseolus vulgaris* L., 1753) pode ser afetada pela aplicação nas plantas de substâncias orgânicas voláteis (SOV's). Ademais, buscou-se quantificar vários metabólitos nas raízes das referidas plantas com vistas a averiguar uma possível correlação com o mecanismo de ação das SOV's. Com vistas a contribuir para a elucidação dos mecanismos de resistência de cafeeiros a *Meloidogyne exigua* Goeldi, 1887, o presente trabalho também teve como objetivo a identificação e quantificação de vários metabólitos nas raízes de *Coffea arabica* L. cv. Catuaí-Vermelho e nas raízes da linhagem gerada (F8) cv. IAPAR-59, que são respectivamente suscetíveis e resistentes ao nematóide de galhas *M. exigua*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Nematóides de galhas

Os nematóides parasitas de plantas são amplamente disseminados pelo Brasil, sendo responsáveis pela redução na produção e no valor comercial de diversas culturas de importância econômica. Dentre estes patógenos se destacam os nematóides de galhas (*Meloidogyne* spp.) que, por possuírem um grande número de plantas hospedeiras, são responsáveis por 12,7% dos prejuízos observados na produção agrícola mundial (MOLINARI, 2009).

O ciclo de vida destes animais se inicia com um ovo, normalmente no estágio unicelular, que é depositado pela fêmea no interior da raiz. O desenvolvimento do embrião começa dentro de poucas horas depois da deposição, resultando na formação de uma larva (TIOHOD, 2000). A primeira ecdise ocorre no interior do ovo, com a transformação das larvas em juvenis de segundo estágio (J2, Figura, 1), que eclodem e passam a migrar no solo à procura de raízes de plantas hospedeiras. Para tanto, o J2 de *Meloidogyne* spp. possui reservas energéticas corporais, principalmente na forma lipídica, necessárias para a sua locomoção e infectividade (CAMPOS et al., 2006).

Seguindo um gradiente de concentração de exsudatos radiculares, o J2 orienta seu movimento em direção à raiz e a penetra na região da zona de alongamento celular, logo atrás da coifa. Em seguida, o nematóide secreta substâncias que causam modificações em células localizadas próximas à região dos vasos, dando origem às chamadas células gigantes, que aumentam de tamanho e passam a fornecer alimento ao nematóide, que se torna sedentário (ZHAO et al., 2000).



Figura 1 Foto do juvenil do segundo estágio com aumento de 10 vezes

Uma das possibilidades para o controle destes animais consiste em manter uma área sem os hospedeiros do nematóide por algum tempo, o que é conhecido como pousio. Com isso, ocorre significativa redução na população dos nematóides. Em trabalho realizado por Souza et al. (2006), não se observou *Meloidogyne mayaguensis* Rammah e Hirschmann, 1988, em área submetida ao pousio por oito meses. Entretanto, goiabeiras transplantadas para a referida área apresentaram galhas após seis meses de plantio. Os autores concluíram que *M. mayaguensis* pode sobreviver no solo, possivelmente na forma de ovos dormentes, em nível populacional não detectado. Em decorrência, os autores não aconselham o pousio como forma de controle para esse nematóide.

Métodos culturais como a rotação de culturas com espécies não hospedeiras e/ou antagonistas de nematóides, têm apresentado resultados positivos para o controle de nematóides (COSTA; FERRAZ, 1990). Este método

é capaz de manter as populações destes patógenos abaixo do nível para causar dano econômico, sem oferecer riscos ao ambiente (FERRAZ; VALLE, 1995). Apesar de tais possibilidades serem de grande valor, demandam planejamento, já que se faz necessário o investimento de tempo e dinheiro para que possam alcançar o sucesso. Ademais, existem várias culturas, principalmente as perenes, que apresentam grandes dificuldades para a implementação de tais metodologias (SASSER; CARTER, 1985; STARR et al., 2002; VIAENE, 1998).

Em princípio, os nematóides de galhas podem ser controlados em algumas culturas pelo uso de genes para resistência, como é o caso do gene Mi, proveniente de *Lycopersicon peruvianum* (L.) Mill, 1768, que foi empregado para conferir resistência a tomateiros comerciais. No entanto, populações de *Meloidogyne* capazes de contornar tal resistência já foram identificadas. Por exemplo, Rodríguez et al. (2007), ao realizarem testes de parasitismo de *M. mayaguensis* com diferentes espécies botânicas, demonstraram que o feijoeiro comum (IPA-9), o caupi (IPA-206) e os cultivares de tomateiros Santa Cruz e Viradouro, portadores do gene Mi, se mostraram suscetíveis à essa espécie de nematóide.

O controle químico tem sido o principal método de combate aos fitonematóides. Existem vários produtos com efeito nematicida no mercado brasileiro, os quais são, em maior parte, sistêmicos (CAMPOS et al., 2001). Embora este método represente a possibilidade mais viável sob o aspecto econômico após o estabelecimento da cultura, tem demonstrado também inúmeras limitações, como por exemplo, a natureza temporária do controle obtido, a possibilidade de acumulação dos materiais tóxicos no solo e risco a saúde humana (CHITWOOD, 2002; STARR et al., 2007).

Medidas de controle de *Meloidogyne* pelo emprego de organismos antagonísticos a nematóides têm sido estudadas por vários pesquisadores que, em geral, optam por trabalhar com fungos e bactérias. Há vários fungos

nematófagos, que empregam seus micélios como armadilhas ou produzem esporos que aderem à cutícula do nematóide. Dentre as bactérias se destacam as do gênero *Pasteuria*, que aderem à cutícula do nematóide para nele penetrar em seguida. Apesar da eficiência observada em vários experimentos, tais agentes de controle biológico ainda não podem ser produzidos e utilizados de forma economicamente viável (PIMENTEL et al., 2009).

2.2 Substâncias orgânicas voláteis empregadas como sinalizadoras por plantas

As plantas liberam misturas complexas de substâncias orgânicas voláteis para a atmosfera, cujas composições podem ser facilmente alteradas em decorrência de ataques por insetos herbívoros e patógenos. Em geral, estas misturas se tratam de substâncias de baixa polaridade que apresentam alta pressão de vapor e podem atravessar as membranas celulares com facilidade para serem liberadas na atmosfera e no solo (DUDAREVA et al., 2006). Na grande maioria dos casos são terpenóides, fenilpropanóides e derivados de aminoácidos, carotenos e de ácidos graxos (Figura 2).

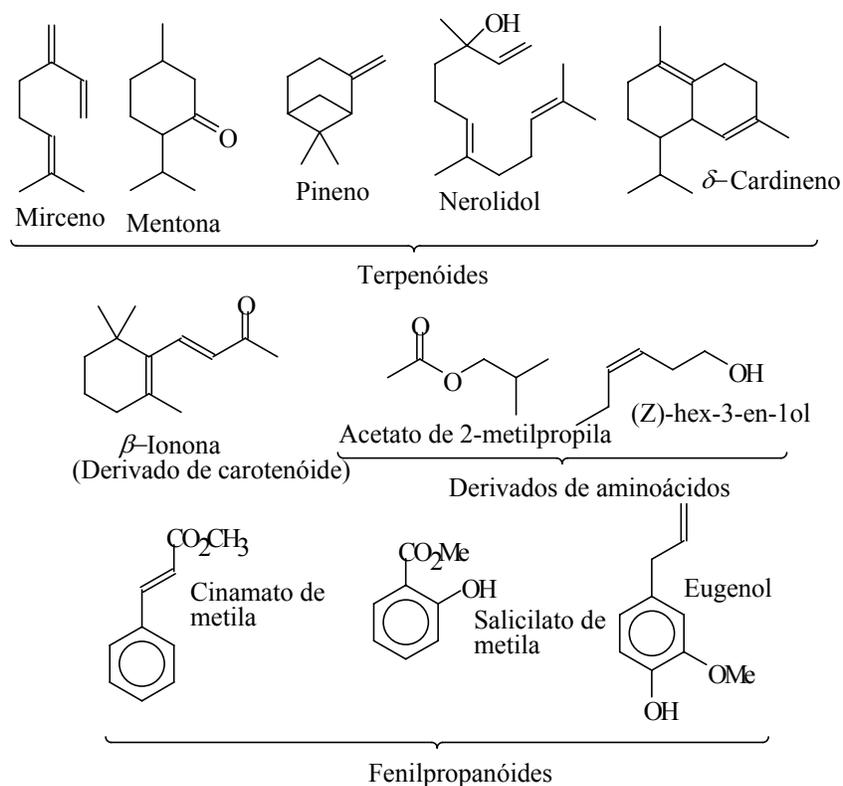


Figura 2 Exemplos de substâncias orgânicas voláteis de origem vegetal

Há diversos dados na literatura que deixam evidentes as várias funções das substâncias orgânicas voláteis de origem vegetal, dentre as quais vale destacar aqui o papel na defesa das plantas (ARIMURA et al., 2005; MATSUI, 2006; PARÉ et al., 2005; PARÉ; TUMLINSON, 1999; RODA; BALDWIN, 2003). Uma das formas de atuação desses compostos consiste em atrair predadores de insetos herbívoros (PASCHOLD et al., 2006), o que pode ser exemplificado pelo nerolidol (Figura, 2). Esta substância atrai o ácaro predador *Phytoseiulus persimilis* Athias-Henriot, 1957, para plantas infestadas com ácaros herbívoros (DUDAREVA et al., 2006). Há também a possibilidade de empregar

substâncias orgânicas voláteis como sinalizadores para que as folhas não atacadas por pragas ou doenças de uma planta ou de suas vizinhas possam produzir substâncias de defesa. Este é o caso, por exemplo, de *Phaseolus lunatus* L., 1753, que, ao ser atacada por ácaros herbívoros, libera (Z)-hex-3-en-1-ol, (E)-hex-2-enal e acetato de (Z)-hex-3-enila (Figura, 3), que ativam várias proteínas relacionadas ao sistema de defesa em plantas vizinhas não atacadas pelo inseto (ARIMURA et al., 2001; KOST; HEIL, 2006). Sabe-se também, que as plantas de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh, 1842, expostas a (E)-hex-2-enal, (Z)-hex-3-enal, (Z)-hex-3-enol ou *allo*-ocimeno, têm maior resistência ao fungo *Botrytis cinerea* Pers, 1794 (KISHIMOTO et al., 2005). Segundo Bate e Rothstein (1998), o (E)-hex-2-enal ativa vários genes em plântulas de *Arabidopsis* que estão envolvidos com o sistema de defesa da planta. Tais resultados são confirmados por Kishimoto et al. (2006), segundo os quais as substâncias voláteis induzem o aumento da lignificação, o que torna a penetração do fungo mais difícil. Ademais, ocorre o acúmulo de substâncias antifúngicas como a camalexina, que inibe o crescimento fúngico no interior da planta.

Quando expostas a (Z)-hex-3-en-1-ol (Figura, 1), plantas de milho intactas (*Zea mays* L., 1753) liberam uma mistura de substâncias voláteis idêntica àquela observada quando as plantas são atacadas por lagartas, cuja função é atrair predadores do inseto (FARAG et al., 2005). Uma potencial forma de aproveitar tal comportamento diz respeito à liberação de substâncias orgânicas voláteis na proximidade de plantas que se queira proteger de algum ataque. Cientes disto, Heil e Kost (2006) liberaram, em baixa concentração, durante 24 h, uma mistura de acetato de (Z)-hex-3-enila, (E/Z)- β -ocimeno, (R)-(-)-linalool, (3E)-4,8-dimetilnona-1,3,7-trieno, salicilato de metila, (Z)-jasmona, β -cariofileno e (3E,7E)-4,8,12-trimetiltrideca-1,3,7,11-tetraeno (Figuras, 2 e 3), na presença de *P. lunatus*. A seguir, fizeram danos mecânicos na planta e avaliaram as respostas do seu sistema de defesa, o que permitiu observar que os

indivíduos submetidos à referida mistura de substâncias voláteis tinham apresentado resposta 180 % superior a daqueles sem qualquer exposição. Keinanen et al. (2001) também fizeram uso de tal possibilidade ao exporem *Nicotiana attenuata* Steud, 1821, a jasmonato de metila (Figura, 3). Com isso, as concentrações de alguns metabólitos diretamente ligados ao sistema de defesa da planta (cafeoilputrescina, nicotina e diterpenos glicosilados) aumentaram sensivelmente nas folhas.

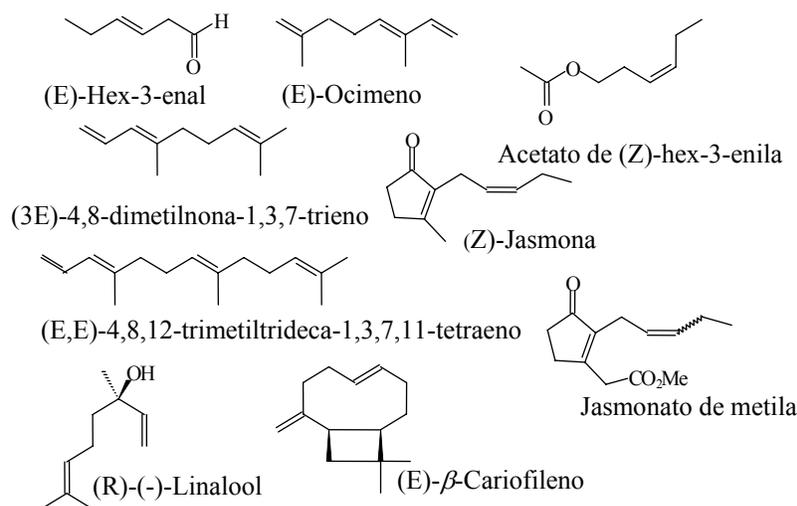


Figura 3 Substâncias orgânicas voláteis liberadas por folhas infestadas por insetos, que ativam o sistema de defesa de folhas intactas da planta atacada ou de suas vizinhas

Ao se borrifar *Ocimum basilicum* L., 1753, com soluções de jasmonato de metila (Figura, 3) a 0,1 e 0,5 mM, Kim et al. (2006) observaram grande aumento nas concentrações de ácido rosmarínico, ácido cafeico, linalool e de

eugenol. Em trabalho subsequente, verificou-se que o jasmonato de metila induz o aumento da produção das enzimas lipoxigenase (LOX), ácido 4-hidroxicinamicolase (C4H), prefenato desidrogenase (PDH), polifenol oxidase (PPO), ácido fosfatase (APase) e pentatricopeptídeo repetidora (PPR), que têm papel fundamental na produção dos metabólitos secundários da referida planta (LI et al., 2007).

Jasmonato de metila (Figura, 3) também tem efeito sobre *Solanum lycopersicum* L., 1753, já que acarreta o aumento da atividade de arginase, que é uma enzima de grande importância no metabolismo do aminoácido L-arginina para a produção de poliaminas e de óxido nítrico (CHEN et al., 2004). Já em plântulas de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don, 1837, e *Cinchona ledgeriana* (Howard) Bern. Moens ex Trimen, 1881, jasmonato de metila na concentração de $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ no ar faz com que a produção de alcalóides em tais plantas seja duplicada (AERTS et al., 1994). Em *Picea abies* (L.) H. Karst., 1881, a referida substância induz a formação de uma oleoresina rica em terpenóides que protege a planta de pragas e doenças (MARTIN et al., 2002).

As substâncias orgânicas voláteis também podem ser empregadas entre diferentes espécies. Para exemplificar é possível mencionar a *Artemisia tridentata* Nutt. que, ao liberar várias substâncias pela parte aérea como jasmonato de metila (Figura, 3), metacroleína e alguns terpenóides, torna plantas de *Nicotiana attenuata* Steud, 1821, mais preparadas para a resistência a insetos herbívoros. Quando atacadas por lagartas de *Manduca sexta* Linnaeus, 1763, ocorreu uma acelerada produção de inibidores da tripsina proteinase em indivíduos de *N. attenuata* nas proximidades da planta *A. tridentata* (KESSLER et al., 2006).

A liberação de substâncias orgânicas voláteis não se dá apenas pela parte aérea. Sabe-se, por exemplo, que quando atacadas por bactérias patogênicas ou por insetos predadores, as raízes de plantas podem liberar substâncias como o

1,8-cineol, também conhecido como eucaliptol (Figura, 4). Este monoterpeneo oxigenado tem atividades antimicrobianas e possui ação tóxica contra alguns insetos. Outro exemplo consiste no (E)- β -cariofileno (Figura, 3), cuja liberação por raízes de milho foi observada após ataque pelo besouro *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte, 1868. Tal substância é um forte atrativo para o nematóide entomopatogênico *Heterorhabditis megidis* Poinar, Jackson e Klein, 1987, (DUDAREVA et al., 2006).

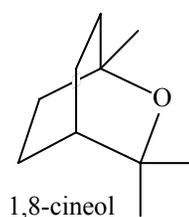


Figura 4 Estrutura do 1,8-cineol, que pode ser liberado pelas raízes de plantas

Também vale mencionar que o efeito promotor do crescimento de plantas por rizobactérias pode ser, em grande parte, decorrente da produção de substâncias orgânicas voláteis por tais microrganismos. Em trabalhos recentes (RYU et al., 2004; RYU et al., 2003) foi observado que butano-2,3-diol, acetoína (Figura, 5) e análogos, produzidos por *Bacillus* spp., são capazes de ativar vários genes relacionados ao sistema de defesa de *Arabidopsis*.

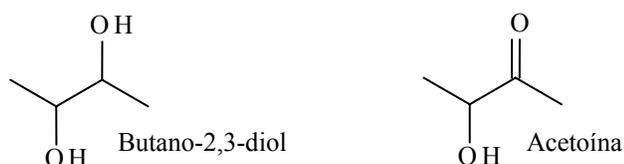


Figura 5 Substâncias orgânicas voláteis produzidas por bactérias que aumentam a resistência de *Arabidopsis* a pragas e doenças

2.3 Substâncias orgânicas de origem natural ativas contra nematóides

Vários trabalhos têm vislumbrado a obtenção de nematicidas naturais, biodegradáveis e menos tóxicos, a partir de diversas espécies vegetais. Ou seja, de um modo geral, as plantas produzem uma série de substâncias que podem atuar na defesa contra agentes patogênicos como, por exemplo, fitonematóides (CHITWOOD, 2002). Logo, em princípio é possível que este seja o mecanismo de defesa de várias espécies vegetais contra nematóides.

2.3.1 Aminoácidos

Em trabalho recente, com *Meloidogyne exigua* Goeldi, 1887, Oliveira et al. (2009) identificaram aminoácidos de origem bacteriana com propriedades nematicidas. Alguns aminoácidos de fontes comerciais também foram submetidos a testes *in vitro* com *M. exigua*, o que permitiu observar que L-cisteína (Figura, 6) era o mais ativo de todos, com CL_{50} de $283 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Nas mesmas condições o nematicida comercial aldicarbe apresentou CL_{50} de $26 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Os resultados obtidos estão em sintonia com o trabalho realizado por Barbosa et al. (1999), que observaram a atividade de L-3,4-diidroxifenilalanina (Figura, 6) contra e *Heterodera glycines* Ichinoe, 1952. De forma análoga, Osman (1993) observou a atividade de L-arginina e de ácido L-glutâmico (Figura, 6) contra *Meloidogyne javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949. Também é possível mencionar o trabalho de Talavera e Mizukubo (2005), que verificaram a atividade de DL-metionina (Figura, 6) contra *M. incognita*.

Segundo Perry e Maule (2004), o ácido 4-aminobutírico (Figura, 6) pode causar paralisia flácida dos músculos de nematóides e, especificamente em *Ascaris suum* Goeze, 1782, observou-se que tal substância inibia os neurônios responsáveis pelo nervo ventral. Também se observa que o ácido L-glutâmico

(Figura, 6) induz tanto respostas inibitórias, quanto excitatórias em nematóides; e que há evidências de que glicina (Figura, 6) pode ter importante papel no sistema nervoso central desses animais.

Além da ação direta dos aminoácidos contra nematóides, tem-se observado significativa variação na quantidade e na proporção de aminoácidos em plantas infectadas com nematóides. Este é o caso, por exemplo, de algodão (*Gossypium hirsutum* L., 1763). Verificou-se que após dois dias da inoculação de mudas com juvenis do segundo estágio (J2) de *M. incognita*, a cultivar resistente Clevevilt 6-3-5 tinha quantidade de aminoácidos nas raízes aproximadamente 50 % superior ao observado para a cultivar suscetível M8 (LEWIS; MCCLURE, 1975).

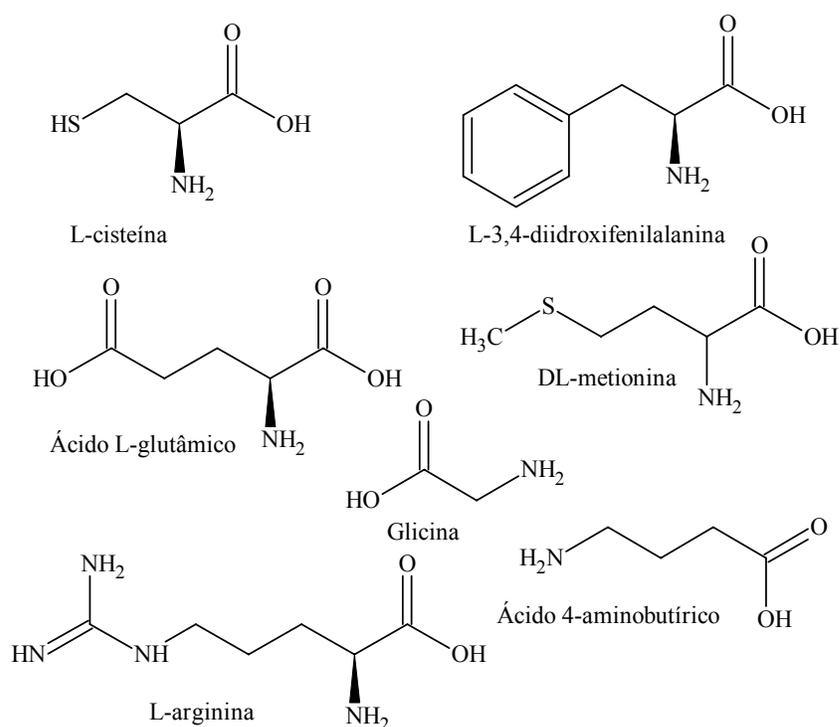


Figura 6 Estrutura de aminoácidos ativos contra nematóides

2.3.2 Alcalóides

Os alcalóides podem ser definidos como substâncias básicas de ocorrência natural em plantas, derivadas de aminoácidos, que contêm no mínimo um átomo de nitrogênio em uma estrutura heterocíclica. Entretanto, há algumas substâncias, denominadas pseudoalcalóides por alguns autores, que não parecem ser oriundas de aminoácidos (CORDELL, 1981). A função dos alcalóides nos mecanismos de defesas químicas das plantas é comprovada pela grande variedade de efeitos fisiológicos que exercem sobre os animais e também por suas atividades antimicrobianas. Vários alcalóides são tóxicos aos insetos e atuam como repelentes para herbívoros (FUMAGALLI et al., 2008).

Em uma revisão realizada por Chitwood (2002), sobre substâncias de origem natural com propriedades nematicidas, podem-se encontrar vários alcalóides ativos contra nematóides (Tabela 1). Aparentemente, o primeiro relato de alcalóide com atividade nematicida ocorreu para a fisostigmina, também conhecida como eserina (Tabela 1), que foi isolada de *Physostigma venenosum* Balf, 1861. Tal substância podia imobilizar irreversivelmente *Ditylenchus dipsaci* (Kuhn, 1857) Filipjev, 1936, quando na concentração de 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Desde então, vários outros alcalóides com atividade nematicida foram identificados (Tabela 1).

Também se pode mencionar aqui o trabalho de Kusano et al. (2000), que observaram atividade *in vitro* contra *Pratylenchus penetrans* (Cobb, 1917) Chitwood e Oteifa, 1952, por parte dos alcalóides penigequilona e peniprequinolona (Figura, 7). De forma análoga, verificou-se que ergotamina (Figura, 7) é altamente eficiente para a imobilização de *Pratylenchus scribneri* Steiner, 1943 (PANACCIONE, 2005).

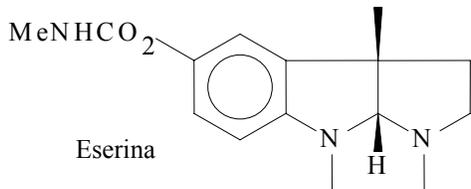
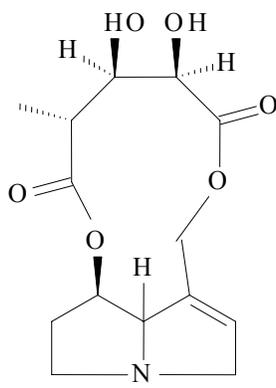
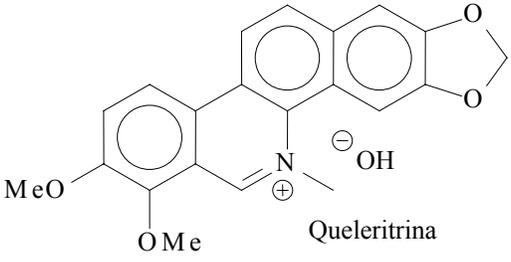
Além de apresentarem potencial para emprego no controle de nematóides parasitas de plantas, os alcalóides também têm sido estudados para o

controle de espécies parasitas de animais. Satou et al. (2002a), por exemplo, observaram que queleritrina (Tabela 1) e sanguinarina (Figura, 7) eram ativos contra o nematóide *Toxocara canis* Werner, 1782. De forma análoga, McDougal et al. (1986) observaram que a bengamida A (Figura, 7) atuava contra o nematóide *Nippostrongylus braziliensis*, Travassos, 1914, enquanto a protopina (Figura, 7) era ativa contra *Strongyloides ratti* Sandground, 1925, e *Strongyloides venezuelensis* Brumpt, 1934 (SATO et al., 2002b).

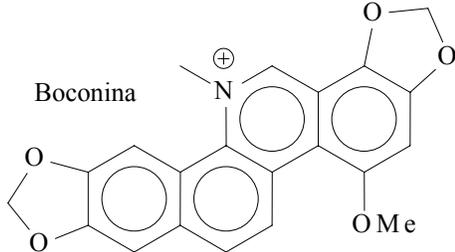
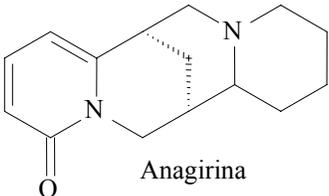
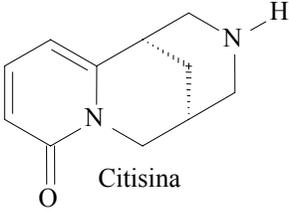
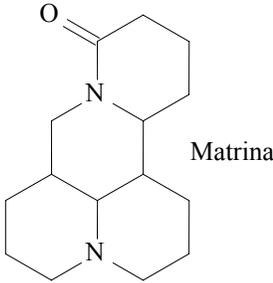
Também vale mencionar aqui que vários alcalóides possuem forte atividade inibidora da acetilcolinesterase. Para exemplificar é possível citar a eserina (Tabela 1), sanguinina, deidroevodiamina, turbinatina e hamaina (Figura, 8; HOUGHTON et al., 2006). Tal atividade é altamente relevante se levarmos em consideração que uma das formas de ação de substâncias orgânicas contra nematóides consiste em inibir a referida enzima (OPPERMAN; CHANG, 1990).

Talvez a produção de alcalóides com propriedades nematicidas possa ser simplesmente um acaso em algumas espécies vegetais, mas há indícios de que isso na verdade seja parte de um mecanismo de defesa contra fitonematóides. Segundo Voinilo e Ponin (1979), a quantidade de glicoalcalóides é maior em cultivares de batata (*Solanum tuberosum* L. 1753) resistentes a nematóides. Ademais, observa-se que quando expostas aos nematóides, tais cultivares aumentam sensivelmente a produção dos referidos alcalóides. Especialmente para o glicoalcalóide α -chaconina (Figura, 7), que tem comprovada atividade nematicida *in vitro* (ALLEN et al., 1971). Tais resultados são bastante razoáveis se levarmos em consideração que a principal função dos alcalóides em plantas é a defesa contra diversos organismos. Sabe-se que a produção de vários deles é estimulada pela presença de agentes patogênicos. Para exemplificar, podem ser citadas a ajmalicina e a catarantina (Figura, 9), cuja produção é estimulada por fungos (WINK, 1997).

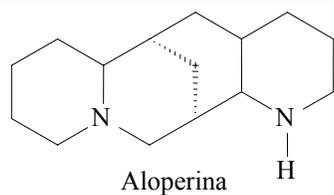
Tabela 1 Estruturas e nomes de alcalóides com atividade nematicida, plantas das quais podem ser isolados e nematóides contra os quais são ativos (CHITWOOD, 2002)

Alcalóide	Planta	Nematóide
 <p>Eserina</p>	<p><i>Physostigma venenosum</i> Balf, 1861.</p>	<p><i>Ditylenchus dipsaci</i> (Kuhn, 1857) Filipjev, 1936.</p>
 <p>Monocrotalina</p>	<p><i>Crotalaria spectabilis</i> Roth, 1821.</p>	<p><i>Meloidogyne incognita</i> (Kofoid e White, 1919) Chitwood, 1949.</p>
 <p>Queleritrina</p>	<p><i>Bocconia cordata</i> Willd, 1797.</p>	<p><i>Rhabditis sp.* e Panagrolaimus sp.*</i></p>

“Tabela 1, continuação”

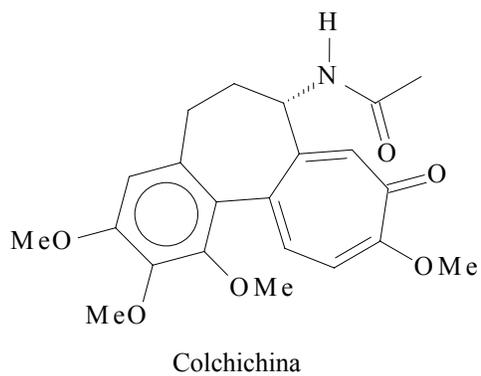
<p>Boconina</p> 	<p><i>Bocconia</i> <i>cordata</i> Willd, 1797.</p>	<p><i>Rhabditis</i> sp.* e <i>Panagrolaimus</i> sp.*</p>
<p>Anagirina</p> 	<p><i>Sophora</i> <i>flavescens</i> Aiton, 1789.</p>	<p><i>Bursaphelenchus</i> <i>xylophilus</i> Steiner e Buhner, 1934.</p>
<p>Citisina</p> 	<p><i>Sophora</i> <i>alopecuroides</i> L., 1753.</p>	<p><i>Bursaphelenchus</i> <i>xylophilus</i> Steiner e Buhner, 1934.</p>
<p>Matrina</p> 	<p><i>Sophora</i> <i>alopecuroides</i> L., 1753.</p>	<p><i>Bursaphelenchus</i> <i>xylophilus</i> Steiner e Buhner, 1934.</p>

“Tabela 1, continuação”



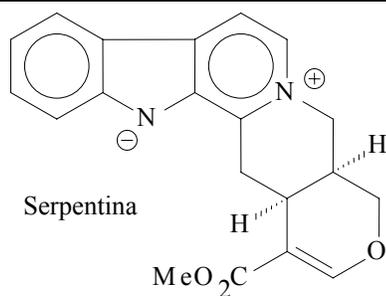
Sophora
alopecuroides
L., 1753.

Bursaphelenchus
xylophilus Steiner
e Buhner, 1934.



Catharanthus
roseus (L.) G.
Don, 1837.

Meloidogyne
incognita (Kofoid
e White, 1919)
Chitwood, 1949.



Catharanthus
roseus (L.) G.
Don, 1837.

Meloidogyne
incognita (Kofoid
e White, 1919)
Chitwood, 1949.

* Nematóide de vida livre.

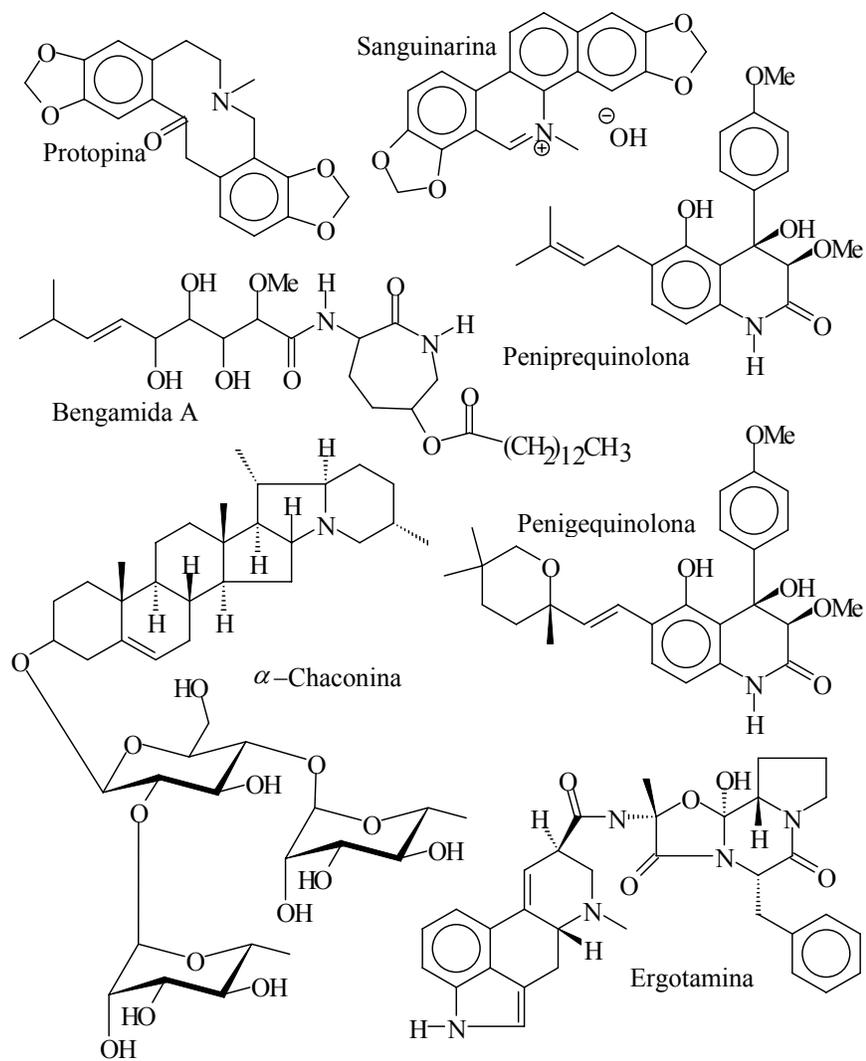


Figura 7 Estruturas de alcalóides com propriedades nematocidas

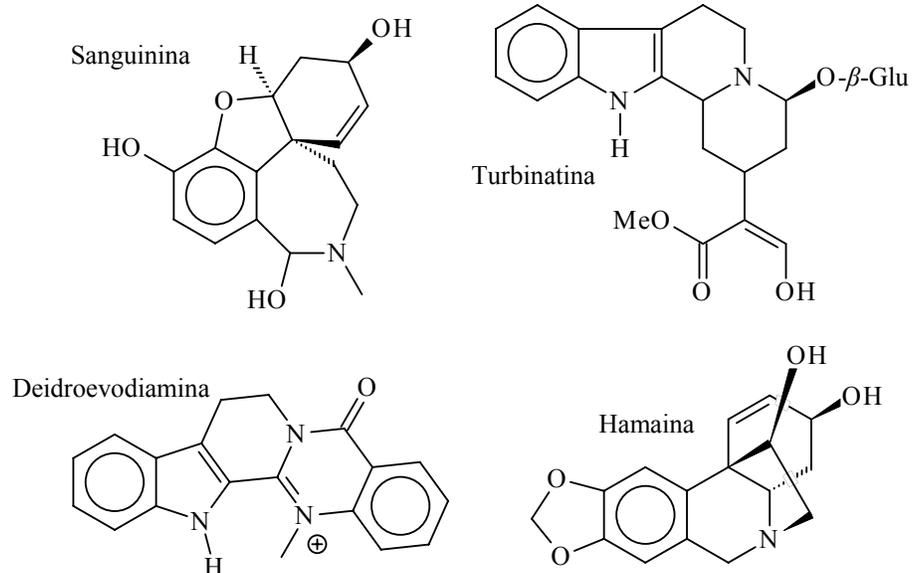


Figura 8 Estruturas de alguns alcalóides inibidores da acetilcolinesterase

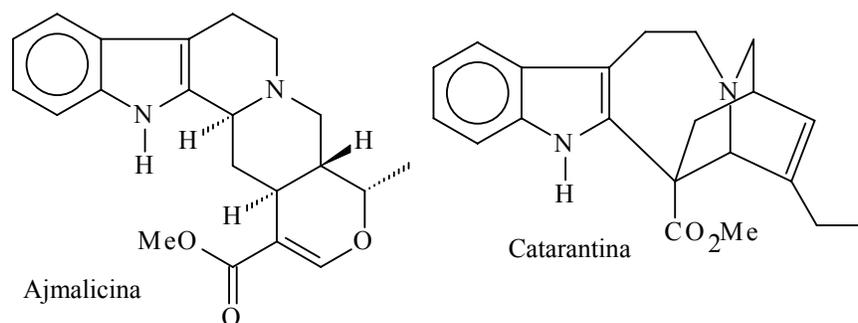


Figura 9 Estruturas de alcalóides cuja produção pelas plantas é estimulada por fungos

Por tudo o que foi exposto, fica claro que averiguar possíveis interações entre as respostas de plantas ao ataque por nematóides e a produção de alcalóides pelas mesmas pode ser de grande importância para o desenvolvimento de novos métodos de controle desses fitoparasitas.

2.3.3 Fenóis

Os compostos fenólicos são amplamente utilizados por plantas como parte do seu mecanismo de defesa contra fitopatógenos. Em decorrência, vários fenóis apresentam potencial para uso no controle de nematóides parasitas de plantas. Para exemplificar é possível mencionar o trabalho realizado por Gupta et al. (2005). Utilizando *M. incognita* e *Rotylenchulus reniformis* Linford e Oliveira, 1940, os autores verificaram que 3,4-dimetilfenol (Figura, 10) apresentava atividade nematicida. De forma análoga, Li et al. (2006) observaram que o 2,3-diidroxí-6-metilbenzoato de butila (Figura, 10) era ativo contra o nematóide de vida livre *Panagrellus redivivus* Goodey, 1945.

Trabalhando com ovos de *M. incognita*, Balaji et al. (1988) verificaram que catecol (Figura, 10) era capaz de inibir totalmente a eclosão de juvenis do segundo estágio na concentração de 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Ao trabalhar com o mesmo nematóide, Mahajan et al. (1985) observaram que o ácido 2-hidroxinaftóico (Figura, 10) também reduzia a eclosão.

Ao estudar vários alquilfenóis, Takaishi et al. (2004) observaram que o 3-nonilfenol (Figura, 10) apresentava elevada atividade contra o nematóide *Bursaphelenchus xylophilus* Steiner e Buhner, 1934. Utilizando o nematóide de vida livre *Caenorhabditis elegans* Maupas, 1900, Tominaga et al. (2003) verificaram que bisfenol A e 4-(1-adamantil)fenol (Figura, 10) eram capazes de afetar a fecundidade do nematóide em concentrações 100 a 10.000 vezes inferiores aos valores obtidos para a sua CL_{50} .

Mishara et al. (2007) observaram que, ao inocularem *Meloidogyne graminicola* Golden e Birchfield, 1965, em plantas de arroz, as resistentes produziam maiores quantidades de fenóis que aquelas suscetíveis. De forma análoga, Bajaj et al. (1983) observaram que plantas de tomateiro resistentes a *M. incognita* produziam maiores quantidades de *o*-diidroxifenóis e de flavonóis que aquelas suscetíveis a tal nematóide. Já no trabalho de Hung e Rohde (1973), com tomateiros inoculados com *M. incognita* ou *Pratylenchus penetrans* Cobb, 1917, observou-se que a quantidade do ácido clorogênico era maior nas plantas resistentes. Algo semelhante foi observado em plantas de pimenta (*Capsicum annum* L., 1753) inoculadas com *Meloidogyne arenaria* Chitwood, 1949, *M. incognita* ou *M. javanica*. Neste caso, acredita-se que o principal fenol associado com a resistência a nematóide seja o ácido clorogênico (PEGARD et al., 2005).

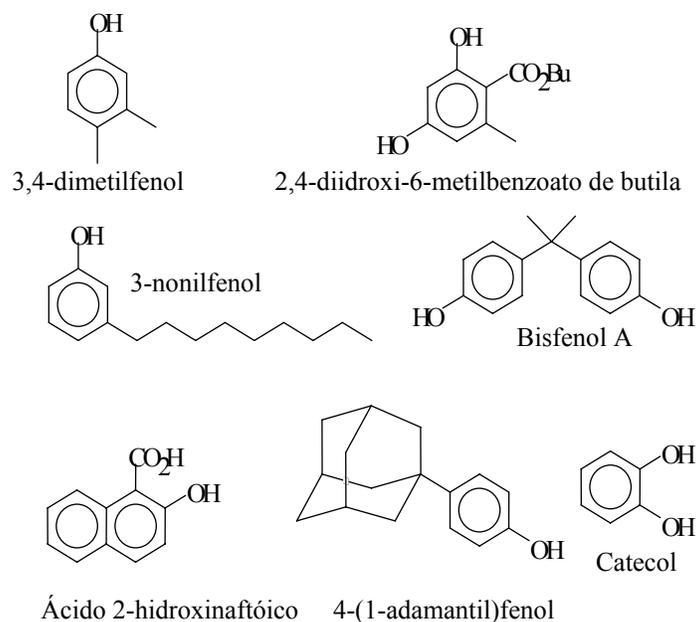


Figura 10 Fenóis com propriedades nematicidas

2.3.4 Carboidratos

Além de regularem a expressão de genes do metabolismo primário de plantas (CHOUREY et al., 1995), os carboidratos também podem regular a expressão de genes específicos de proteínas relacionadas com os ataques por fitopatógenos (SADKA et al., 1994). Para exemplificar é possível citar o trabalho realizado por Ehness (1997), com plantas de *Chenopodium rubrum* L., 1753, tratadas com glicose em concentrações de 20 a 100 mM. Ao analisarem os tecidos vegetais, os autores observaram altas concentrações das enzimas envolvidas em mecanismos de defesa vegetal, como a fenilalanina amônia-liase (PAL) e a invertase da parede celular. Resultados semelhantes foram observados por Roitsch et al. (2003), trabalhando com plantas de tomate. Verificou-se que a glicose e a sacarose induziram o aumento da atividade das enzimas invertase e PAL. Também vale mencionar que a glicose e a frutose, em concentrações entre 100 e 500 mM, podem induzir genes de defesa tanto em plantas de fumo (HERBERS et al., 1996) como em plantas de uva (SALZMAN et al., 1998).

Além de estarem envolvidos na indução de genes relacionados com mecanismos de defesa, os carboidratos também podem atuar diretamente no combate a nematóides. Para exemplificar é possível citar o estudo realizado por OLIVEIRA et al. (2007), que observaram que a sacarose era uma das substâncias que conferiam atividade contra o nematóide *M. exigua*, ao extrato dos bulbos de cebola (*Allium cepa* L., 1753). Tal resultado é coerente com o obtido por Santiago et al. (2005), segundo os quais a sacarose em grânulos diminuiu os números de galhas e de massas de ovos de *M. incognita* por sistema radicular de tomateiros. Ademais, reduziu o número de juvenis de tal nematóide no solo.

Segundo Del Valle et al. (2006), a infecção de raízes de cafeeiros por *M. exigua* induz ao acúmulo de sacarose nas galhas formadas. Para os autores esta

seria uma forma da planta disponibilizar nutrientes para o nematóide. Porém, os resultados aqui descritos permitem levantar a hipótese de que o acúmulo de carboidratos em raízes infectadas por nematóides pode não ser benéfico a esses fitoparasitas, o que sugere uma investigação a respeito da possibilidade do acúmulo de carboidratos em raízes infectadas estarem relacionado a um mecanismo de defesa desencadeado pela planta.

REFERÊNCIAS

AERTS, R. B. et al. Methyl jasmonate vapor increases the developmentally controlled synthesis of alkaloids in *Catharanthus* and *Cinchona* seedlings. **Plant Journal**, Malden, v. 5, n. 5, p. 635-643, May 1994.

ALLEN, E. H.; FELDMESSER, J. Nematicidal activity of α -chaconine: effect of hydrogen-ion concentration. **Journal of Nematology**, Marceline, v. 3, n. 1, p. 58-61, Jan. 1971.

ARIMURA, G. et al. Plant-plant interactions mediated by volatiles emitted from plants infested by spider mites. **Biochemical Systematic and Ecology**, Oxford, v. 29, n. 10, p. 1049-1061, Nov. 2001.

ARIMURA, G.; KOST, C.; BOLAND, W. Herbivore-induced, indirect plant defences. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1734, n. 2, p. 91-111, Apr. 2005.

BAJAJ, K. L.; ARORA, Y. K.; MAHAJAN, R. Biochemical differences in tomato cultivars resistant and susceptible to *Meloidogyne incognita*. **Revue de Nematologie**, Montrouge Cedex, v. 6, n. 1, p. 143-145, 1983.

BALAJI, A.; KANNAN, S. Impact of different phenolic compounds on hatchability of *Meloidogyne incognita*. **Geobios**, Jodhpur, v. 15, p. 143-144, 1988.

BARBOSA, L. C. A. et al. Chemical constituents from *Mucuna aterrima* with activity against *Meloidogyne incognita* and *Heterodera glycines*. **Nematropica**, Auburn, v. 29, n. 1, p. 81-88, 1999.

BATE, N. J.; ROTHSTEIN, S. J. C-6 volatiles derived from lipoxygenase pathway induce a subset of defense-related genes. **Plant Journal**, Malden, v. 16, n. 5, p. 561-569, Dec. 1998.

CAMPOS, H. D.; CAMPOS, V. P.; POZZA, E. A. Efeito do tempo e da temperatura de incubação de juvenis do segundo estágio (J2) no teor de lipídio corporal e no parasitismo de *Meloidogyne javanica* em soja. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 4, p. 387-393, jul. 2006.

CHEN, H. et al. Regulation of plant arginase by wounding, jasmonate, and the phytotoxin coronatine. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 279, n. 40, p. 45998-46007, Oct. 2004.

CHITWOOD, D. J. Phytochemical based strategies for nematode control. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 40, p. 221-249, Nov. 2002.

CHOUREY, P. S. et al. Genetic aspects of sucrose-metabolizing enzymes in developing maize seed. In: MADORE, A. M.; LUCAS, W. J. (Ed.). **Carbon partitioning and source-sink interactions in plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 1995. p. 239-245.

CORDELL, G. A. **Introduction to alkaloids: a biogenetic approach**. New York: J. Wiley, 1981. 1055 p.

COSTA, D. C.; FERRAZ, S. Avaliação do efeito antagônico de algumas espécies de plantas, principalmente de inverno, a *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 14, n. 1, p. 61-70, mar. 1990.

DEL VALE, E. E. et al. Altered sugar partition in coffee (*Coffea arabica* L.) roots due to parasitism by *Meloidogyne* spp. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, 26., 2006, Campos dos Goytacazes. **Resumos...** Campos dos Goytacazes: UENF, 2006. p. 106.

DINARDO-MIRANDA, L. L.; PIVETTA, J. P.; FRACASSO, J. V. Influência da época de aplicação de nematicidas em soqueiras sobre as populações de nematóides e a produtividade da cana-de-açúcar. **Bragantia**, Campinas, v. 67, n. 1, p. 179-190, 2008.

DURADEVA, N. et al. Plant volatiles: recent advances and future perspectives. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Philadelphia, v. 25, n. 5, p. 417-440, Sept. 2006.

EHNESS, R. et al. Glucose and stress independently regulate source/sink relations and defense mechanisms via signal transduction pathways involving protein phosphorylation. **Plant Cell**, Rockville, v. 9, n. 10, p. 1825-1841, Oct. 1997.

FARAG, M. A. et al. (Z)-3-Hexenol induces defense genes and downstream metabolites in maize. **Planta**, New York, v. 220, n. 6, p. 900-909, Apr. 2005.

FERRAZ, S.; VALLE, L. A. C. Utilização de plantas antagônicas no controle de fitonematóides. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE NEMATOLOGIA TROPICAL, 4., 1995, Rio Quente. **Anais...** Rio Quente: SBN/ONTA, 1995. 1 CD-ROM.

FUMAGALI, E. et al. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: o exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 18, n. 4, p. 627-641, out. 2008.

GUPTA, R. L.; PRASAD, D.; THUKRAL, R. Quantitative structure activity relationship study for the fungicidal and nematocidal activity of phenols. **Pesticide Research Journal**, New York, v. 17, n. 2, p. 15-20, 2005.

HERBERS, K. et al. Salicylic acid-dependent induction of pathogenesis-related protein transcripts by sugars is dependent on leaf developmental stage. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 397, n. 2, p. 239-244, 1996.

HOUGHTON, P. J.; REN, Y.; HOWES, M. J. Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. **Natural Products Reports**, Dordrecht, v. 23, n. 2, p. 181-199, Apr. 2006.

HUNG, C.; ROHDE, R. A. Phenol accumulation related to resistance in tomato to infection by root-knot and lesion nematodes. **Journal of Nematology**, Marceline, v. 5, n. 4, p. 253-258, Oct. 1973.

KEINANEN, M.; OLDHAM, N. J.; BALDWIN, I. T. Rapid HPLC screening of jasmonate-induced increases in tobacco alkaloids, phenolics, and diterpene glycosides in *Nicotiana attenuate*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 49, n. 8, p. 3553-3558, Aug. 2001.

KESSLER, A. et al. Priming of plant defense responses in nature by airborne signaling between *Artemisia tridentata* and *Nicotiana attenuate*. **Oecologia**, New York, v. 148, n. 2, p. 280-292, Feb. 2006.

KIM, H. et al. Effect of methyl jasmonate on secondary metabolites of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 54, n. 6, p. 2327-2332, Feb. 2006.

KISHIMOTO, K. et al. Components of C6-aldehyde-induced resistance in *Arabidopsis thaliana* against a necrotrophic fungal pathogen, *Botrytis cinerea*. **Plant Science**, Shannon, v. 170, n. 4, p. 715-723, Apr. 2006.

KISHIMOTO, K. et al. Volatile C6-aldehydes and Allo-ocimene activate defense genes and induce resistance against *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis thaliana*. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 46, n. 6, p. 1093-1102, May 2005.

KOST, C.; HEIL, M. Herbivore-induced plant volatiles induce an indirect defence in neighbouring plants. **Journal of Ecology**, Malden, v. 94, n. 3, p. 619-628, May 2006.

KUSANO, M. et al. Nematicidal alkaloids and related compounds produced by the fungus *Penicillium cf. simplicissimum*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 64, n. 12, p. 2559-2568, Dec. 2000.

LEWIS, S. A.; MCCLURE, M. A. Free amino acids in roots of infected cotton seedlings resistant and susceptible to *Meloidogyne incognita*. **Journal of Nematology**, Leyden, v. 7, n. 1, p. 10-15, Jan. 1975.

LI, G. et al. The chemical constituents of the fungus *Stereum* sp. **Chemistry & Biodiversity**, Weinheim, v. 3, n. 2, p. 210-216, Feb. 2006.

LI, Z. W. X.; CHEN, F.; KIM, H. Chemical changes and overexpressed genes in sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) upon methyl jasmonate treatment. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 55, n. 3, p. 706-713, Feb. 2007.

MAHAJAN, R.; SINGH, P.; BAJAJ, K. L. Nematocidal activity of some phenolic compounds against *Meloidogyne incognita*. **Revue de Nematologie**, Montrouge Cedex, v. 8, n. 2, p. 161-164, 1985.

MARTIN, D. et al. Methyl jasmonate induces traumatic resin ducts, terpenoid resin biosynthesis, and terpenoid accumulation in developing xylem of norway spruce stems. **Plant Physiology**, Rockville, v. 129, n. 7, p. 1003-1018, July 2002.

MATSUI, K. Green leaf volatiles: hydroperoxide lyase pathway of oxylipin metabolism. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 9, n. 3, p. 274-280, June 2006.

MCDUGAL, P. G.; RICO, J. G.; VANDERVEER, D. Bengamides, heterocyclic anthelmintics from a jaspidae marine sponge. **Journal of Organic Chemistry**, Washington, v. 51, n. 23, p. 4494-4497, Nov. 1986.

MISHRA, C. D.; MOHANTY, K. C. Role of phenolics and enzymes in imparting resistance to rice plants against root-knot nematode, *Meloidogyne graminicola*. **Indian Journal of Nematology**, New Delhi, v. 37, n. 2, p. 131-134, 2007.

MOLINARI, S. **Bioassays on plant: nematode interaction**. Bari: Institute of Plant Protection, 2009. 1354 p.

OLIVEIRA, D. F. et al. Activity of amino acids produced by *Paenibacillus Macerans* and from commercial sources against the root-knot nematode *Meloidogyne Exigua*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 124, n. 1, p. 57-63, May 2009.

_____. Atividade de carboidrato purificado a partir da cebola (*Allium cepa* L.) e de carboidratos comerciais sobre juvenis de *Meloidogyne exigua* Goeldi. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 31, n. 3, p. 202-209, 2007.

OPPERMAN, C. H.; CHANG, S. Plant-parasitic nematode acetylcholinesterase inhibition by carbamate and organophosphate nematicides. **Journal of Nematology**, Leyden, v. 22, n. 4, p. 481-488, Oct. 1990.

OSMAN, G. Y. Effect of amino-acids and ascorbic acid on *Meloidogyne javanica* Chitw. (*Tylenchidae*, Nematoda). **Anzeiger fur Schadlingskunde Pflanzenschutz Umweltschutz**, Berlin, v. 66, n. 7, p. 140-142, 1993.

PANACCIONE, D. G. Origins and significance of ergot alkaloid diversity in fungi. **FEMS Microbiology Letters**, Malden, v. 251, n. 1, p. 9-17, Oct. 2005.

PARÉ, P. W. et al. Elicitors and priming agents initiate plant defense responses. **Photosynthesis Research**, Dordrecht, v. 85, n. 2, p. 149-159, Aug. 2005.

PARÉ, P. W.; TUMLINSON, J. W. Plant volatiles as a defense against insect herbivores. **Plant Physiology**, Rockville, v. 121, n. 2, p. 325-331, Oct. 1999.

PASCHOLD, A.; HALITSCHKE, R.; BALDWIN, I. T. Using 'mute' plants to translate volatile signals. **Plant Journal**, Malden, v. 45, n. 2, p. 275-291, Jan. 2006.

PEGARD, A. et al. Histological characterization of resistance to different root-knot nematode species related to phenolics accumulation in *Capsicum annuum*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 95, n. 2, p. 158-165, June 2005.

PERRY, R. N.; MAULE, A. G. Physiological and biochemical basis behaviour. In: GAULER, R.; BILGRAMI, L. (Ed.). **Nematode behaviour**. New Jersey: CABI, 2004. p. 197-238.

PIMENTEL, M. S.; PEIXOTO, A. R.; PAZ, C. D. Potencial de controle biológico de *Meloidogyne* utilizando fungos nematófagos e bactérias em cafeeiros. **Coffee Science**, Lavras, v. 4, n. 1, p. 84-92, jan./jun. 2009.

ROBERTS, P. A. Concepts and consequences of resistance. In: STARR, J. L.; COOK, R.; BRIDGE, J. (Ed.). **Plant resistance to parasitic nematodes**. London: CAB International, 2002. p. 23-41.

RODA, A. L.; BALDWIN, I. T. Molecular technology reveals how the induced direct defenses of plants work. **Basic and Applied Ecology**, Jena, v. 4, n. 1, p. 15-26, 2003.

RODRÍGUEZ, M.; GÓMEZ, L.; PETEIRA, B. *Meloidogyne mayaguensis* Rammah y Hirschmann, plaga emergente para la agricultura tropical y subtropical. **Revista Protección Vegetal**, La Habana, v. 22, n. 2, p. 183-198, 2007.

ROITSCH, T. et al. Extracellular invertase: key metabolic enzyme and PR protein. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 54, n. 382, p. 513-524, Jan. 2003.

RYU, C. et al. Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 134, n. 2, p. 1017-1026, Mar. 2004.

_____. Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 100, n. 8, p. 4927-4932, Apr. 2003.

SADAKA, A. et al. Phosphate modulates transcription of soybean *VspB* and other sugar inducible genes. **Plant Cell**, Rockville, v. 6, n. 5, p. 737-749, May 1994.

SALZMAN, R. A. et al. Coordinate accumulation of antifungal proteins and hexoses constitutes a developmentally controlled defense response during fruit ripening in grape. **Plant Physiology**, Rockville, v. 117, n. 2, p. 465-472, June 1998.

SANTIAGO, D. C. et al. Potential of sucrose and *Pennisetum purpureum* cv. Cameroon Mulch on the management of *Meloidogyne javanica* and *M. incognita*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 48, n. 6, p. 873-883, Nov. 2005.

SASSER, J. N.; CARTER, C. C. **An advanced treatise on *Meloidogyne*: biology and control**. Raleigh: United States Agency for International Development, 1985. v. 1, 150 p.

SATOU, T. et al. Assay of nematocidal activity of isoquinoline alkaloids using third-stage larvae of *Strongyloides ratti* and *S. venezuelensis*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 104, n. 2, p. 131-138, Mar. 2002a.

_____. Inhibitory effect of isoquinoline alkaloids on movement of second-stage larvae of *Toxocara canis*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 25, n. 12, p. 1651-1654, Dec. 2002b.

SOUZA, R. M. et al. Manejo do nematóide das galhas da goiabeira em São João da Barra (RJ) e relato de novos hospedeiros. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 30, n. 2, p. 165-169, 2006.

STARR, J. L.; BRIDGE, J.; COOK, R. **Plant resistance to parasitic nematodes**. Cambridge: CABI, 2002. 288 p.

STARR, J. L. et al. The future of nematode management in cotton. **Journal of Nematology**, Marceline, v. 39, n. 4, p. 283-294, Dec. 2007.

TAKAISHI, K. et al. Synthesis and antinematodal activity of 3-n-alkylphenols. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 68, n. 11, p. 2398-2400, Nov. 2004.

TALAVERA, M.; MIZUKUBO, T. Effects of DL-methionine on hatching and activity of *Meloidogyne incognita* eggs and juveniles. **Pest Management Science**, Chichester, v. 61, n. 4, p. 413-416, Nov. 2005.

TIHOHOD, D. **Nematologia agrícola aplicada**. 2. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2000. 473 p.

TOMINAGA, N. et al. A multi-generation sublethal assay of phenols using the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Journal of Healthy Science**, London, v. 49, n. 6, p. 459-463, 2003.

VIAENE, N. M. Management of *Meloidogyne hapla* on lettuce in organic soil with sudangrass as cover crop. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 82, n. 8, p. 945-952, Aug. 1998.

VOINILO, V. A.; PONIN, I. Y. Role of glycoalkaloids and phytoalexins in the resistance of potatoes to nematodes. **Seryya Biyalagichnykh Navuk**, Navuk Belarusi, v. 4, p. 73-75, 1979.

WINK, M. Special nitrogen metabolism. In: DEY, P. M.; HARBORNE, J. B. (Ed.). **Plant biochemistry**. London: Academic, 1997. p. 439-486.

ZHAO, X.; SCHMITT, M.; HAWES, C. M. Species dependent effects of border cell and root tip exudates on nematodes behavior. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 90, n. 11, p. 1239-1245, Nov. 2000.

SEGUNDA PARTE

ARTIGO 1

Influências de substâncias orgânicas voláteis na produção metabólita de *Solanum lycopersicum* e *Phaseolus vulgaris* e na resistência de tais plantas ao nematóide de galhas *Meloidogyne incognita*

1 RESUMO

Com vistas a contribuir para o desenvolvimento de novos produtos para o controle de nematóides fitoparasitas, estudou-se o efeito de substâncias orgânicas voláteis sobre *Meloidogyne incognita* em feijoeiros e tomateiros. Observaram-se reduções nas populações do nematóide quando as plantas foram pulverizadas com combinações de jasmona + jasmonato de metila, (Z)-hex-3-en-1-ol + (E)-hex-3-en-1-ol + (Z)-hex-2-en-1-ol + (E)-hex-2-enal, acetato de (E)-hex-2-enila + acetato de hexila, *meso*-butano-2,3-diol + butano-1,2-diol + butano-1,3-diol + butano-1,4-diol e acetato de linalila + nerolidol. Embora não se saiba o mecanismo de ação de tais substâncias, observou-se que elas alteram as quantidades de aminoácidos, alcalóides e carboidratos solúveis, nas raízes das plantas.

Palavras- chave: Nematóide. *Phaseolus vulgaris*. *Solanum lycopersicum*. Resistência. Substâncias orgânicas voláteis.

2 ABSTRACT

Effect of volatile organic compounds on the resistance of *Solanum lycopersicum* and *Phaseolus vulgaris* to the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* and the metabolic production of these plants

To contribute to the development of new products to control plant-parasitic nematodes, the effects of volatile organic compounds on the population of *Meloidogyne incognita* in common bean and tomato plants were evaluated. When the aerial part of these plants were sprayed with combinations of jasmone + methyl jasmonate, (Z)-hex-3-en-1-ol + (E)-hex-3-en-1-ol + (Z)-hex-2-en-1-ol + (E)-hex-2-enal, (E)-hex-2-enyl acetate + hexyl acetate, *meso*-butane-2,3-diol + butane-1,2-diol + butane-1,3-diol + butane-1,4-diol or linalyl acetate + nerolidol, reductions in the population of this nematode were observed. Although the action mechanism of these substances could not be elucidated, the results obtained suggest that they act by altering the amounts of amino acids, alkaloids and carbohydrates in the roots.

Keywords: Nematode. *Phaseolus vulgaris*. *Solanum lycopersicum*. Resistance. Volatile organic substances.

3 INTRODUÇÃO

Estima-se que perdas de até 12,7 % sejam ocasionadas na produção de grãos por fitonematóides, dentre os quais se destacam aqueles do gênero *Meloidogyne*, que apresentam ampla distribuição geográfica e grande número de plantas hospedeiras. Além dos prejuízos diretos, tais parasitas podem debilitar a planta, tornando-a suscetível a outras doenças e, conseqüentemente, reduzindo ainda mais a produção agrícola (MOLINARI, 2009). No Brasil há vários métodos alternativos para o controle de fitonematóides, mas infelizmente a eficiência dos mesmos é, em vários casos, inferior a observada para aqueles que empregam substâncias nematicidas de origem sintética com elevada toxicidade (DINARDO-MIRANDA et al., 2008). Como existe uma pressão por parte da sociedade para que o uso destas substâncias seja cada vez mais restrito, faz-se necessário buscar novas metodologias menos onerosas e ecologicamente corretas (CHITWOOD, 2002).

Dentre as alternativas potencialmente úteis para o controle de nematóides se encontram as substâncias orgânicas voláteis (SOV's), que podem estar relacionadas aos mecanismos de defesa de plantas contra organismos fitopatogênicos (ARIMURA et al., 2005; PARÉ et al., 2005). Elas podem afetar diretamente o patógeno (AHARONI et al., 2003), podem atrair inimigos naturais contra os mesmos (KESSLER; BALDWIN, 2001) e ainda há a possibilidade de atuarem como sinalizadores para a ativação de genes relacionados à resistência das plantas (ARIMURA et al., 2002), o que deve ser acompanhado de mudanças metabólicas nas plantas (KEINANEN et al., 2001). Sabe-se, por exemplo, que as plantas de *Arabidopsis thaliana* expostas a (E)-hex-2-enal, (Z)-hex-3-enal, (Z)-hex-3-enol ou *allo*-ocimeno, têm maior resistência ao fungo *Botrytis cinerea* (KISHIMOTO et al., 2005). Tais resultados são confirmados por Kishimoto et al. (2006), segundo os quais as substâncias voláteis induzem o aumento da

lignificação, o que torna a penetração do fungo mais difícil. Ademais, ocorre o acúmulo de substâncias antifúngicas como a camalexina, que inibe o crescimento fúngico no interior da planta.

Outro exemplo é o aumento da atividade da arginase em *Solanum lycopersicum* após a aplicação de jasmonato de metila, o que aumenta a produção de poliaminas e de óxido nítrico pela planta (CHEN et al., 2004). Em mudas de *Catharanthus roseus* e *Cinchona ledgeriana*, jasmonato de metila na concentração de $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ no ar faz com que a produção de alcalóides em tais plantas seja duplicada (AERTS et al., 1994). Em *Picea abies*, a referida substância induz a formação de uma oleoresina rica em terpenóides que protege a planta de pragas e doenças (MARTIN et al., 2002).

Assim, empregando plantas de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L) e feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L) suscetíveis a nematóides, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da aplicação de misturas de substâncias voláteis nas partes aéreas das plantas sobre a população de *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood nas raízes das mesmas. Objetivou-se também, avaliar a produção de substâncias nematicidas pelas plantas e quantificar vários metabólitos nas raízes das plantas com vistas a averiguar uma possível correlação com eventuais diminuições da população do nematóide.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Substâncias orgânicas voláteis (SOV's)

Foram adquiridas (Sigma Aldrich) e, sem qualquer tratamento posterior, dissolvidas em solução aquosa de Tween 80 a 1 % (g.mL^{-1}) até a concentração desejada, formando seis conjuntos: jasmona (90 %) + jasmonato de metila (95%) (tratamento 1), (Z)-hex-3-en-1-ol (97 %) + (E)-hex-3-en-1-ol (98 %) + (Z)-hex-2-en-1-ol (95 %)+ (E)-hex-2-enal (98 %) (tratamento 2), acetato de (E)-

hex-2-enila (99 %) + acetato de hexila (99 %) (tratamento 3), *meso*-butano-2,3-diol (97 %) + butano-1,2-diol (98 %) + butano-1,3-diol (93 %) + butano-1,4-diol (99 %) (tratamento 4), 3-hidroxibutanona (96 %) + 4-hidroxibutanona (95 %) (tratamento 5) e acetato de linalila (97 %) + nerolidol (98 %) (tratamento 6). Estas substâncias foram escolhidas para o presente trabalho, por serem capazes de aumentar as resistências de plantas a outras doenças e insetos (Kost, Heil; 2006; Kishimoto et al., 2006, MARTIN et al., 2002, RYU et al., 2004; RYU et al., 2003). Quanto às combinações das SOV's, foram realizadas de acordo com as suas semelhanças estruturais, visando à redução do número de tratamentos.

4.2 Inóculo do nematóide

Raízes de tomateiros (*Solanum lycopersicum* L. cv. Kadá) cultivados em casa de vegetação e infestados com *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood, foram lavadas cuidadosamente e cortadas em pedaços de 1 cm. Em seguida, foram trituradas em liquidificador por 40 s em solução de hipoclorito de sódio a 0,5 % (g.g⁻¹), seguindo-se a técnica de Hussey e Barker (1973). Os ovos retidos na peneira de 500 mesh foram recolhidos e colocados em câmara de eclosão, formada com tela de 35 µm, colocada em um funil de vidro (DUNN, 1969). Os juvenis do segundo estágio (J2) foram recolhidos depois de 48 e 72 h, tendo sido descartada a primeira coleta de 24 h.

4.3 Efeitos *in vitro* e *in vivo* das substâncias orgânicas voláteis (SOV's) sobre *Meloidogyne incognita*

Para a realização do experimento *in vitro*, que foi adaptado do método descrito por Amaral et al. (2003), empregaram-se soluções em Tween 80 a 1 % (g.mL⁻¹) das SOV's, com cada uma das substâncias em três concentrações diferentes: 0,5, 2,5 e 5,0 mM. 100 µL das soluções de SOV's e 20 µL de uma suspensão aquosa contendo aproximadamente 25 J2 foram colocados em

cavidades de 300 μL de placa Elisa. Após 48 h, adicionou-se uma gota de solução de NaOH 1 M ao conteúdo de cada cavidade, e em seguida, contaram-se os nematóides. Aqueles retos e imóveis foram considerados mortos, enquanto os retorcidos e móveis foram considerados vivos. Realizaram-se quatro repetições, sendo utilizadas como testemunhas solução de Tween 80 a 1% ($\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e água. Os valores obtidos foram transformados em percentagem de J2 mortos antes da realização dos cálculos estatísticos.

No que diz respeito ao teste *in vivo* com tomateiro (*Solanum lycopersicum* L. cv. Kadá) e feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Carioca), sementes das plantas foram desinfestadas com hipoclorito de sódio 1% ($\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) e colocadas para germinar em vasos plásticos de 1L contendo uma mistura estéril de areia, solo e esterco em proporção de 1:1:1 (v/v/v). Após 20 dias em uma casa de vegetação, as partes aéreas das plantas foram borrifadas até o ponto de escorrimento com soluções dos seis conjuntos de SOV's, sendo cada uma das substâncias mantida na concentração de 0,5 mM. Após 48 h, aplicaram-se 10 mL de suspensões aquosas contendo 400 e 800 J2 de *M. incognita* nos substratos dos tomateiros e feijoeiros, respectivamente. Decorridas mais 96 h, realizou-se outra aplicação foliar das SOV's conforme descrito acima. O experimento foi instalado em delineamento em blocos casualizados, empregando-se quatro repetições. Cada parcela foi representada por quatro plantas. Quarenta e cinco dias após a inoculação dos J2 em plantas de tomateiro e sessenta dias para as plantas de feijoeiro, cortaram-se as partes aéreas das plantas, para serem desidratadas em estufa com ventilação forçada por 48 horas à temperatura de 40 °C, para determinação das massas secas. Quanto aos sistemas radiculares, foram cuidadosamente retirados do solo, lavados com água, secos com papel toalha, pesados e cortados em pedaços de aproximadamente 1,0 cm para a extração de ovos pela técnica de Hussey e Barker (1973). No microscópio com objetiva de lente invertida, contaram-se os ovos de *M. incognita*, resultando em valores que

foram divididos pela massa de raiz fresca para a realização dos cálculos estatísticos.

4.4 Influência das substâncias orgânicas voláteis (SOV's) na produção metabólita das plantas

Sementes de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L. cv. Kadá) e feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Carioca) foram desinfestadas com hipoclorito de sódio 1 % (g.g^{-1}) e colocadas para germinar em copos plásticos de 500 mL contendo uma mistura estéril de areia, solo e esterco em proporção de 1:1:1(v/v/v). Após 20 dias em casa de vegetação, soluções das SOV's (0,5 mM para cada substância) foram borrifadas nas partes aéreas das plantas até o ponto de escorrimento. Passados quatro dias, as partes aéreas das plantas foram cortadas e os sistemas radiculares foram cuidadosamente retirados do substrato, lavados com água, liofilizados e guardados em freezer até o momento das análises dos metabólitos. O experimento foi instalado em delineamento em blocos casualizados, com duas repetições, sendo cada parcela composta por 12 plantas.

4.4.1 Quantificação de aminoácidos livres, carboidratos solúveis e sacarose

Conforme descrito por Passos (1996), 250 mg de cada um dos sistemas radiculares foram moídos em gral de porcelana e submetidos a duas extrações com 20 mL de uma solução de metanol/clorofórmio/água (MCA) na proporção de 12:5:3 (v/v/v). Após filtrações em algodão, os líquidos de ambas as extrações foram combinados e adicionados a uma mistura de 30 mL de clorofórmio e 60 mL de água. Agitou-se fortemente a mistura obtida e, em seguida, separou-se por decantação a fase aquosa, que foi concentrada até secura em evaporador rotatório e liofilizadora. Cada uma das amostras foi dissolvida em água destilada

até que o volume total fosse de 25 mL, obtendo-se assim a solução mãe para a dosagem de carboidratos solúveis, sacarose e aminoácidos livres.

Para a quantificação de aminoácidos, transferiram-se em triplica para tubos de ensaio, alíquotas de 0,5 mL de cada solução mãe e 1,0 mL de solução de ninidrina, que foi previamente preparada (25 mL de NaOAc.3H₂O a 1,36 g.mL⁻¹ (pH 5,5), 20 mL de ácido acético glacial, 75 mL de éter monometílico de etilenoglicol, 0,2 g de ninidrina e 30 mg de hidrindantina). Os tubos foram agitados para a obtenção de uma solução homogênea e mantidos em banho-maria a 100 °C por 15 min. Adicionaram-se 3,0 mL de etanol/água (1:1) a cada tubo, que foi deixado na bancada para resfriar. Realizaram-se então, leituras das absorvâncias das soluções resultantes em um espectrofotômetro Spectrum SP1105, a 570 nm, em cubetas de vidro. A concentração de aminoácidos totais foi determinada pela comparação dos valores obtidos com aqueles provenientes de uma curva analítica resultante do emprego de L-leucina.

Para a quantificação dos carboidratos solúveis, colocaram-se em triplicata, 1,0 mL de cada solução mãe, 0,5 mL de solução aquosa de fenol a 5% (g.mL⁻¹) e 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado em cada tubo. Após 10 min em repouso, aqueceram-se os tubos em banho Maria a 30 °C por 15 minutos. A seguir, realizaram-se leituras das absorvâncias em 490 nm. A concentração de carboidratos foi obtida pela comparação com valores de uma curva analítica construída pelo emprego da D-glicose.

Quanto à quantificação da sacarose, transferiu-se 1,0 mL de cada solução mãe para tubos de ensaio em triplicata, para ser liofilizada e redissolvida em 0,1mL de água. Adicionou-se 0,1 mL de KOH a 30% (g.mL⁻¹) ao conteúdo de cada tubo, que foi mantido em banho a 100 °C por 10 min. Após resfriamento até a temperatura ambiente, adicionaram-se 5 mL de solução de antrona (600 mg de antrona anidra, 270 mL de ácido sulfúrico concentrado e 30 mL de água) ao conteúdo de cada tubo, que foi mantido em banho a 40 °C por

10-15 min. A seguir, realizaram-se as leituras de absorvância em 620 nm. As concentrações foram obtidas por comparação com uma curva analítica construída com o uso de sacarose.

4.4.2 Quantificação de fenóis totais

Com o objetivo de quantificar fenóis totais (AOAC, 1960), colocaram-se em balão de fundo redondo, 200 mg de cada sistema radicular seco e moído em gral e 12,5 mL de metanol/água (1:1). Após refluxo durante 15 min, a mistura foi filtrada e repetiu-se tal processo de extração duas vezes. Combinaram-se os filtrados e completou-se o volume de cada solução para 25 mL com água destilada. Em cada tubo de ensaio foram colocados, em triplicata, 20 μ L de cada solução resultante, 1,68 mL de água, 100 μ L do reagente de Folin Dennis (2,5 g de tungstato de sódio diidratado ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 0,5 g de ácido fosfomolibdico, 1,25 mL de ácido fosfórico concentrado e água para completar o volume até 25 mL) e 200 μ L de solução aquosa de carbonato de sódio a 2,0 % ($\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$). Em seguida, fizeram-se leituras das absorvâncias em 720 nm e converteram-se os valores obtidos em concentração de fenóis por comparação com curva analítica obtida pelo emprego do ácido tânico.

4.4.3 Quantificação de alcalóides totais

Seguindo a metodologia descrita por Sreevidya e Mehrotra (2003) para a análise de alcalóides, 500 mg de cada sistema radicular seco e moído em almofariz foram submetidos a três extrações com 10 mL de solução aquosa de ácido acético a 2% (v/v) por 10 minutos. As soluções obtidas foram combinadas e retiraram-se três alíquotas de 5 mL da solução final para serem misturadas com 2,0 mL do reagente de Dragendorff (0,8 g de $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$, 40 mL de água destilada, 10 mL de ácido acético glacial, 8,0 g de KI, 20 mL de água destilada) em tubos de ensaio. Centrifugaram-se as misturas obtidas e se descartaram os sobrenadantes. Após lavagem com etanol (2 x 4 mL), os resíduos foram

misturados com 2,0 mL de solução aquosa de sulfeto de sódio a 1% ($\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e centrifugaram-se as misturas. Os sobrenadantes foram novamente descartados, enquanto os resíduos foram dissolvidos em 2,0 mL de HNO_3 concentrado, sendo as soluções obtidas diluídas até 10 mL com água destilada. Misturou-se 1,0 mL de cada solução obtida com 5,0 mL de solução aquosa de tiouréia a 3% ($\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e se fizeram leituras das absorvâncias em 435 nm. Converteram-se os valores em concentração de alcalóides totais por comparação com curva analítica proveniente do uso de brucina.

4.4.4 Análise por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H)

Para a obtenção dos extratos, utilizou-se a metodologia descrita por Passos (1996), que se encontra descrita acima. Os extratos das raízes, já liofilizados, foram dissolvidos em solução tampão de fosfato a 50 mM (Mallinckodt Baker S.A.) em água deuterada (D_2O) (Cambridge Isotope Laboratory), $\text{pH} = 7,5$, contendo 0,5 mM de 2,2-dimetil-2-silapentano-5-sulfonato de sódio (DSS) (CIL - Cambridge Isotope Laboratory) como referência interna. Os espectros de hidrogênio foram obtidos em espectrômetro Varian AS 500 (500 MHz), com tempo de aquisição de 4 segundos, acúmulo de 32 varreduras e pulso de 90° . Os espectros foram obtidos em triplicata. Para a identificação e a quantificação dos metabólitos, utilizou-se o programa Chenomx Suite 6.0 (Chenomx Inc., Edmonton, Canadá). Além do banco de dados do programa, empregaram-se também aqueles disponíveis no Biological Magnetic Resonance Data Bank (<http://www.bmrb.wisc.edu>) e Colmar Suite of Web Servers (<http://spinportal.magnet.fsu.edu>).

4.5 Atividade *in vitro* de extratos das raízes contra o nematóide

Para o preparo dos extratos, 250 mg de cada sistema radicular seco e moído foram mantidos em 10 mL de metanol durante 24 h. A seguir, as misturas foram filtradas em algodão e submetidas a mais duas extrações com 10 mL de metanol. Os líquidos das três extrações foram combinados e concentrados até secar em evaporador rotatório e liofilizadora. Solubilizaram-se alíquotas de 5 % e 15 % das massas dos extratos de raízes de tomateiro e feijoeiros, respectivamente, em 1,0 mL de solução aquosa de Tween 80 a 1% ($\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) para serem submetidas ao teste de mortalidade de J2 de *M. incognita* realizado conforme descrito acima.

4.6 Análise estatística

Os valores foram submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Scott e Knott (1974) a 5% de significância. Para tanto, empregou-se o programa SISVAR. Os espectros de RMN ^1H também foram convertidos, nos intervalos de 0,02 a 4,50 e 5,0 a 9,98, em uma tabela de área versus intervalo de 0,04 ppm, para que pudessem ser submetidos a análise de componentes principais (PCA) pelo emprego do *software* Pirouette 3.11 (Infometrix, Inc., Woodinville, WA).

5 RESULTADOS

5.1 Efeito de substâncias orgânicas voláteis (SOV's) na população de *Meloidogyne incognita*

Nenhum dos tratamentos com as SOV's afetou significativamente a massa da parte aérea das plantas. No entanto, observou-se diminuição do número de ovos do nematóide por massa de raiz de planta de tomateiro quando se empregaram as combinações de jasmona + jasmonato de metila (tratamento

1), (Z)-hex-3-en-1-ol + (E)-hex-3-en-1-ol + (Z)-hex-2-en-1-ol + (E)-hex-2-enal (tratamento 2), acetato de (E)-hex-2-enila + acetato de hexila (tratamento 3) e *meso*-butano-2,3-diol + butano-1,2-diol + butano-1,3-diol + butano-1,4-diol (tratamento 4; Tabela 1). Já para o experimento com feijoeiros, apenas a combinação de acetato de linalila + nerolidol (tratamento 6) reduziu a população de *M. incognita* nas raízes das plantas (Tabela 1).

5.2 Efeito *in vitro* de substâncias orgânicas voláteis (SOV's) sobre *Meloidogyne incognita*

Pelos dados apresentados na Tabela 2, observa-se que na maior concentração empregada todos os conjuntos de SOV's aumentaram a mortalidade de J2 de *M. incognita* no teste *in vitro*, com destaque para a combinação de (Z)-hex-3-en-1-ol, (E)-hex-3-en-1-ol, (Z)-hex-2-en-1-ol e (E)-hex-2-enal (tratamento 2), que proporcionou a obtenção dos maiores valores de nematóides mortos. Com a diminuição das concentrações até 0,5 mM, os valores para a percentagem de J2 mortos diminuíram, mas ainda se podia observar que a combinação acima mencionada e aquela formada por (E)-hex-2-enila + acetato de hexila (tratamento 3) continuavam a acarretar valores estatisticamente acima dos observados para água pura e solução aquosa de Tween 80 a 1% (g.mL⁻¹).

Tabela 1 Massa seca da parte aérea (MSPA) e número de ovos de *Meloidogyne incognita* por grama de raízes de tomateiros ou feijoeiros tratados com as substâncias orgânicas voláteis (SOV's) a 0,5 mM

Tratamento	Substâncias orgânicas voláteis	Tomateiro		Feijoeiro	
		MSPA (g)	Número de ovos por massa de raiz (g ⁻¹)	MSPA (g)	Número de ovos por massa de raiz (g ⁻¹)
1	Jasmona+ jasmonato de metila	10,0 a	256 a	0,32 a	3409 a
2	(Z)-hex-3-en-1-ol + (E)-hex-3-en-1-ol + (Z)-hex-2-en-1-ol + (E)-hex-2-enal	7,7 a	116 a	0,44 a	3141 a
3	Acetato de (E)-hex-2-enila + acetato de hexila	10,5 a	120 a	0,45 a	3199 a
4	<i>meso</i> -butano-2,3-diol + butano-1,2-diol + butano-1,3-diol + butano-1,4-diol	10,0 a	152 a	0,33 a	3591 a
5	3-hidroxibutanona + 4-hidroxibutanona	10,5 a	444 b	0,45 a	3184 a
6	Acetato de linalila + nerolidol	7,7 a	411 b	0,43 a	2141 b
7	Testemunha Tween 80 a 1% (g/mL)	10,5 a	420 b	0,43 a	3701 a
8	Testemunha água	8,5 a	531 b	0,34 a	3099 a

* Médias seguidas pela mesma letra em cada coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott e Knott ($P \leq 0,05$).

Tabela 2 Mortalidade de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita* após exposição *in vitro* dos mesmos às substâncias orgânicas voláteis (SOV's) nas concentrações de 0,5, 2,5 e 5,0 mM

Tratamento	Substâncias orgânicas voláteis	J2 mortos (%)		
		0,5 mM	2,5 mM	5,0 mM
1	Jasmona + jasmonato de metila	5,7 a	21,5 c	51,7 c
2	(Z)-hex-3-en-1-ol + (E)-hex-3-en-1-ol + (Z)-hex-2-en-1-ol + (E)-hex-2-enal	16,5 b	76,2 d	93,0 e
3	Acetato de (E)-hex-2-enila + acetato de hexila	16,0 b	19,2 b	26,7 b
4	Meso-butano-2,3-diol + butano-1,2- diol + butano-1,3-diol + butano-1,4- diol	7,7 a	17,5 b	21,0 b
5	3-hidroxibutanona + 4- hidroxibutanona	6,5 a	14,0 b	79,5 d
6	Acetato de linalila + nerolidol	6,7 a	26,2 c	76,5 d
7	Testemunha Tween 80 a 1% (g.mL ⁻¹)	6,5 a	6,5 a	6,5 a
8	Testemunha água	5,1 a	5,1 a	5,1 a

* Médias seguidas pela mesma letra em cada coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott e Knott ($P \leq 0,05$)

5.3 Influências das substâncias orgânicas voláteis (SOV's) na produção metabólita nas raízes de *Solanum lycopersicum* e *Phaseolus vulgaris*

Várias alterações foram causadas na produção metabólita pela aplicação das SOV's nas partes aéreas das plantas (Figura, 1). Para exemplificar se pode mencionar o tratamento 1, com jasmona + jasmonato de metila, que aumentou a quantidade de alcalóides em ambas as plantas. Ou então, o tratamento 2, com (Z)-hex-3-en-1-ol+(E)-hex-3-en-1-ol+(Z)-hex-2-en-1-ol+(E)-hex-2-enal, que aumentou a quantidade de carboidratos solúveis, sacarose e aminoácidos livres,

mas reduziu a quantidade de alcalóides nas plantas de tomateiro. Outro exemplo foi o tratamento 4, com *meso*-butano-2,3-diol + butano-1,2-diol + butano-1,3-diol + butano-1,4-diol, que aumentou a quantidade de sacarose, mas reduziu todos os outros metabólitos analisados nas plantas de feijoeiros.

As análises por RMN ¹H permitiram a identificação e quantificação dos seguintes metabólitos: ácido 4-aminobutírico, ácido fumárico, ácido succínico, alanina, asparagina, colina, frutose, glicose, leucina e valina, nos extratos de tomateiros, enquanto nos extratos de plantas de feijão as substâncias identificadas e quantificadas foram: ácido 4-aminobutírico, ácido fumárico, alanina, asparagina, colina, frutose, glicerol, glicose e trigonelina (Figura, 2 e 3). Apesar de algumas variações nas quantidades dessas substâncias causadas pela aplicação das SOV's, nenhuma correlação com a redução da população de *M. incognita* nas raízes das plantas pode ser observada.

De acordo com a análise de componentes principais dos espectros de RMN ¹H, 99,9% da variância para os dois extratos de plantas podem ser explicadas por doze componentes, sendo os dois primeiros, responsáveis por 93,3% e 85,6% da variância para *S. lycopersicum* e *P. vulgaris*, respectivamente (Figura, 4). No entanto, não se pode observar diferença significativa entre os tratamentos.

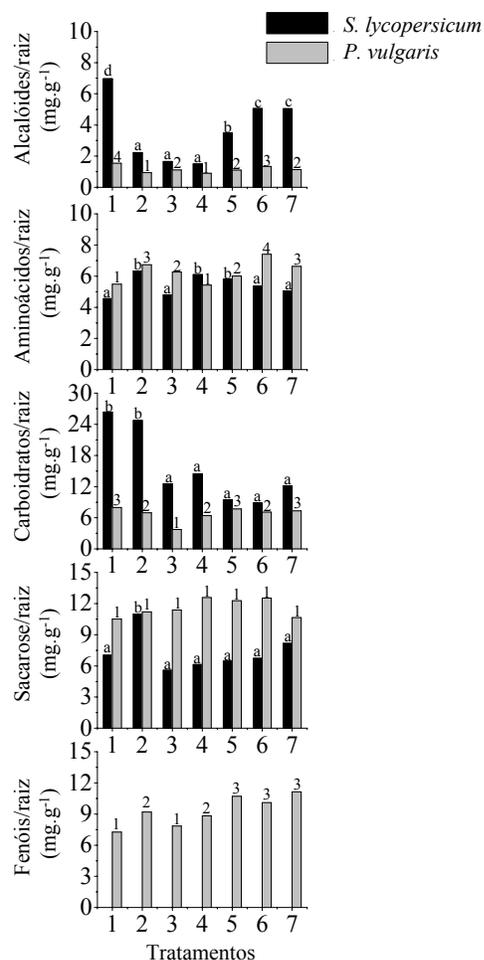
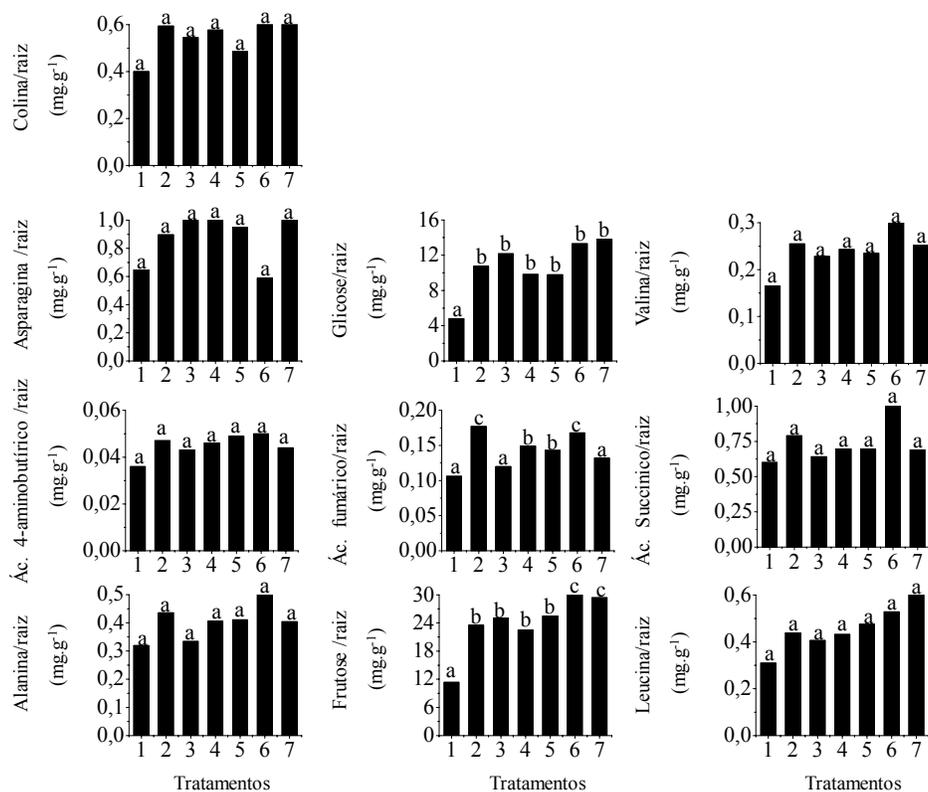
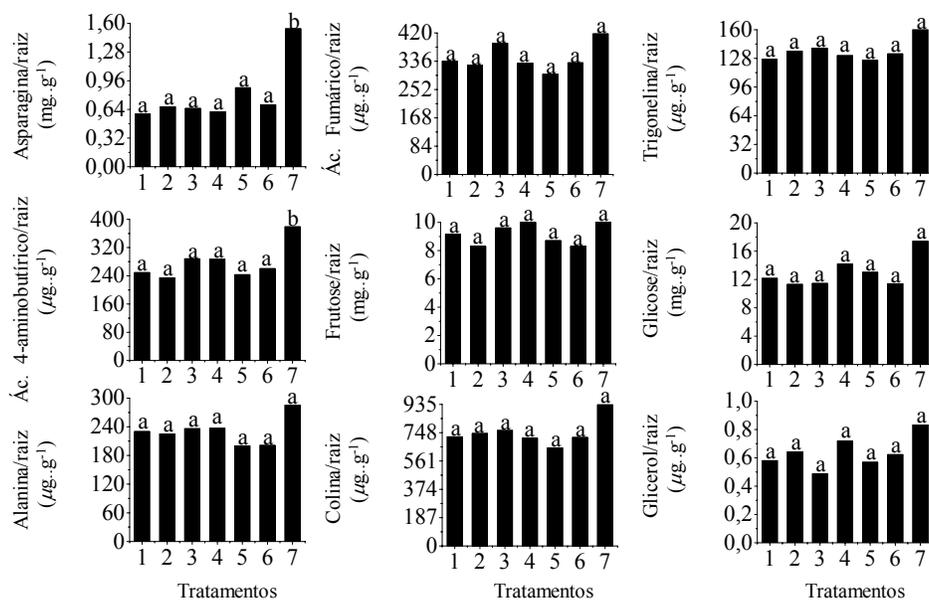


Figura 1 Concentrações de alcalóides, aminoácidos, carboidratos solúveis, sacarose e fenóis, nas raízes de *Solanum lycopersicum* L e *Phaseolus vulgaris* L, cujas partes aéreas foram pulverizadas com soluções em Tween 80 a 1% (g.mL⁻¹) de jasmona + jasmonato de metila (1), (Z)-hex-3-en-1-ol + (E)-hex-3-en-1-ol + (Z)-hex-2-en-1-ol + (E)-hex-2-enal (2), acetato de (E)-hex-2-enila + acetato de hexila (3), meso-butano-2,3-diol + butano-1,2-diol + butano-1,3-diol + butano-1,4-diol (4), 3-hidroxiбутанона + 4-hidroxiбутанона (5) e acetato de linalila + nerolidol (6). Como controle foi empregado Tween 80 a 1% (g.mL⁻¹) (7). Barras seguidas pela mesma letra ou número em cada gráfico não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott e Knott ($P \leq 0,05$)



* Ác= Ácido

Figura 2 Metabólitos identificados e quantificados nas raízes de tomateiros (*Solanum lycopersicum* L.) com o uso da espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio. As plantas foram pulverizadas com combinações de jasmona + jasmonato de metila (1), (Z)-hex-3-en-1-ol + (E)-hex-3-en-1-ol + (Z)-hex-2-en-1-ol + (E)-hex-2-enal (2), acetato de (E)-hex-2-enila + acetato de hexila (3), meso-butano-2,3-diol + butano-1,2-diol + butano-1,3-diol + butano-1,4-diol (4), 3-hidroxiutanona + 4-hidroxiutanona (5), acetato de linalila + nerolidol (6) e com solução de Tween 80 a 1 % (g.mL⁻¹) (7), que foi empregado como controle. Barras com a mesma letra, em cada gráfico, não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott e Knott ($P \leq 0,05$)



* Ác= Ácido

Figura 3 Metabólitos identificados e quantificados nas raízes de feijoeiros (*Phaseolus vulgaris* L.) com o uso da espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio. As plantas foram pulverizadas com combinações de jasmona + jasmonato de metila (1), (Z)-hex-3-en-1-ol + (E)-hex-3-en-1-ol + (Z)-hex-2-en-1-ol + (E)-hex-2-enal (2), acetato de (E)-hex-2-enila + acetato de hexila (3), *meso*-butano-2,3-diol + butano-1,2-diol + butano-1,3-diol + butano-1,4-diol (4), 3-hidroxiutanona + 4-hidroxiutanona (5), acetato de linalila + nerolidol (6) e com solução de Tween 80 a 1 % (g.mL⁻¹) (7), que foi empregado como controle. Barras com a mesma letra, em cada gráfico, não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott e Knott ($P \leq 0,05$)

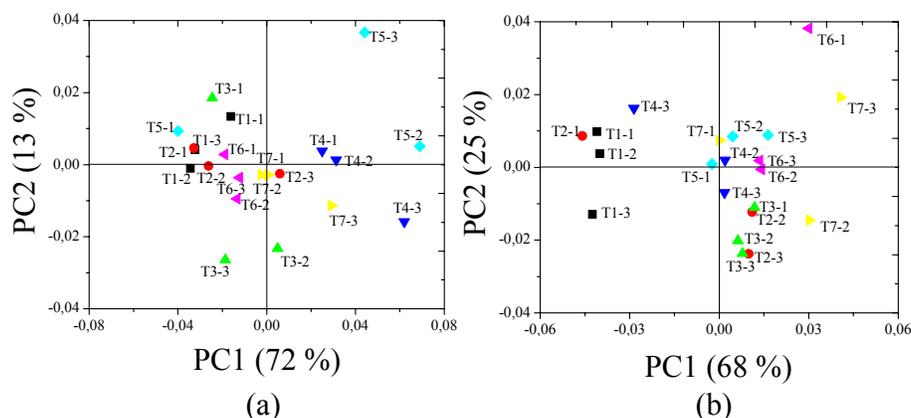


Figura 4 Escores das análises de componentes principais dos espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio dos extratos das raízes de *Phaseolus vulgaris* (a) e *Solanum lycopersicum* (b) (Tx.y, sendo “x” correspondente ao tratamento e “y” o número da repetição). Plantas pulverizadas com jasmona + jasmonato de metila (tratamento 1), (Z)-hex-3-en-1-ol + (E)-hex-3-en-1-ol + (Z)-hex-2-en-1-ol + (E)-hex-2-enal (tratamento 2), acetato de (E)-hex-2-enila + acetato de hexila (tratamento 3), *meso*-butano-2,3-diol + butano-1,2-diol + butano-1,3-diol + butano-1,4-diol (tratamento 4), 3-hidroxiбутанона + 4-hidroxiбутанона (tratamento 5) e acetato de linalila + nerolidol (tratamento 6). Como controle foi empregado o extrato das raízes de plantas pulverizadas com solução de Tween 80 a 1 % (g.mL⁻¹), correspondendo ao tratamento 7

5.4 Atividade *in vitro* dos extratos das raízes contra *Meloidogyne incognita*

Após exposições das partes aéreas às SOV's, todos os extratos das raízes de tomateiros e feijoeiros apresentaram moderada atividade *in vitro* contra J2 de *M. incognita* (Figura, 5). Observou-se ainda, que os extratos de tomateiros tratados com as combinações de jasmona + jasmonato de metila (1), acetato de (E)-hex-2-enila + acetato de hexila (3) e *meso*-butano-2,3-diol + butano-1,2-diol + butano-1,3-diol + butano-1,4-diol (4), apresentaram valores de J2 mortos estatisticamente inferiores aos demais extratos, embora tenham reduzido a

população de *M. incognita* nas raízes, o que sugere que o mecanismo de ação destas SOV's não está correlacionado com a produção de substâncias nematicidas pelas plantas. Entretanto, observou-se no experimento com feijoeiros que o extrato proveniente de plantas tratadas com a combinação de acetato de linalila + nerolidol apresentou percentagem de J2 mortos superior aos demais extratos, o que sugere que estas duas substâncias podem ter induzido a produção de compostos nematicidas pela planta.

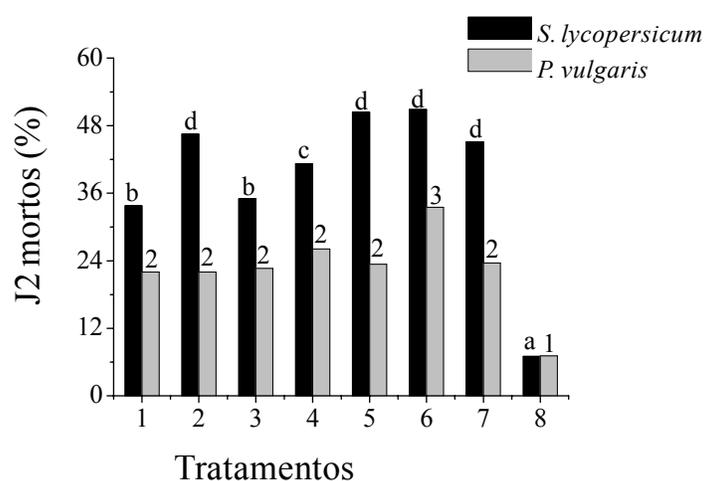


Figura 5 Mortalidade de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita* após exposição a extratos de raízes de tomateiros (*Solanum lycopersicum* L) ou feijoeiros (*Phaseolus vulgaris* L), cujas partes aéreas foram previamente pulverizadas com as seguintes combinações de substâncias orgânicas voláteis dissolvidas em solução aquosa de Tween 80 a 1 % (g.mL^{-1}): jasmona + jasmonato de metila (1), (Z)-hex-3-en-1-ol + (E)-hex-3-en-1-ol + (Z)-hex-2-en-1-ol + (E)-hex-2-enal (2), acetato de (E)-hex-2-enila + acetato de hexila (3), meso-butano-2,3-diol + butano-1,2-diol + butano-1,3-diol + butano-1,4-diol (4), 3-hidroxibutanona + 4-hidroxibutanona (5) e acetato de linalila + nerolidol (6). O extrato das raízes de plantas pulverizadas com solução de Tween 80 a 1 % (g.mL^{-1}) e solução de Tween 80 a 1 % (g.mL^{-1}), correspondendo respectivamente aos tratamentos 7 e 8, foram usados como controles. Barras com a mesma letra ou número, em cada gráfico, não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott e Knott ($P \leq 0,05$)

6 DISCUSSÃO

As substâncias referentes aos tratamentos 1-4 e 6, que apresentam baixos custos e toxicidades menores que as observadas para os nematicidas atualmente disponíveis (ARAB; BENT, 2006), revelaram-se promissoras para o desenvolvimento de novos produtos para o controle de nematóides. Inicialmente, pensou-se que os mecanismos de ação destas substâncias se baseavam em induzir as plantas a produzirem substâncias nematicidas em suas raízes. Por conseguinte, os extratos das raízes de tomateiros e feijoeiros foram inicialmente testados para averiguar a suas propriedades nematicidas. A primeira vista, a atividade *in vitro* contra *M. incognita* de todos os extratos (Figura, 5) pode parecer estranha, mas os valores de J2 mortos estão de acordo com os resultados obtidos por Rocha et al. (2005), que observaram a capacidade de plantas suscetíveis a fitonematóides produzirem substâncias capazes de aumentar a mortalidade de J2 em ensaios *in vitro*. Como o valor obtido para o extrato de plantas de feijão submetidas ao tratamento 6 foi superior aos dos demais tratamentos, aparentemente a combinação de acetato de linalila e nerolidol induziu a produção de substâncias ativas contra *M. incognita*. No entanto, esse não foi o caso com as plantas de tomateiro, pois os tratamentos 1-4 não aumentaram as percentagens de J2 mortos.

Outra possibilidade para explicar a redução da população de *M. incognita* nas raízes de plantas de feijão tratadas com acetato de linalila e nerolidol (tratamento 6), poderia ser a atividade direta dessas substâncias contra o nematóide, já que causaram aumento da mortalidade de J2 expostos aos extratos (Tabela 2). Embora nenhum relato sobre a atividade nematicida das SOV's empregadas no presente trabalho pudesse ser encontrado na literatura, as suas propriedades contra o nematóide (Tabela 2) parecem em consonância com os dados de substâncias análogas. Um exemplo é o octanal, um análogo do (E)-

hex-2-enal que foi isolado de *Coriandrum sativum* e se mostrou ativo contra o *Bursaphelenchus xylophilus* (KIM et al., 2008). Linalool, que é estruturalmente similar ao acetato de linalila, foi ativo contra *Meloidogyne incognita* quando na concentração de 1,0 mg.L⁻¹ (IBRAIM et al., 2006). Também é possível citar o trabalho de Lanny e Gary (2005), que usaram terpenos para o controle de fitonematóides.

No entanto, a redução da população de nematóides em plantas de feijão em decorrência da atividade nematicida de acetato linalila e nerolidol (tratamento 6) parece improvável, uma vez que estas substâncias foram empregadas na concentração de 0,5 mM, que acarretou uma percentagem de J2 mortos *in vitro* que era estatisticamente igual a observada para os controles (Tabela 2). De forma análoga, a atividade nematicida direta das SOV's correspondentes aos tratamentos 1-4 não parece satisfatória para explicar a redução da população de *M. incognita* em tomateiro, pois as atividades *in vitro* destas SOV's foram estatisticamente iguais ou apenas um pouco superior ao observado para o controle (Tabela 2). Além disso, os extratos correspondentes acarretaram a obtenção de valores de J2 mortos que estavam abaixo ou no mesmo nível do controle (Figura, 5).

Como o mecanismo de ação baseado na produção de compostos ativos contra *M. incognita*, nas plantas pulverizadas com as SOV's, parecia mais provável que a atividade direta sobre nematóides por essas substâncias, um estudo das alterações nas quantidades de alguns metabólitos presentes nas raízes de feijoeiro e tomateiro foi realizado. Inicialmente, buscou-se averiguar a concentração de fenóis totais em cada planta, já que na literatura se encontram vários dados de substâncias dessa classe com atividade contra nematóides (GUPTA et al. 2005; LI et al. 2006). Além disto, sabia-se que algumas plantas resistentes a nematóides aumentavam a produção de fenólicos quando inoculadas com tais fitoparasitas (BAJAJ et al. 1983; HUNG; ROHDE, 1973;

MAHMOOD; SAXENA, 1986; SHUKLA; SHAKRABORT, 1988). No entanto, como se pode observar, não foram detectados fenóis nas raízes de tomateiro e a concentração de fenólicos nos feijoeiros tratados com acetato de linalila + nerolidol (tratamento 6) foi estatisticamente igual a da testemunha.

Outra possibilidade averiguada foi o aumento na produção de aminoácidos, já que havia alguns trabalhos demonstrando que estruturas dessa classe de substâncias podiam apresentar atividades contra nematóides (BARBOSA et al., 1999; OLIVEIRA et al., 2009; TALAVERA; MIZUKUBO, 2005) e que plantas de algodão (*Gossypum hirsutum*) resistentes a nematóides possuíam quantidade de aminoácidos aproximadamente 50 % superior à observada para plantas suscetíveis quando eram colocadas em contato com J2 de *M. incognita* (LEWIS; MCCLURE, 1975). De fato, a concentração desses compostos nas raízes das plantas de feijão pulverizadas com acetato linalila e nerolidol (tratamento 6), foi um pouco superior a observada para o controle, sugerindo que os aminoácidos podem desempenhar um papel na ação destas SOV's contra nematóides. Da mesma forma, as quantidades de aminoácidos foram maiores para plantas de tomate tratadas com (Z)-hex-3-en-1-ol + (E)-hex-3-en-1-ol + (Z)-hex-2-en-1-ol + (E)-hex-2-enal (tratamento 2) e meso-butano-2,3-diol + butano-1,2-diol + butano-1,3-diol + butano-1,4-diol (tratamento 4), que reduziram a população de nematóides no sistema radicular de tomateiros. No entanto, jasmonato de metila + jasmona (tratamento 1) e acetato de (E)-hex-2-enila + acetato de hexila (tratamento 3), que também reduziram a população de nematóides, não causaram nenhuma alteração na concentração de aminoácidos em tomateiro (Figura, 1).

Apesar da grande importância da sacarose como nutriente para diversos organismos (AVIGAD; DEY, 1997; NELSON; COX, 2000), em trabalho recente (OLIVEIRA et al., 2007) se observou que tal carboidrato era uma das substâncias que conferiam atividade contra o nematóide *Meloidogyne exigua*, ao

extrato dos bulbos de cebola (*Allium cepa*). Tal resultado é coerente com o obtido por Roman (1963), segundo o qual, apesar de economicamente inviável, o uso de sacarose permite o controle de *Rotylenchulus reniformis* em tomateiros. No entanto, nenhuma alteração na produção desta substância foi observada para plantas de feijão (Figura, 1), sugerindo que este carboidrato não se relaciona com o modo de ação do acetato de linalila e nerolidol (tratamento 6). Embora o mesmo comportamento tenha sido observado em plantas de tomate submetidas aos tratamentos 1, 3 e 4, o tratamento 2 aumentou a produção de sacarose da planta, sugerindo uma correlação com o modo de ação de (Z)-hex-3-en-1-ol + (E)-hex-3-en-1-ol + (Z)-hex-2-en-1-ol + (E)-hex-2-enal.

Em relação aos carboidratos solúveis, a grande variação dessas substâncias nas raízes de tomateiro expostas ao tratamento 1 e 2 (Figura, 1) sugere que tais substâncias podem estar correlacionadas com o modo de ação contra nematóides pelas SOV's correspondentes. Tal resultado parece razoável quando se leva em consideração que altas concentrações de carboidratos podem causar a super expressão de genes relacionados com a defesa de plantas, como é o caso daqueles associados à biossíntese de inibidores de proteinases (JOHNSON; RYAN, 1990) e da chalcona sintase (TSUKAYA et al., 1991).

Os alcalóides compreendem estruturas químicas muito interessantes para o presente trabalho, uma vez que a atividade contra nematóides por algumas destas substâncias pode ser encontrada na literatura (CHITWOOD, 2002). Ademais, Voinilo e Ponin (1979) descreveram a correlação entre as concentrações de glicoalcalóides nas raízes de plantas de batata (*Solanum tuberosum*) e a sua resistência a fitonematóides. Embora a diferença em relação ao controle tenha sido pequena, observou-se aumento na quantidade de alcalóides nas raízes de plantas de feijão expostas ao tratamento 6 (acetato de linalila e nerolidol) (Figura, 1), o que sugere que o mecanismo de ação destas SOV's esteja relacionada à produção de alcalóides pelas plantas. No entanto, o

tratamento 1 (jasmonato de metila e jasmona), que não reduziu a população do nematóide em feijoeiros, também aumentou a quantidade de alcalóides nas raízes das plantas, o que parece contrário a uma participação dessas substâncias no mecanismo de ação do tratamento 6 contra *M. incognita*.

Dentre os quatro tratamentos que reduziram a população de nematóides em plantas de tomate (Tabela 1), o de número 1 aumentou a concentração de alcalóides totais, enquanto os outros (2-4) diminuíram tais valores (Figura 1). Embora essa diminuição na produção de alcalóides possa parecer desfavorável para o controle de nematóides, existe a possibilidade de ela estar acompanhada de redução da concentração de citocininas que, segundo Dropkin et al. (1969), pode aumentar em 165% o número de galhas de *M. incognita* em plantas de tomate resistentes a nematóides. Assim, a redução de alcalóides nas raízes de plantas de tomateiro tratadas com (Z)-hex-3-en-1-ol + (E)-hex-3-en-1-ol + (Z)-hex-2-en-1-ol + (E)-hex-2-enal (tratamento 2), acetato de (E)-hex-2-enila + acetato de hexila (tratamento 3) e *meso*-butano-2,3-diol + butano-1,2-diol + butano-1,3-diol + butano-1,4-diol (tratamento 4), pode ser desfavorável ao nematóide, uma vez que pode estar relacionada à redução de citocininas produzidas pela planta.

Recentemente, alguns grupos de pesquisa iniciaram o uso de ressonância magnética nuclear (RMN) na identificação e quantificação de compostos orgânicos em misturas complexas. O processo consiste em comparar os espectros obtidos a partir da mistura a ser analisada com um banco de dados, composto de espectros de várias substâncias puras em concentrações conhecidas (WISHART, 2008). Embora a maioria dos estudos relatados nesta área lidem com problemas de saúde humana (TIAZINI et al., 2009), alguns autores têm comprovado a eficácia de tal método no estudo de plantas (CHOI et al., 2005). Um exemplo é o trabalho de Leiss et al. (2009) que, através da utilização de espectroscopia de RMN, diferenciaram plantas saudáveis de *Dendranthema*

grandiflora daquelas infectadas por *Frankliniella occidentalis*. O presente trabalho corrobora a utilidade de tal método, já que foram identificadas e quantificadas dez substâncias nas raízes de *S. lycopersicum* e nove nas raízes de *P. vulgaris*.

Duas dessas substâncias correspondem a glicose e a frutose, que induzem genes de defesa tanto em plantas de fumo (HERBERS et al., 1996) como em plantas de uva (SALZMAN et al., 1998). Há também, o ácido fumárico que, segundo dados da literatura, apresenta atividade contra *Meloidogyne arenaria* (DJIAN et al., 1994). Ademais, este ácido está relacionado com a resistência de plantas de trigo a *Fusarium graminearum* Schwabe (PARANIDHARAN et al., 2008). De fato, observou-se que as plantas de tomateiro pulverizadas com (Z)-hex-3-en-1-ol + (E)-hex-3-en-1-ol + (Z)-hex-2-en-1-ol + (E)-hex-2-enal (tratamento 2) e *meso*-butano-2,3-diol + butano-1,2-diol + butano-1,3-diol + butano-1,4-diol (tratamento 4), apresentaram níveis de ácido fumárico superiores ao observado para o controle (Figura, 2). No entanto, como este comportamento também foi observado em plantas de tomate pulverizadas com 3-hidroxibutanona + 4-hidroxibutanona (tratamento 5) e acetato de linalila + nerolidol (tratamento 6), que não causaram redução na população do nematóide nas raízes dos tomateiros (Tabela 1), acredita-se não ser possível fazer uma correlação entre a quantidade de ácido fumárico nas raízes das plantas e o modo de ação das SOV's (tratamento 2 e 4).

O uso da RMN também permitiu identificar o ácido 4-aminobutírico, que pode estar relacionado à resistência de plantas a nematóide por causar paralisia flácida dos músculos destes animais (MCLEAN, 2003). Como no presente estudo a concentração deste aminoácido foi inferior ou igual a das plantas controle (Figura, 2 e 3), acredita-se que tal substância não esteja relacionada com o mecanismo de ação das SOV's.

Dentre as outras substâncias detectadas pelo emprego da RMN, vale destacar a trigonelina (Figura, 3) que, segundo dados da literatura, pode induzir a resistência de plantas a fitopatógenos. Para exemplificar, é possível citar a redução de 66% da densidade de infecção do fungo *Erysiphe graminis* em plantas de cevada (*Hordeum vulgare* L.) tratadas com trigonelina na concentração de 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (KRASKA; SCHONBECK, 1993). Entretanto no presente estudo não se observou variação na concentração da trigonelina após os tratamentos com as SOV's.

7 CONCLUSÃO

Concluindo, dentre as combinações de SOV's estudadas, as mais promissoras para reduzir a população de *M. incognita* em tomateiros foram às combinações de jasmonato de metila + jasmona, (Z)-hex-3-en-1-ol + (E)-hex-3-en-1-ol + (Z)-hex-2-en-1-ol + (E)-hex-2-enal, acetato de (E)-hex-2-enila + acetato de hexila e *meso*-butano-2,3-diol + butano-1,2-diol + butano-1,3-diol + butano-1,4-diol; e para feijoeiros a combinação de acetato de linalila + nerolidol foi a única que reduziu a população do nematóide. Apesar do mecanismo de ação dessas SOV's ainda não ter sido elucidado no presente trabalho, o que torna necessário efetuar novos estudos para averiguar melhor o efeito de cada uma delas e de suas concentrações sobre as populações de nematóides parasitas de plantas, é importante deixar evidente que tais substâncias apresentam grande potencial para uso futuro no controle de nematóides fitoparasitas, pois podem ser produzidas a baixos custos, podem ser facilmente manipuladas e têm toxicidades muito menores que as observadas para os nematicidas comercialmente disponíveis (ARAB; BENT, 2006).

REFERÊNCIAS

AERTS, R. B. et al. Methyl jasmonate vapor increases the developmentally controlled synthesis of alkaloids in *Catharanthus* and *Cinchona* seedlings. **Plant Journal**, Malden, v. 5, n. 5, p. 635-643, May 1994.

AHARONI, A. et al. Terpenoid metabolism in wild: type and transgenic *Arabidopsis* plants. **Plant Cell**, Rockville, v. 15, n. 12, p. 2866-2884, Dec. 2003.

AMARAL, D. R.; OLIVEIRA, F. E. R.; OLIVEIRA, D. F. Purification of two substances from bulbs of onion with nematocidal activity against *Meloidogyne exigua* Goeldi. **Nematology**, Leyden, v. 5, n. 6, p. 859-864, 2003.

ARAB, A.; BENTO, J. M. S. Plant volatiles: new perspectives for research in Brazil. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 35, n. 2, p. 151-158, Mar. 2006.

ARIMURA, G. et al. Herbivore-induced volatiles induce the emission of ethylene in neighboring lima bean plants. **Plant Journal**, Malden, v. 29, n. 1, p. 87-98, Jan. 2002.

ARIMURA, G.; KOST, C.; BOLAND, W. Herbivore-induced, indirect plant defences. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1734, n. 2, p. 91-111, Feb. 2005.

ASSOCIATION OF ANALYTICAL CHEMISTRY. **Official methods of analysis of the AOAC**. Washington: Board, 1960. 111 p.

AVIGAD, G.; DEY, P. M. Carbohydrate metabolism: storage carbohydrates. In: DEY, P. M.; HARBORNE, J. B. (Ed.). **Plant biochemistry**. London: Academic, 1997. p. 143-204.

BAJAJ, K. L.; ARORA, Y. K.; MAHAJAN, R. Biochemical differences in tomato cultivars resistant and susceptible to *Meloidogyne incognita*. **Revue de Nematologie**, Montrouge Cedex, v. 6, n. 1, p. 143-145, 1983.

BARBOSA, L. C. A. et al. Chemical constituents from *Mucuna aterrima* with activity against *Meloidogyne incognita* and *Heterodera glycines*. **Nematropica**, Auburn, v. 29, n. 1, p. 81-88, Jan. 1999.

CHEN, H. et al. Regulation of plant arginase by wounding, jasmonate, and the phytotoxin coronatine. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 279, n. 40, p. 45998-46007, Oct. 2004.

CHITWOOD, D. J. Phytochemical based strategies for nematode control. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 40, p. 221-249, Nov. 2002.

CHOI, Y. H. et al. Classification of ilex species based on metabolomic fingerprinting using nuclear magnetic resonance and multivariate data analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 53, n. 4, p. 1237-1245, Jan. 2005.

DINARDO-MIRANDA, L. L.; PIVETTA, J. P.; FRACASSO, J. V. Influência da época de aplicação de nematicidas em soqueiras sobre as populações de nematóides e a produtividade da cana-de-açúcar. **Bragantia**, Campinas, v. 67, n. 1, p. 179-190, 2008.

DJIAN, C.; PONCHET, M.; CAYROL, J. C. Nematocidal properties of carboxylic acids and derivatives. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 50, n. 11, p. 229-239, Nov. 1994.

DROPKIN, V. H.; HELGESON, J. P.; UPPER, C. D. The hypersensitivity reaction of tomatoes resistant to *Meloidogyne incognita*: reversal by cytokinins. **Journal of Nematology**, Marceline, v. 1, n. 1, p. 55-61, Jan. 1969.

DUNN, R. A. Extraction of cysts of *Heterodera* species from soils by centrifugation of high-density solutions. **Journal of Nematology**, Marceline, v. 1, n. 1, p. 7-17, Jan. 1969.

GUPTA, R. L.; PRASAD, D.; THUKRAL, R. Quantitative structure activity relationship study for the fungicidal and nematicidal activity of phenols. **Pesticide Research Journal**, New York, v. 17, n. 1, p. 15-20, 2005.

HERBERS, K. et al. Salicylic acid-dependent induction of pathogenesis-related protein transcripts by sugars is dependent on leaf developmental stage. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 397, n. 2, p. 239-244, Feb. 1996.

HUNG, C.; ROHDE, R. A. Phenol accumulation related to resistance in tomato to infection by root-knot and lesion nematodes. **Journal of Nematology**, Marceline, v. 5, n. 4, p. 253-258, Oct. 1973.

HUSSEY, R. S.; BARKER, K. R. A comparison of methods for collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. **Plant Disease Reporter**, Saint Paul, v. 57, n. 12, p. 1025-1028, Dec. 1973.

IBRAHIM, S. K.; TRABOULSI, A. F.; EL-HAJ, S. Effect of essential oils and plant extracts on hatching, migration and mortality of *Meloidogyne incognita*. **Phytopathologia Mediterranea**, Bologna, v. 45, n. 3, p. 238-246, 2006.

JOHNSON, R.; RYAN, C. A. Wound-inducible potato inhibitor II genes: enhancement of expression by sucrose. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 14, n. 4, p. 527-536, Apr. 1990.

KEINANEN, M.; OLDHAM, N. J.; BALDWIN, I. T. Rapid HPLC screening of jasmonate-induced increases in tobacco alkaloids, phenolics, and diterpene glycosides in *Nicotiana attenuate*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 49, n. 8, p. 3553-3558, Aug. 2001.

KESSLER, A.; BALDWIN, I. T. Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. **Science**, Washington, v. 291, n. 5511, p. 2141-2144, Mar. 2001.

KIM, J. et al. Nematicidal activity of plant essential oils and components from coriander (*Coriandrum sativum*), oriental sweetgum (*Liquidambar orientalis*), and Valerian (*Valeriana wallichii*) essential oils against pine wood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 56, n. 16, p. 7316-7320, July 2008.

KISHIMOTO, K. et al. Components of C6-aldehyde-induced resistance in *Arabidopsis thaliana* against a necrotrophic fungal pathogen, *Botrytis cinerea*. **Plant Science**, Shannon, v. 170, n. 4, p. 715-723, Apr. 2006.

_____. Volatile C6-aldehydes and Allo-ocimene activate defense genes and induce resistance against *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis thaliana*. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 46, n. 6, p. 1093-1102, May 2005.

KOST, C.; HEIL, M. Herbivore-induced plant volatiles induce an indirect defence in neighbouring plants. **Journal of Ecology**, Malden, v. 94, n. 3, p. 619-628, May 2006.

KRASKA, T.; SCHONBECK, F. About changes in the chromatin structure after resistance induction in *Hordeum vulgare* L. **Journal of Phytopathology**, Malden, v. 137, n. 1, p. 10-14, 1993.

LANNY, F.; GARY, O. **Methods of killing nematodes comprising the application of a terpene component.** Glasgow: Murgitroyd, 2004. 12 p.

LEISS, K. A. et al. Identification of chlorogenic acid as a resistance factor for thrips in *Chrysanthemum*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 150, n. 15, p. 1567-1575, May 2009.

LEWIS, S. A.; MCCLURE, M. A. Free amino acids in roots of infected cotton seedlings resistant and susceptible to *Meloidogyne incognita*. **Journal of Nematology**, Marceline, v. 7, n. 1, p. 10-15, Jan. 1975.

LI, G. et al. The chemical constituents of the fungus *Stereum* sp. **Chemistry & Biodiversity**, Weinheim, v. 3, n. 2, p. 210-216, Feb. 2006.

MAHMOOD, I.; SAXENA, S. K. Relative susceptibility of different cultivars of tomato to *Rotylenchulus reniformis* in relation to changes in phenolics. **Revue de Nematologie**, Montrouge Cedex, v. 9, n. 1, p. 89-91, 1986.

MARTIN, D. et al. Methyl jasmonate induces traumatic resin ducts, terpenoid resin biosynthesis, and terpenoid accumulation in developing xylem of norway spruce stems. **Plant Physiology**, Rockville, v. 129, n. 7, p. 1003-1018, July 2002.

MCLEAN, M. D. et al. Overexpression of glutamate decarboxylase in transgenic tobacco plants confers resistance to the northern root - knot nematode. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 11, n. 4, p. 277-285, May 2003.

MOLINARI, S. **Bioassays on plant: nematode interaction.** Bari: Institute of Plant Protection, 2009. 1354 p.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry.** New York: Worth, 2000. 1013 p.

OLIVEIRA, D. F. et al. Activity of amino acids produced by *Paenibacillus Macerans* and from commercial sources against the root-knot nematode *Meloidogyne Exigua*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 124, n. 1, p. 57-63, May 2009.

_____. Atividade de carboidrato purificado a partir da cebola (*Allium cepa* L.) e de carboidratos comerciais sobre juvenis de *Meloidogyne exigua* Goeldi. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 3, p. 202-209, maio/jun. 2007.

- PARANIDHARAN, V. et al. Resistance-related metabolites in wheat against *Fusarium graminearum* and the virulence factor deoxynivalenol (DON). **Botany**, Ottawa, v. 86, n. 10, p. 1168-1179, Oct. 2008.
- PARÉ, P. W. et al. Elicitors and priming agents initiate plant defense responses. **Photosynthesis Research**, Dordrecht, v. 85, n. 2, p. 149-159, Aug. 2005.
- PASSOS, L. P. **Métodos analíticos e laboratoriais em fisiologia vegetal**. Coronel Pacheco: EMBRAPA-CNPGL, 1996. 223 p.
- ROCHA, F. S. et al. Ação de exsudatos radiculares de plantas na eclosão, motilidade, mortalidade e penetração de juvenis de *Meloidogyne incognita*. **Summa phytopathologica**, Jaboticabal, v. 31, n. 2, p. 187-193, 2005.
- ROMAN, J. Sugar, an effective but expensive nematocide. **Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico**, San José, v. 47, n. 1, p. 54-55, 1963.
- RYU, C. et al. Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 134, n. 3, p. 1017-1026, Mar. 2004.
- _____. Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 100, n. 8, p. 4927-4932, Apr. 2003.
- SALZMAN, R. A. et al. Coordinate accumulation of antifungal proteins and hexoses constitutes a developmentally controlled defense response during fruit ripening in grape. **Plant Physiology**, Rockville, v. 117, n. 2, p. 465-472, June 1998.
- SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A. A cluster analyses method for grouping means in the analyses of variance. **Biometrics**, Malden, v. 30, n. 3, p. 502-512, Sept. 1974.
- SHUKLA, Y. M.; CHAKRABORTY, M. K. Biochemical studies on response of tobacco and tomato plants to root knot nematode infection. **Tobacco Research**, Oxford, v. 14, n. 1, p. 43-50, 1988.
- SREEVIDYA, N.; MEHROTRA, S. Spectrophotometric method for estimation of alkaloids precipitable with Dragendorff's reagent in plant materials. **Journal of AOAC International**, Gaithersburg, v. 86, n. 6, p. 1124-1127, 2003.

TALAVERA, M.; MIZUKUBO, T. Effects of DL-methionine on hatching and activity of *Meloidogyne incognita* eggs and juveniles. **Pest Management Science**, Chichester, v. 61, n. 4, p. 413-416, Nov. 2005.

TIAZINI, S.; LOPES, V.; GUNTHER, U. L. Early stage diagnosis of oral cancer using ¹H NMR-based metabolomics. **Neoplasia**, Houston, v. 11, n. 3, p. 269-276, Mar. 2009.

TSUKAYA, H. et al. Sugar-dependent expression of the CHS-A gene for chalcone synthase from petunia in transgenic *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 97, n. 4, p. 1414-1421, Dec. 1991.

VOINILO, V. A.; PONIN, I. Y. Role of glycoalkaloids and phytoalexins in the resistance of potatoes to nematodes. **Seryya Biyalagichnykh Navuk**, Navuk Belarusi, v. 4, p. 73-75, 1979.

WISHART, D. S. Quantitative metabolomics using NMR. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 27, n. 3, p. 228-237, Mar. 2008.

ARTIGO 2

Variações metabólicas em raízes de cafeeiro expostas ao nematóide de galhas *Meloidogyne exigua*

1 RESUMO

Variações metabólicas em raízes de cafeeiro expostas ao nematóide de galhas *Meloidogyne exigua*

Com o objetivo de contribuir para a compreensão do mecanismo de defesa de cafeeiros contra *Meloidogyne exigua*, estudaram-se as variações metabólicas nas raízes de plantas resistentes (IAPAR-59) e suscetíveis (Catuaí-Vermelho) a nematóides, até 96 h após a exposição das mesmas a juvenis do segundo estágio do nematóide, já que este é um período de grande importância para a formação do sítio de alimentação do parasita. Para tanto, determinaram-se as concentrações totais de fenóis, carboidratos, sacarose, aminoácidos e alcalóides. Além disto, espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio foram obtidos dos extratos das raízes das plantas para a identificação e quantificação dos metabólitos. Uma das alterações mais marcantes ocorreu para o ácido fumárico, cuja concentração variou de $59 \mu\text{g} \cdot (\text{g de raiz})^{-1}$ (0h) para $138 \mu\text{g} \cdot (\text{g de raiz})^{-1}$ (24 h) na planta resistente, enquanto na planta suscetível uma variação semelhante só foi detectada bem mais tarde (96h). Um comportamento análogo foi observado para o ácido quínico, cuja concentração nas raízes da planta resistente também se elevou mais rapidamente que na planta suscetível. A concentração da sacarose teve um aumento expressivo para a cultivar resistente (370 % em 48 h), enquanto para a cultivar suscetível não se observou variação significativa. Outra alteração marcante ocorreu para os alcalóides totais, cujas concentrações foram bem mais elevadas em 24 e 48h, na cultivar suscetível. Os resultados sugerem que a maior produção de sacarose, fenólicos, ácido fumárico e ácido quínico, e a menor produção de alcalóides, por parte da cultivar IAPAR-59, nas primeiras 48 h após o contato da planta com o nematóide, estejam associadas ao mecanismo de resistência de cafeeiros a *M. exigua*.

Palavras-chave: Metabólitos. Resistência. Café. Nematóides. *Meloidogyne*.

2 ABSTRACT

Metabolic variations in the roots of coffee plants exposed to the root-knot nematode *Meloidogyne exigua*

To contribute to understanding the mechanism by which coffee plants defend themselves against *Meloidogyne exigua*, metabolic variations in the roots of coffee seedlings, resistant (IAPAR-59) and susceptible (Catuai-Vermelho) to plant-parasitic nematodes, were studied up to 96 h after the contact of roots with *M. exigua* second-stage juveniles (J2). During this period, which is very important for the establishment of feeding sites of the parasite, the concentrations of phenols, carbohydrates, amino acids and alkaloids in the roots were determined. Furthermore, hydrogen nuclear magnetic resonance spectra from the root extracts were acquired to identify and quantify other metabolites. One of the most striking changes occurred for fumaric acid, the concentration of which varied from 59 $\mu\text{g} \cdot (\text{g of root})^{-1}$ (0h) to 138 $\mu\text{g} \cdot (\text{g of root})^{-1}$ (24h of root contact with the nematode) in the resistant plant, while in the susceptible plant a similar variation was observed much later (96h). Similar behavior was observed for quinic acid, whose concentration increased more rapidly for the resistant plant. The concentration of sucrose increased 370 % in 48 h for the resistant plant, while no significant variation in the amount of this carbohydrate was observed in the susceptible plant. Another notable change occurred for the alkaloid concentrations, which was much higher at 24 and 48 h in the susceptible cultivar. These results suggest that the higher production of sucrose, phenolic, fumaric acid and quinic acid, and the lower alkaloid production by the cultivar IAPAR-59, in the first 48 h after the contact of plant roots with the nematode, are associated with the resistance of coffee plants to *M. exigua*.

Keywords: Metabolites. Resistance. Coffee. Nematodes. *Meloidogyne*.

3 INTRODUÇÃO

Muitas plantas respondem aos ataques de agentes patogênicos com alterações em seus metabolismos, de forma a aumentar ou diminuir as concentrações de algumas substâncias ou ainda, para produzir novas moléculas, o que pode resultar no sucesso da infecção ou na resistência da planta ao patógeno. Em decorrência de tais alterações metabólicas, pode-se, por exemplo, observar uma explosão oxidativa (CAVALCANTI et al., 2007), causando a morte das células vegetais ao redor do agente patogênico (KOMBRINK; SCHMELZER, 2001) e, conseqüentemente, impedindo a propagação da doença a partir do local de infecção inicial. Podem ser observadas também, mudanças nas composições das paredes celulares ou a presença de compostos antimicrobianos, comumente denominados fitoalexinas (PEDRAS et al., 2009).

O conhecimento de tais alterações metabólicas pode ser de grande valia, por exemplo, para o controle dos nematóides de galhas, que causam enormes perdas aos produtores de café no Brasil. Dentre esses fitopatógenos se pode destacar o nematóide de galhas *Meloidogyne exigua* Goeldi, 1887, que, apesar de não ser a espécie mais agressiva que parasita o cafeeiro, provavelmente é a que acarreta os maiores prejuízos à cafeicultura brasileira (SILVA et al., 2006). Esse nematóide é amplamente disseminado, ocorrendo praticamente em todas as regiões cafeeiras do país (CASTRO et al., 2008).

Como os métodos atualmente disponíveis para o controle de fitonematóides apresentam desvantagens como a dificuldade de utilização em algumas localidades e custo elevado, existe uma demanda cada vez maior por novas metodologias menos onerosas e que não contaminem o homem e o ambiente com substâncias de alta toxicidade (CHITWOOD, 2002). Neste contexto, a resistência de plantas a nematóides tem sido considerada uma potencial alternativa para o manejo de fitonematóides, principalmente aqueles

do gênero *Meloidogyne*, que apresentam uma interação especializada com seus hospedeiros (ROBERTS, 2002). Sendo assim, é de grande importância entender os mecanismos de defesa de plantas contra nematóides para que se possam desenvolver novas cultivares para serem utilizadas em áreas contaminadas com *Meloidogyne* spp. Ademais, tal conhecimento poderá resultar em nematicidas de origem natural, que sejam menos tóxicos que aqueles atualmente disponíveis.

Os nematóides do gênero *Meloidogyne* têm parasitismo caracterizado pelo estabelecimento de sítios de alimentação, que são escoadores de nutrientes produzidos através da fotossíntese pela planta (TRUDGILL; BLOK, 2001). Logo após a eclosão, o juvenil do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne* spp., fase infectiva destes patógenos, tem 30% do seu peso corporal correspondente a lipídios, que constituem a sua principal fonte energética até a obtenção do seu alimento a partir da planta hospedeira (VAN GUNDY, 1985). Gastos de 25% desta fonte energética, que tendem a ocorrer até 48 h após a eclosão do J2 quando a temperatura está em torno de 28 °C, correspondem à perda de 45% da sua capacidade de penetração nas raízes da planta e formação do sítio de alimentação (CAMPOS et al., 2006). Tais dados estão plenamente de acordo com o trabalho realizado por Pedroza et al. (1996), segundo os quais são observadas altas taxas de penetração de *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria* até 48 h após a inoculação dos mesmos em plantas de soja, quando a temperatura se encontra em torno de 25 °C (PEDROZA et al., 1996).

Portanto, com vistas a contribuir para elucidar os mecanismos de resistência de cafeeiro a *M. exigua*, o presente trabalho teve como objetivo identificar e quantificar vários metabólitos nas raízes de *Coffea arabica* L. cv. Catuaí-vermelho e nas raízes da linhagem gerada (F8) cv. IAPAR-59, que são respectivamente suscetíveis e resistentes a *M. exigua*, após a exposição das raízes das plantas ao nematóide na fase inicial do ciclo (24 a 96 horas).

Objetivou-se também, verificar se nas raízes das plantas expostas ao nematóide havia a produção de substâncias nematicidas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Inóculo do nematóide

Raízes de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) infestadas com *M. exigua* foram lavadas cuidadosamente e cortadas em pedaços de 1 cm. Em seguida, foram trituradas em liquidificador por 40 s em solução de hipoclorito de sódio a 0,5 % (g.g^{-1}), seguindo-se a técnica de Hussey e Barker (1973). Os ovos retidos na peneira com poros de 25 μm foram recolhidos e colocados para eclodirem em um funil de Baermann (DUNN, 1969), formado com tela e papel de espessura fina. Os juvenis do segundo estágio (J2) foram recolhidos depois de 48 e 72 horas, sendo descartada a primeira coleta de 24 horas.

4.2 Obtenção das mudas de cafeeiro

Para a obtenção das mudas de cafeeiro, sementes das cultivares Catuaí-Vermelho e IAPAR-59, consideradas suscetível e resistente a *M. exigua*, respectivamente, foram desinfestadas com hipoclorito de sódio a 1% (g.g^{-1}) por 1 minuto. Em seguida, descartaram-se as soluções e as sementes foram lavadas três vezes com água destilada. Após a desinfestação, colocaram-se as sementes em copos plásticos contendo substrato composto de solo, areia e esterco em proporção de 1:1:1 (v/v/v). Após 120 dias em sala climatizada a 28 °C, com fotoperíodo de 12 h, obtido pelo emprego de lâmpadas fluorescentes, as mudas estavam no tamanho ideal para a instalação do experimento.

4.3 Montagem dos experimentos com mudas de cafeeiro

Uma suspensão aquosa (2,0 mL) contendo 696 J2 de *M. exigua* foi colocada no substrato de cada muda de cafeeiro e, passadas 0, 24, 48 e 96 h em sala climatizada com temperatura de 28 °C e fotoperíodo de 12 h, as partes aéreas das plantas foram cortadas e os sistemas radiculares foram separados cuidadosamente do substrato e lavados em balde de água de 10 L. Em seguida, as raízes foram congeladas, liofilizadas e guardadas em freezer a -15 °C até o momento das extrações dos seus metabólitos.

4.4 Quantificação de aminoácidos e carboidratos nas raízes de plantas de cafeeiro

Conforme descrito por Passos (1996), 150 mg de cada sistema radicular foram moídos em gral de porcelana e submetidos a duas extrações com 20 mL de uma solução de metanol/clorofórmio/água (MCA) na proporção de 12:5:3 (v/v/v). Após filtrações em algodão, os líquidos de ambas as extrações foram combinados e adicionados a uma mistura de 30 mL de clorofórmio e 60 mL de água. Agitou-se fortemente cada mistura obtida e, em seguida, separou-se por decantação a fase aquosa, que foi concentrada até *secura* em evaporador rotatório e liofilizadora. Cada uma das amostras liofilizadas foi dissolvida em água destilada até que o volume total fosse de 25 mL, obtendo-se assim soluções mães para as dosagens de sacarose, carboidratos totais e aminoácidos.

Para a quantificação de aminoácidos, transferiram-se em triplicata para tubos de ensaio, alíquotas de 0,5 mL de cada solução mãe e 1,0 mL de solução de ninidrina, que foi previamente preparada (25 mL de NaOAc.3H₂O a 1,36 g.mL⁻¹ (pH 5,5), 20 mL de ácido acético glacial, 75 mL de éter monometílico de etilenoglicol, 0,2 g de ninidrina e 30 mg de hidrindantina). Os tubos foram agitados para a obtenção de uma solução homogênea e mantidos em banho-maria a 100 °C por 15 min. Após o resfriamento, adicionaram-se 3,0 mL de

etanol/água (1:1) ao conteúdo de cada tubo, que foi deixado na bancada para resfriar. Realizaram-se, então, leituras das absorvâncias das soluções resultantes em um espectrofotômetro Spectrum SP1105, a 570 nm, em cubetas de vidro. As concentrações de aminoácidos totais foram obtidas pelas comparações das absorvâncias observadas com aquelas provenientes de uma curva analítica, que foi previamente construída com L-leucina.

Para a quantificação dos carboidratos solúveis, colocaram-se, em triplicata, 1,0 mL de cada solução mãe, 0,5 mL de solução aquosa de fenol a 5% ($\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado em cada tubo. Após 10 min em repouso, aqueceram-se os tubos em banho Maria a 30 °C por 15 minutos. A seguir, realizaram-se leituras das absorvâncias em 490 nm. As concentrações de carboidratos foram obtidas pelas comparações com valores de uma curva analítica construída pelo emprego da D-glicose.

Quanto à quantificação da sacarose, transferiu-se 1,0 mL de cada solução mãe para tubos de ensaio em triplicata, para ser liofilizada e redissolvida em 0,1 mL de água. Adicionou-se 0,1 mL de KOH a 30 % ($\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) ao conteúdo de cada tubo, que foi mantido em banho a 100 °C por 10 min. Após resfriamento até a temperatura ambiente, adicionaram-se 5 mL de solução de antrona (600 mg de antrona anidra, 270 mL de ácido sulfúrico concentrado e 30 mL de água) ao conteúdo de cada tubo, que foi mantido em banho a 40 °C por 10-15 min. A seguir, realizaram-se as leituras de absorvância em 620 nm. As concentrações foram obtidas por comparação com uma curva analítica construída com o uso de sacarose.

4.5 Quantificação de fenóis nas raízes de plantas de cafeeiro

Com o objetivo de quantificar fenóis totais (AOAC 1960), colocaram-se em balões de fundos redondos, 150 mg de cada sistema radicular seco e moído em gral e 12,5 mL de metanol/água (1:1). Após refluxo durante 15 min, as

misturas foram filtradas e repetiu-se tal processo de extração com os resíduos. Combinaram-se os filtrados e completaram-se os volumes dos mesmos para 25 mL com água destilada. Em tubos de ensaio foram colocados, em triplicata, 20 μL de cada solução resultante, 1,68 mL de água, 100 μL do reagente de Folin Dennis (2,5 g de tungstato de sódio diidratado ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 0,5 g de ácido fosfomolibdico, 1,25 mL de ácido fosfórico concentrado e água para completar o volume até 25 mL) e 200 μL de solução aquosa de carbonato de sódio a 2,0 % ($\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$). Em seguida, fizeram-se leituras das absorvâncias em 720 nm e converteram-se os valores obtidos em concentrações de fenóis por comparação com curva analítica obtida a partir do uso do ácido tânico.

4.6 Quantificação de alcalóides nas raízes de plantas de cafeeiro

Seguindo a metodologia descrita por Sreevidya e Mehrotra (2003) para a análise de alcalóides, 150 mg de cada sistema radicular seco e moído em almofariz foram submetidos a duas extrações com 10 mL de solução aquosa de ácido acético a 2% ($\text{v} \cdot \text{v}^{-1}$) por 10 minutos. As soluções obtidas foram combinadas e retiraram-se três alíquotas de 5 mL da solução final para serem misturadas com 2,0 mL do reagente de Dragendorff (0,8 g de $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$, 40 mL de água destilada, 10 mL de ácido acético glacial, 8,0 g de KI, 20 mL de água destilada) em tubos de ensaio. Centrifugaram-se as misturas obtidas e se descartaram os sobrenadantes. Após lavagem com etanol (2 x 4 mL), os resíduos foram misturados com 2,0 mL de solução aquosa de sulfeto de sódio a 1 % ($\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) e centrifugados. Os sobrenadantes foram novamente descartados, enquanto os resíduos foram dissolvidos em 2,0 mL de HNO_3 concentrado, o que resultou em soluções que foram diluídas até 10 mL com água destilada. Misturou-se 1,0 mL de cada solução obtida com 5,0 mL de solução aquosa de tiouréia a 3% ($\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) e se realizaram leituras das absorvâncias em 435 nm.

Converteram-se os valores em concentrações de alcalóides totais por comparações com uma curva analítica proveniente do uso de brucina.

4.7 Análise por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹H)

Para a obtenção dos extratos, utilizou-se a metodologia descrita por Passos (1996), que se encontra descrita acima. Os extratos das raízes de cafeeiro, já liofilizados, foram dissolvidos em solução tampão de fosfato a 50 mM (Mallinckodt Baker S.A.) em água deuterada (D₂O) (Cambridge Isotope Laboratory), pH = 7,5, contendo 0,5 mM de 2,2-dimetil-2-silapentano-5-sulfonato de sódio (DSS) (CIL - Cambridge Isotope Laboratory) como referência interna. Os espectros de hidrogênio foram obtidos em espectrômetro Varian AS 500 (500 MHz), com tempo de aquisição de 4 segundos, acúmulo de 32 varreduras e pulso de 90°. Os espectros foram obtidos em triplicata. Para a identificação e a quantificação dos metabólitos, utilizou-se o programa Chenomx Suite 6.0, (Chenomx Inc., Edmonton, Canadá) e os bancos de dados Biological Magnetic Resonance Data Bank (<http://www.bmrb.wisc.edu>) e Colmar suite of web servers (<http://spinportal.magnet.fsu.edu/>).

4.8 Atividade *in vitro* de extratos de raízes de plantas de cafeeiro contra o nematóide

No preparo dos extratos foram utilizados 250 mg de cada sistema radicular seco e moído, os quais foram mantidos em 10 mL de metanol durante 48 h. A seguir, as misturas foram filtradas em algodão e os resíduos submetidos a mais duas extrações com 10 mL de metanol. Os líquidos das três extrações foram combinados e concentrados até *secura* em evaporador rotatório e liofilizadora. Solubilizaram-se alíquotas de 8 % das massas obtidas em 1,0 mL de solução aquosa de Tween 80 a 1 % (g.mL⁻¹), para serem submetidas ao teste

de mortalidade de J2 de *M. exigua* adaptado do método descrito por Amaral et al. (2003). Para tanto, colocaram-se 100 μL destas soluções e 20 μL de uma suspensão aquosa contendo aproximadamente 25 J2, em cavidades de placa de polipropileno com 96 cavidades de 300 μL . Após 48 h, adicionou-se uma gota de solução de NaOH 1 M ao conteúdo de cada cavidade e, em seguida, contaram-se os nematóides. Aqueles retos e imóveis foram considerados mortos, enquanto os retorcidos e móveis foram considerados vivos. Os valores obtidos foram convertidos em porcentagem antes da realização dos cálculos estatísticos. Realizaram-se quatro repetições, sendo utilizadas como testemunhas solução de Tween 80 a 1% ($\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e água.

4.9 Análise estatística

Os valores foram submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Scott e Knott (1974) a 5 % de significância. Para tanto, empregou-se o programa SISVAR (FERREIRA, 2000). Os espectros de RMN ^1H também foram convertidos, nos intervalos de 0,02 a 4,50 ppm e 5,0 a 9,98 ppm, a uma tabela de área versus intervalo de 0,04 ppm, para que pudessem ser submetidos à análise de componentes principais (PCA) pelo emprego do *software* Pirouette 3.11 (Infometrix, Inc., Woodinville, WA).

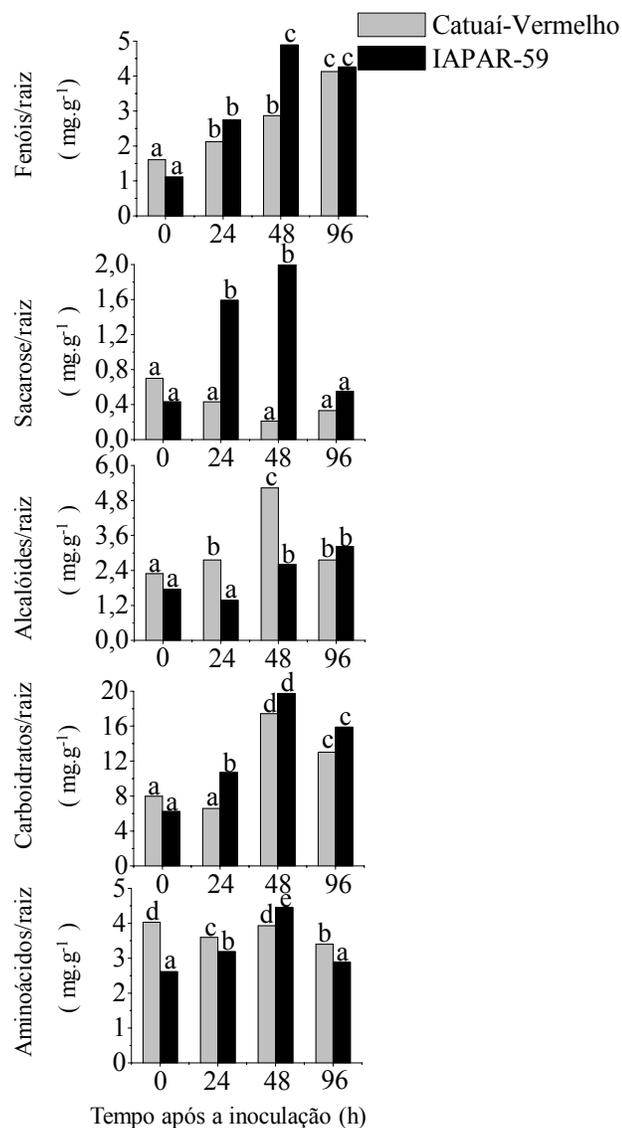
5 RESULTADOS

5.1 Quantificação de aminoácidos, carboidratos, fenóis e alcalóides nas raízes de plantas de cafeeiro

Pode-se observar um ligeiro aumento na concentração de aminoácidos livres na cultivar resistente até 48 h após a infestação com *M. exigua*. Entretanto, após 96 h a concentração de aminoácidos livres na cultivar suscetível foi superior a da resistente. Já para os carboidratos solúveis, verifica-se, a partir de

48 h de infestação, que ambas as cultivares tiveram aumento nas concentrações em relação ao tempo inicial (0 h de infestação). No entanto, para a sacarose ocorreu uma diferenciação expressiva entre a cultivar suscetível e a resistente, que possuía quantidades bem maiores de sacarose em suas raízes após 24 e 48 h de exposição a *M. exigua* (Figura, 1).

Ambas as cultivares de cafeeiro aumentaram as concentrações de fenóis após a exposição das raízes a *M. exigua* (Figura, 1). Entretanto, 48 horas após a infestação, o valor observado para a cultivar resistente foi superior ao da suscetível. Quanto aos alcalóides, após 96 h de exposição das raízes de cafeeiros a *M. exigua*, as suas concentrações eram estatisticamente iguais e superiores às observadas inicialmente para ambas as cultivares (Figura, 1). No entanto, ocorreu na cultivar suscetível uma maior produção de alcalóides após 24 e 48 h da infestação com o nematóide.



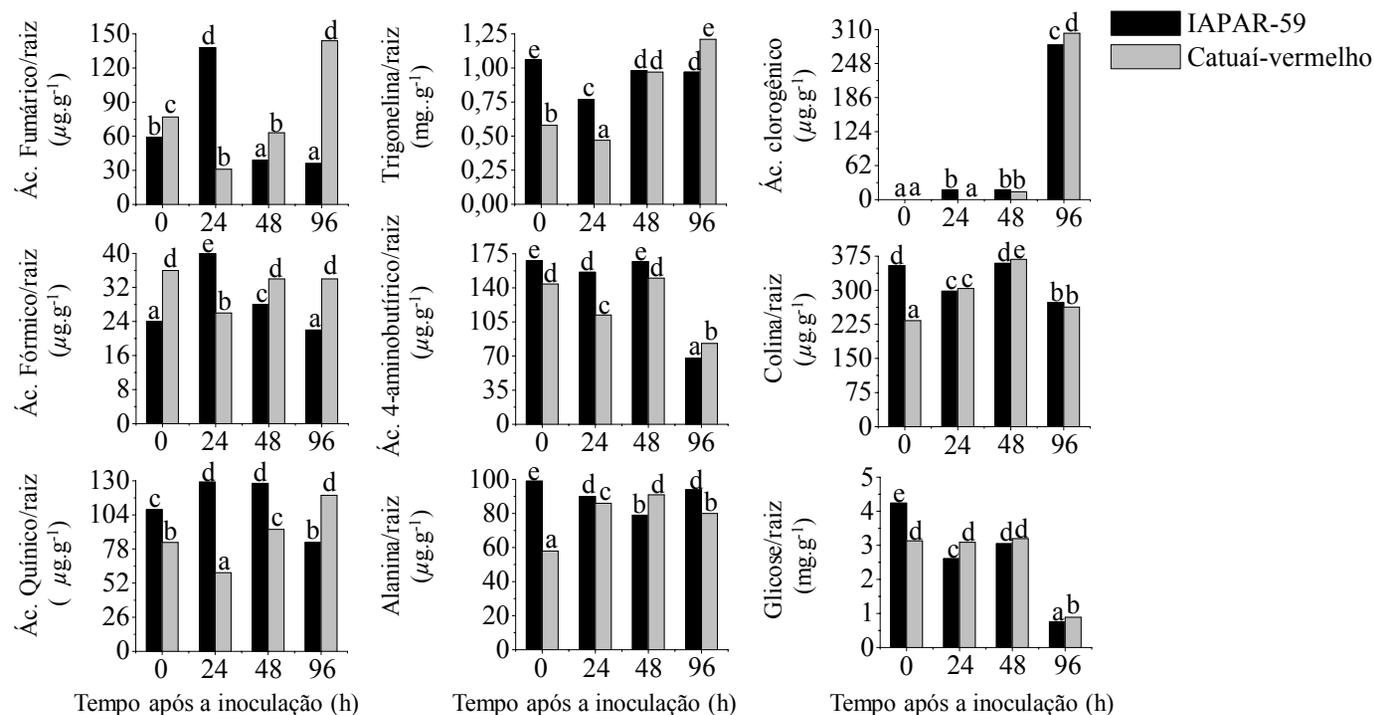
* Ác= Ácido

Figura 1 Concentrações de alcalóides, aminoácidos livres, carboidratos solúveis, sacarose e fenóis em raízes de mudas de café resistente (IAPAR-59) e suscetível (Catuaí-Vermelho) a nematóides. As análises foram feitas após 0, 24, 48 e 96 h de exposição das raízes a *Meloidogyne exigua*. Barras com a mesma letra em cada gráfico não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott e Knott ($P \leq 0,05$)

5.2 Análise por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H)

Através da espectroscopia de RMN ^1H foi possível identificar e quantificar as seguintes substâncias nas raízes de cafeeiro: ácido 4-aminobutírico, ácido clorogênico, ácido fórmico, ácido fumárico, ácido quínico, alanina, colina, glicose e trigonelina (Figura, 2). Dentre as várias alterações observadas após a infestação com *M. exigua*, vale mencionar o aumento expressivo da concentração do ácido fumárico em 24 h para a cultivar IAPAR-59 (resistente), que foi seguido de reduções a valores menores que os iniciais nos períodos subsequentes. Tal comportamento foi exatamente oposto ao observado para a cultivar Catuaí-Vermelho (suscetível). Observam-se variações parecidas para o ácido quínico, cuja concentração também aumenta inicialmente e depois decresce para a cultivar resistente, enquanto o oposto é verificado para a cultivar suscetível. Outra alteração observada foi o aparecimento do ácido clorogênico em 24 h na cultivar resistente e em ambas as cultivares em 48 e 96 h, sendo que na última avaliação (96 h) ocorreu um aumento expressivo na concentração de tal substância. Também se podem observar reduções nas concentrações de glicose e do ácido 4-aminobutírico após 96 h de infestação em ambas as cultivares.

Ao se submeter os espectros de RMN ^1H a análise dos componentes principais, observou-se que o uso de 14 componentes permitia explicar 99,9% da variância, sendo os dois primeiros responsáveis por 84,9% de tal variância (Figura, 3). Pode-se observar claramente a separação entre as cultivares resistentes e suscetíveis nos períodos de 0, 24, 48 e 96 h após a inoculação de *M. exigua*, embora no último período de análise as cultivares estivessem bem mais próximas uma da outra.



* Ác= Ácido

Figura 2 Concentrações dos metabólitos identificados e quantificados por ressonância magnética nuclear de hidrogênio em raízes de cafeeiro resistente (IAPAR-59) e suscetível (Catuai-Vermelho) a nematóides fitoparasitas. As análises foram feitas após 0, 24, 48 e 96 h de exposição das raízes a *Meloidogyne exigua*. Barras com a mesma letra em cada gráfico não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott e Knott ($P \leq 0,05$)

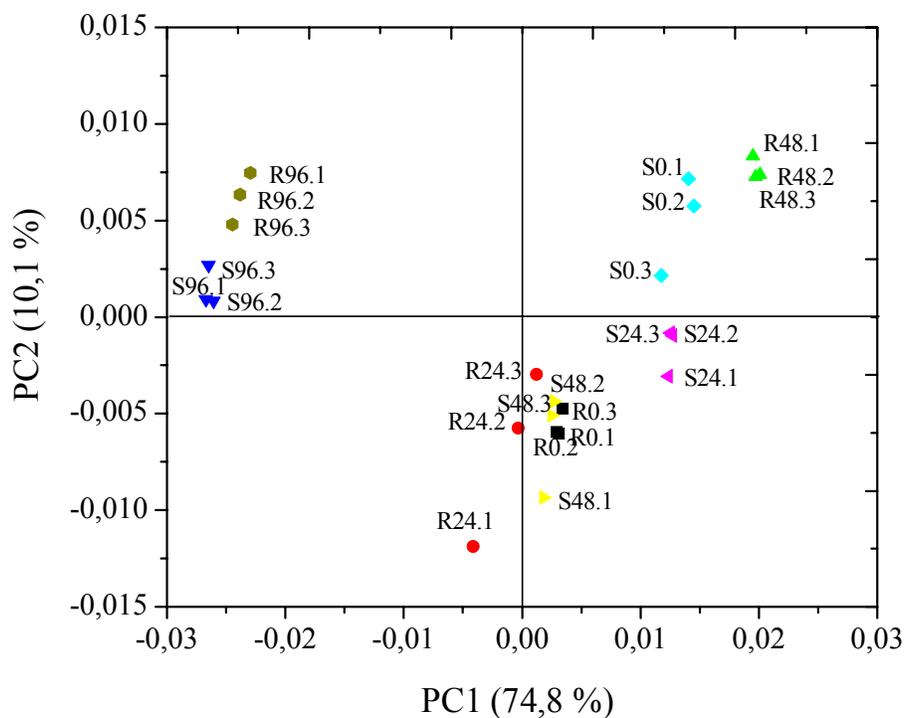


Figura 3 Escores da análise de componentes principais dos espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio dos extratos das raízes de cultivares de cafeeiro resistente (Rx.y, sendo “x” correspondente ao tempo após a inoculação do nematóide e “y” o número da repetição) e suscetível (Sx.y, idem) a nematóides, após 0, 24, 48 e 96 horas da inoculação de 696 juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne exigua* nas plantas

5.3 Atividade *in vitro* de extratos de raízes de plantas de cafeeiro contra nematóide

Uma fraca atividade *in vitro* contra J2 de *M. exigua* (Figura, 4) foi observada para os extratos das raízes de cafeeiros que, com o passar do tempo, mostraram-se mais tóxicas aos J2 para ambas as cultivares.

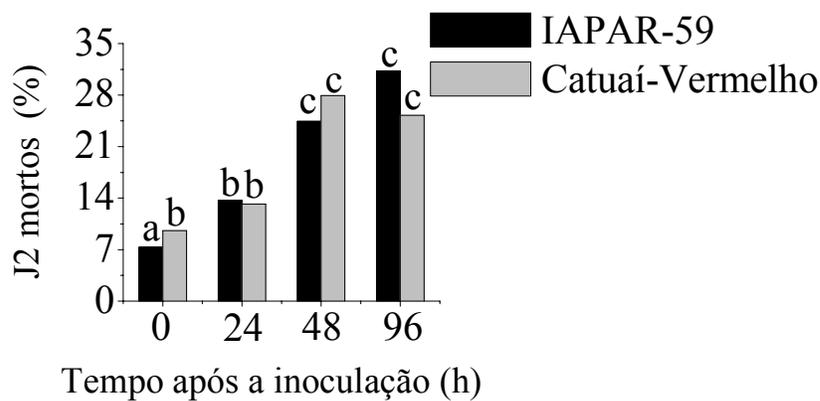


Figura 4 Mortalidade de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne exigua* expostos a extratos das raízes de mudas de cafeeiros resistentes (IAPAR-59) e suscetíveis (Catuaí-Vermelho) a nematóides, que foram inoculadas com *M. exigua* para com eles ficaram em contato durante 0, 24, 48 e 96 h. Barras com a mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott e Knott ($P \leq 0,05$)

6 DISCUSSÃO

Em geral, as plantas resistentes aos nematóides de galhas não impedem a penetração de juvenis de tais parasitas em seus sistemas radiculares, mas afetam o desenvolvimento ou a reprodução do nematóide. Para tanto, acredita-se que em vários casos a presença do nematóide nas raízes desencadeie um processo de defesa da planta, que ocorre através de mudanças nas suas produções metabólicas (ROBERTS, 2002). Tais possíveis alterações parecem em consonância com os resultados obtidos no presente trabalho, já que várias mudanças na produção metabólica das mudas de cafeeiro foram observadas após a inoculação dos J2 de *Meloidogyne exigua* (Figuras, 1 e 2).

Observou-se claramente que, 48 horas após a inoculação do nematóide, a quantidade de fenóis era maior nas mudas de cafeeiro resistente (Figura, 1), o

que sugere que tais substâncias sejam empregadas pela cultivar IAPAR-59 para se defenderem de *M. exigua*. Tal resultado está de acordo com dados da literatura, segundo os quais várias substâncias fenólicas apresentam atividade nematicida (GUPTA et al., 2005; LI et al., 2006). Além disto, sabe-se que algumas plantas resistentes a nematóides aumentam a produção de fenólicos quando inoculadas com tais fitoparasitas (BAJAJ et al., 1983; HUNG; ROHDE, 1973; MAHMOOD; SAXENA, 1986; SHUKLA; SHAKRABORT, 1988).

Os aminoácidos também foram quantificados no presente trabalho porque já havia relatos na literatura sobre a atividade nematicida de algumas substâncias desta classe (BARBOSA et al., 1999; OLIVEIRA et al., 2009; TALAVERA; MIZUKUBO, 2005). Ademais, já era de conhecimento público que plantas de algodão (*Gossypium hirsutum* L.) resistentes a nematóides possuíam quantidade de aminoácidos aproximadamente 50 % superior à observada para plantas suscetíveis quando eram colocadas em contato com J2 de *M. incognita* (LEWIS; MCCLURE, 1975). De fato, observou-se que 48 h após a inoculação do nematóide a planta resistente produziu mais aminoácidos que a suscetível (Figura, 1). No entanto, como tal diferença foi muito pequena, acredita-se não ser possível fazer uma correlação entre a produção de aminoácidos e a resistência de cafeeiros a *M. exigua*.

Como vários alcalóides podem apresentar atividade nematicida (CHITWOOD, 2002), esperava-se que a cultivar resistente produzisse mais de tais substâncias que a suscetível. No entanto, observou-se exatamente o oposto no presente trabalho (Figura, 1), o que talvez esteja correlacionado com a produção de citocininas, que se tratam de substâncias purínicas produzidas por plantas e, também, por nematóides (MEUTTER et al., 2003). Sabe-se que as citocininas estão envolvidas com o sucesso do parasitismo de nematóides, sendo excretadas pelos mesmos para a formação e manutenção dos seus sítios de alimentação na planta (LOHAR et al., 2004). Em trabalho realizado por Dropkin

et al.(1969), constatou-se o desenvolvimento de 73 % dos juvenis do segundo estágio (J2) de *M. incognita* que penetraram nas raízes de uma cultivar de tomateiro suscetível a nematóides, enquanto tal percentagem era de apenas 4 % quando se empregava uma cultivar resistente. Entretanto, quando foram adicionadas as citocininas kinetina, zeatina, adenina ou 6-benziladenina, na concentração de 0,4 μ M, à cultivar resistente, a quantidade de J2 que se desenvolveram subiu para 55 %, indicando que as citocininas favorecem o desenvolvimento dos nematóides. Logo, talvez o mecanismo de resistência da cultivar IAPAR-59 esteja correlacionado com a inibição da produção de citocininas, já que as concentrações de alcalóides nas suas raízes foram menores do que as da cultivar suscetível.

Apesar da grande importância da sacarose como nutriente para diversos organismos (AVIGAD; DEY, 1997; NELSON; COX, 2000), em trabalho recente (OLIVEIRA et al., 2007) se observou que tal carboidrato era uma das substâncias que conferiam atividade contra o nematóide *Meloidogyne exigua* ao extrato dos bulbos de cebola (*Allium cepa*). Tal resultado estava em consonância com o obtido por (SANTIAGO et al., 2005), segundo o qual a sacarose em grânulos diminuiu os números de galhas e de massas de ovos de *Meloidogyne incognita* por sistema radicular de tomateiros. Ademais, reduziu o número de juvenis de tal nematóide no solo. De fato, embora as concentrações de carboidratos tenham sido praticamente as mesmas para ambas as cultivares, a concentração da sacarose nas raízes da cultivar resistente teve um aumento expressivo após a inoculação com *M. exigua* (Figura, 1), o que sugere que tal carboidrato esteja correlacionado com a resistência de plantas de cafeeiro ao nematóide. Além da possível ação direta da sacarose contra o nematóide, vale mencionar que, em altas concentrações, tal dissacarídeo pode bloquear a ação das citocininas (IKEDA et al., 1999), que são importantes para a formação e

manutenção do sítio de alimentação do nematóide na planta (LOHAR et al., 2004).

Recentemente, alguns grupos de pesquisa têm empregado a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) para identificar e quantificar substâncias em misturas complexas. Para tanto, em linhas básicas, comparam-se os espectros das referidas misturas com bibliotecas de espectros de RMN obtidos de substâncias puras, em concentrações conhecidas (WISHART, 2008). Para exemplificar a utilidade da técnica, é possível mencionar o estudo através do qual se observou a influência da infecção de bactérias sobre a biossíntese de fenilpropanóides, alcalóides e ácido clorogênico por *Catharanthus roseus* (CHOI et al., 2004). Outro exemplo consiste no estudo da resistência de *Dendranthema grandiflora* ao inseto *Frankliniella occidentalis*, que possibilitou a identificação do ácido clorogênico como fator de resistência da planta ao inseto (LEISS et al., 2009).

No presente trabalho a espectroscopia de RMN também se mostrou proveitosa, já que permitiu identificar diferenças entre as cultivares de caféiro expostas a *M. exigua*. Verificou-se, por exemplo, que a concentração do ácido fumárico sofreu aumento de 232 % na cultivar resistente, após 24 h de exposição da mesma ao nematóide (Figura, 2). Já na cultivar suscetível, tal aumento só foi observado depois de 96 h da inoculação do nematóide, quando, segundo dados da literatura (KARCZMAREK et al., 2004), o parasita já teria formado o seu sítio de alimentação. Em outras palavras, os resultados obtidos sugerem que o ácido fumárico esteja envolvido com algum mecanismo para impedir que o nematóide possa formar o seu sítio de alimentação. Outra possibilidade a ser considerada, para explicar o aumento na produção do ácido fumárico, é a ação direta desta substância sobre o nematóide, já que estudos realizados por Djian et al. (1994) permitiram verificar a atividade do ácido fumárico frente a *Meloidogyne arenaria*, com CL_{50} de $905 \mu\text{g.mL}^{-1}$. De qualquer forma, a

participação do ácido fumárico na resistência de plantas a fitopatógenos já é conhecida. Para exemplificar é possível citar o estudo realizado por Paranidharan et al. (2008), que observaram o aumento de ácido fumárico nas cultivares de trigo resistentes a *Fusarium graminearum* Schwabe, quando as plantas eram inoculadas com o referido fungo.

Com o uso da RMN também foi possível detectar variações nas concentrações do ácido quínico, que pode ser de grande importância para a resistência de plantas a fitopatógenos (HUKKANEN et al., 2007). Apesar de tal molécula não apresentar toxicidade ao nematóide de galhas (WUYTS et al., 2006), sabe-se que pode aumentar a resistência de tomateiros a *Fusarium oxysporum* (CARRASCO et al. 1978), e inibe o crescimento da lagarta (*Helicoverpa armigera*) do algodoeiro (KIMMINS et al., 1995). No presente trabalho, observaram-se aumentos nas concentrações do ácido quínico para os intervalos de 24 e 48 horas, nas raízes da cultivar resistente (Figura, 2), o que sugere a utilização de tal substância pela planta para evitar a formação do sítio de alimentação do nematóide.

Também foi possível identificar e quantificar o ácido 4-aminobutírico, que está relacionado à resistência de plantas a nematóides por causar paralisia flácida dos músculos destes animais, impedindo a formação do sítio de alimentação (MCLEAN, 2003). De fato, as concentrações deste aminoácido nas raízes da cultivar resistente foram superiores as da cultivar suscetível nos intervalos de 0, 24 e 48 h (Figura, 2), embora a diferença tenha sido pequena.

Dentre as outras substâncias detectadas pelo emprego da RMN, vale destacar o ácido clorogênico que, segundo dados da literatura, pode ser correlacionado à resistência de plantas a nematóides (HUNG; ROHDE, 1973; PEGARD et al., 2005). Embora a sua concentração tenha sofrido um aumento abrupto no intervalo de 96 h, não se observou diferença estatística entre os valores obtidos para as cultivares resistente e suscetível (Figura, 2), o que sugere

o não envolvimento de tal substância no mecanismo de defesa de cafeeiros contra nematóides nas primeiras 96 h após o contato da planta com o parasita.

A análise de PCA dos espectros de RMN ^1H deixou evidente a diferença de produção metabólica das cultivares estudadas. A exceção dos resultados observados para o período de 96 h, que apresentam valores próximos para todas as plantas, todos os outros valores obtidos são bem distintos. Além disto, ficou claro também que o contato com o nematóide acarreta uma grande variação nos metabólitos de ambas as cultivares, o que pode ser atribuído, em parte, às substâncias explicitadas na Figura 2.

O aumento da mortalidade dos nematóides expostos aos extratos das plantas de acordo com o tempo de exposição das mesmas aos J2 de *M. exigua*, sugere que a infecção pelo nematóide provocou acúmulo de substâncias nematicidas nas raízes das plantas de cafeeiro (Figura, 4). No entanto, como não houve diferença estatística entre as plantas resistentes e suscetíveis, aparentemente o principal mecanismo de ação da cultivar IAPAR-59 contra *M. exigua* não se baseia na produção de substâncias nematicidas.

7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos até o presente momento deixam evidente a diferença na produção metabólica de mudas de cafeeiros resistentes e suscetíveis a nematóides, antes e após a exposição das mesmas a J2 de *M. exigua*. Em parte, estas diferenças se devem a maior produção de sacarose, compostos fenólicos, ácido fumárico e ácido quínico, e a menor produção de alcalóides, por parte da cultivar IAPAR-59, nas primeiras 48 h após o contato da planta com o nematóide. É possível que tais alterações estejam associadas ao mecanismo de resistência das plantas a nematóides durante a formação do sítio de alimentação destes animais. Entretanto, não se pode descartar a possibilidade da planta

produzir substâncias que possam agir contra o nematóide mesmo após a formação do seu sítio de alimentação. De qualquer forma, novos estudos deverão ser realizados para averiguar melhor o mecanismo de defesa da cultivar IAPAR-59 contra *M. exigua*.

REFERÊNCIAS

AMARAL, D. R.; OLIVEIRA, F. E. R.; OLIVEIRA, D. F. Purification of two substances from bulbs of onion with nematicidal activity against *Meloidogyne exigua* Goeldi. **Nematology**, Leyden, v. 5, n. 6, p. 859-864, Dec. 2003.

ASSOCIATION OF ANALYTICAL CHEMISTRY. **Official methods of analysis of the AOAC**. Washington: Board, 1960. 111 p.

AVIGAD, G.; DEY, P. M. Carbohydrate metabolism: storage carbohydrates. In: DEY, P. M.; HARBORNE, J. B. (Ed.). **Plant biochemistry**. London: Academic, 1997. p. 143-204.

BAJAJ, K. L.; ARORA, Y. K.; MAHAJAN, R. Biochemical differences in tomato cultivars resistant and susceptible to *Meloidogyne incognita*. **Revue de Nematologie**, Montrouge Cedex, v. 6, n. 1, p. 143-145, 1983.

BARBOSA, L. C. A. et al. Chemical constituents from *Mucuna aterrima* with activity against *Meloidogyne incognita* and *Heterodera glycines*. **Nematropica**, Auburn, v. 29, n. 1, p. 81-88, Feb. 1999.

CAMPOS, H. D.; CAMPOS, V. P.; POZZA, E. A. Efeito do tempo e da temperatura de incubação de juvenis do segundo estágio (J2) no teor de lipídio corporal e no parasitismo de *Meloidogyne javanica* em soja. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 4, p. 387-393, jul. 2006.

CARRASCO, A.; BOUDET, A. M.; MARIGO, G. Enhanced resistance of tomato plants to *Fusarium* by controlled stimulation of their natural phenolic production. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 12, n. 2, p. 225-232, Mar. 1978.

CASTRO, J. M. C. et al. Levantamento de fitonematóides em cafezais do Sul de Minas Gerais. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 1, p. 56-64, jan./fev. 2008.

CAVALCANTI, F. R.; RESENDE, M. L. V.; OLIVEIRA, J. T. Peroxidases ativadas por frações protéicas de extrato biológico eficaz na proteção do tomateiro contra a mancha bacteriana. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 6, p. 46-50, nov. 2007.

- CHITWOOD, D. J. Phytochemical based strategies for nematode control. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 40, p. 221-249, Nov. 2002.
- CHOI, Y. H. et al. Metabolic discrimination of *Catharanthus roseus* leaves infected by phytoplasma using ¹H-NMR spectroscopy and multivariate data analysis. **Plant Physiology**, Rockville, v. 135, n. 4, p. 2398-2410, Aug. 2004.
- DJIAN, C.; PONCHET, M.; CAYROL, J. C. Nematocidal properties of carboxylic acids and derivatives. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 50, n. 3, p. 229-239, Nov. 1994.
- DROPKIN, V. H.; HELGESON, J. P.; UPPER, C. D. The hypersensitivity reaction of tomatoes resistant to *Meloidogyne incognita*: reversal by cytokinins. **Journal of Nematology**, Marceline, v. 1, n. 1, p. 55-61, Jan. 1969.
- DUNN, R. A. Extraction of cysts of *Heterodera* species from soils by centrifugation of high-density solutions. **Journal of Nematology**, Marceline, v. 1, n. 1, p. 7-17, Jan. 1969.
- FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2000. p. 225-258.
- GUNDY, S. D. van. Ecology of meloidogyne spp.: emphases on environmental factors affecting survival and pathogenicity. In: SASSER, J. N.; CARTER, C. C. **An advanced treatise on Meloidogyne**. Raleigh: Academic, 1985. v. 1, p. 177-182.
- GUPTA, R. L.; PRASAD, D.; THUKRAL, R. Quantitative structure activity relationship study for the fungicidal and nematocidal activity of phenols. **Pesticide Research Journal**, New York, v. 17, n. 1, p. 15-20, 2005.
- HUKKANEN, A. T. et al. benzothiadiazole induces the accumulation of phenolics and improves resistance to powdery mildew in strawberries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 55, n. 5, p. 1862-1870, Feb. 2007.
- HUNG, C.; ROHDE, R. A. Phenol accumulation related to resistance in tomato to infection by root-knot and lesion nematodes. **Journal of Nematology**, Marceline, v. 5, n. 4, p. 253-258, Oct. 1973.

HUSSEY, R. S.; BARKER, K. R. A comparison of methods for collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. **Plant Disease Reporter**, Saint Paul, v. 57, n. 12, p. 1025-1028, Dec. 1973.

IKEDA, Y. et al. Sucrose and cytokinin modulation of WPK4, a gene encoding a SNF1-related protein kinase from Wheat1. **Plant Physiology**, Rockville, v. 121, n. 11, p. 813-820, Nov. 1999.

KARCZMAREK, A. et al. Feeding cell development by cyst and root-knot nematodes involves a similar early, local and transient activation of a specific auxin-inducible promoter element. **Molecular Plant Pathology**, Malden, v. 5, n. 4, p. 343-346, June 2004.

KIMMINS, F. M.; PADGHAM, D. E.; STEVENSON, P. C. Growth inhibition of the cotton bollworm (*Helicoverpa armigera*) larvae by caffeoylquinic acids from the wild groundnut, *Arachis paraguariensis*. **Insect Science and its Application**, Elmsford, v. 16, n. 3, p. 363-368, 1995.

KOMBRINK, E.; SCHMELZER, E. The hypersensitive response and its role in local and systemic disease resistance. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 107, n. 1, p. 69-78, Jan. 2001.

LEISS, K. A. et al. Identification of chlorogenic acid as a resistance factor for thrips in *Chrysanthemum*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 150, n. 3, p. 1567-1575, July 2009.

LEWIS, S. A.; MCCLURE, M. A. Free amino acids in roots of infected cotton seedlings resistant and susceptible to *Meloidogyne incognita*. **Journal of Nematology**, Marceline, v. 7, n. 1, p. 10-15, Jan. 1975.

LI, G. et al. The chemical constituents of the fungus *Stereum* sp. **Chemistry & Biodiversity**, Weinheim, v. 3, n. 2, p. 210-216, Feb. 2006.

LOHAR, D. P. et al. Cytokinins play opposite roles in lateral root formation, and nematode and Rhizobial symbioses. **Plant Journal**, Malden, v. 38, n. 2, p. 203-214, Apr. 2004.

MAHMOOD, I.; SAXENA, S. K. Relative susceptibility of different cultivars of tomato to *Rotylenchulus reniformis* in relation to changes in phenolics. **Revue de Nematologie**, Montrouge Cedex, v. 9, p. 89-91, 1986.

MCLEAN, M. D. et al. Overexpression of glutamate decarboxylase in transgenic tobacco plants confers resistance to the northern root: knot nematode.

Molecular Breeding, Dordrecht, v. 11, n. 4, p. 277-285, May 2003.

MEUTTER, J. S. et al. Identification of cytokinins produced by the plant parasitic nematodes *Heterodera schachtii* and *Meloidogyne incogniat*.

Molecular Plant Pathology, Malden, v. 4, n. 4, p. 271-276, Dec. 2003.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. New York: Worth, 2000. 1013 p.

OLIVEIRA, D. F. et al. Activity of amino acids produced by *Paenibacillus Macerans* and from commercial sources against the root-knot nematode *Meloidogyne Exigua*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 124, n. 1, p. 57-63, May 2009.

_____. Atividade de carboidrato purificado a partir da cebola (*Allium cepa* L.) e de carboidratos comerciais sobre juvenis de *Meloidogyne exigua* Goeldi. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 3, p. 202-209, maio/jun. 2007.

PARANIDHARAN, V. et al. Resistance-related metabolites in wheat against *Fusarium graminearum* and the virulence factor deoxynivalenol (DON).

Botany, Ottawa, v. 86, n. 10, p. 1168-1179, Oct. 2008.

PASSOS, L. P. **Métodos analíticos e laboratoriais em fisiologia vegetal**. Coronel Pacheco: EMBRAPA-CNPGL, 1996. 223 p.

PEDRAS, M. et al. The biosynthetic pathway of crucifer phytoalexins and phytoanticipins: de novo incorporation of deuterated tryptophans and quase: natural compounds. **Phytochemistry**, Oxford, v. 70, n. 9, p. 1129-1138, June 2009.

PEDROSA, E. M. R.; HUSSEY, R. S.; BOERMA, H. R. Penetration and post-infectious development and reproduction of *Meloidogyne arenaria* race 1 and 2 on susceptible and resistant soybean genotypes. **Journal of Nematology**, Marceline, v. 28, n. 3, p. 343-351, Sept. 1996.

PEGARD, A. et al. Histological characterization of resistance to different root-knot nematode species related to phenolics accumulation in *Capsicum annuum*.

Phytopathology, Saint Paul, v. 95, n. 2, p. 158-165, Apr. 2005.

ROBERTS, P. A. Concepts and consequences of resistance. In: STARR, J. L.; COOK, R.; BRIDGE, J. (Ed.). **Plant resistance to parasitic nematodes**. London: CAB International, 2002. p. 23-41.

SANTIAGO, D. C. et al. Potential of sucrose and *Pennisetum purpureum* cv. Cameroon Mulch on the management of *Meloidogyne javanica* and *M. incognita*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 48, n. 6, p. 873-883, Nov. 2005.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A. A cluster analyses method for grouping means in the analyses of variance. **Biometrics**, Malden, v. 30, n. 4, p. 502-512, Sept. 1974.

SHUKLA, Y. M.; CHAKRABORTY, M. K. Biochemical studies on response of tobacco and tomato plants to root knot nematode infection. **Tobacco Research**, Oxford, v. 14, n. 1, p. 43-50, 1988.

SILVA, R. V. et al. Incremento na produção de ovos de *Meloidogyne exigua* pela inoculação em plantas de pimentão. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, p. 195, 2006. Suplemento.

SREEVIDYA, N.; MEHROTRA, S. Spectrophotometric method for estimation of alkaloids precipitable with Dragendorff's reagent in plant materials. **Journal of AOAC International**, Gaithersburg, v. 86, n. 6, p. 1124-1127, June 2003.

TALAVERA, M.; MIZUKUBO, T. Effects of DL-methionine on hatching and activity of *Meloidogyne incognita* eggs and juveniles. **Pest Management Science**, Chichester, v. 61, n. 4, p. 413-416, Nov. 2005.

TRUDGILL, D. L.; BLOK, V. C. Apomitic, polyphagous root-knot nematodes: exceptionally successful and demaging biotrophic root pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 39, p. 53-77, Sept. 2001.

WISHART, D. S. Quantitative metabolomics using NMR. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 27, n. 3, p. 228-237, Mar. 2008.

WUYTS, N.; SWENNEN, R.; WAELE, D. Effects of plant phenylpropanoid pathway products and selected terpenoids and alkaloids on the behaviour of the plant-parasitic nematodes *Radopholus similis*, *Pratylenchus penetrans* and *Meloidogyne incognita*. **Nematology**, Leyden, v. 8, n. 1, p. 89-101, Jan. 2006.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Atualmente os métodos de controle de nematóides parasitas de plantas se baseiam no uso de substâncias químicas de altos poder biocida, o que acarreta a contaminação do homem e do meio ambiente com produtos de alta toxicidade. Neste trabalho, foi possível selecionar para o desenvolvimento de novos métodos de controle de nematóides de galhas, as seguintes combinações de substâncias orgânicas voláteis: jasmona + jasmonato de metila, (Z)-hex-3-en-1-ol + (E)-hex-3-en-1-ol + (Z)-hex-2-en-1-ol + (E)-hex-2-enal, acetato de (E)-hex-2-enila + acetato de hexila e de *meso*-butano-2,3-diol + butano-1,2-diol + butano-1,3-diol + butano-1,4-diol, e acetato de linalila + nerolidol, que apresentam baixos custos e toxicidades. Estudos futuros ainda precisam ser realizados para elucidar os mecanismos de ação destas substâncias, avaliar o efeito individual e otimizar a concentração de cada substância.

Além dos estudos com vistas ao desenvolvimento de produtos a base de substâncias orgânicas voláteis, também são de grande importância aqueles que visam elucidar os mecanismos de resistência de plantas aos nematóides de galhas. Eles podem, por exemplo, contribuir para a obtenção de cultivares que, ao mesmo tempo, sejam resistentes a estes patógenos e apresentem produções agrícolas de qualidade e em quantidade equivalente ou superior as das cultivares suscetíveis. Ademais, o estudo da resistência de plantas aos nematóides pode ser uma etapa para o desenvolvimento de novos nematicidas de origem natural. Especificamente neste estudo, verificou-se que a resistência de plantas de cafeeiro (cv. IAPAR-59) a *Meloidogyne exigua* pode estar correlacionada com a maior produção de sacarose, compostos fenólicos, ácido fumárico e ácido quínico e a menor produção de alcalóides, durante a formação do sítio de alimentação destes parasitas. No entanto, há a possibilidade da planta produzir substâncias que possam agir contra o nematóide mesmo após a formação do seu

sítio de alimentação. Assim, novos estudos são necessários para averiguar melhor o mecanismo de defesa da cultivar IAPAR-59 contra *M. exigua*.