



EDUARDO SOUZA FREIRE

**COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS
PRODUZIDOS POR *Fusarium oxysporum* E
OUTROS MICRO-ORGANISMOS NO
CONTROLE DE *Meloidogyne incognita***

LAVRAS – MG

2011

EDUARDO SOUZA FREIRE

COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS PRODUZIDOS POR *Fusarium oxysporum* E OUTROS MICRO-ORGANISMOS NO CONTROLE DE *Meloidogyne incognita*

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de Doutor.

Orientador

Dr. Vicente Paulo Campos

LAVRAS – MG

2010

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

Freire, Eduardo Souza.

Compostos orgânicos voláteis produzidos por *Fusarium oxysporum* e outros micro-organismos no controle de *Meloidogyne incognita* / Eduardo Souza Freire. – Lavras : UFLA, 2010.

81 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2010.

Orientador: Vicente Paulo Campos.

Bibliografia.

1. Café. 2. Nematóide. 3. Controle biológico. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 633.73996

EDUARDO SOUZA FREIRE

COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS PRODUZIDOS POR *Fusarium oxysporum* E OUTROS MICRO-ORGANISMOS NO CONTROLE DE *Meloidogyne incognita*

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 22 de dezembro de 2010.

Dr. Mário Sobral de Abreu	UFLA
Dr. Paulo Estevão de Souza	UFLA
Dr. Rovilson José de Souza	UFLA
Dr. José Mauro da Cunha e Castro	EMBRAPA

Dr. Vicente Paulo Campos
Orientador

LAVRAS – MG
2010

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras pela valiosa oportunidade.

Ao Departamento de Fitopatologia desta mesma universidade, em especial à Profa. Antônia dos Reis Figueira, pelo apoio e oportunidade conferida.

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

Ao orientador Prof. Vicente Paulo Campos, pela imensa dedicação e confiança conferida ao longo de todos os anos de convivência. Todos os êxitos obtidos na vida universitária devo à sua nobre pessoa.

Às estagiárias Amanda Goulart, Emanuela, Fernanda Abreu, Luana Torquete e Márcia Oliveira. De forma especial, agradeço às guerreiras Marina de Resende Faria e Luma Alaís Pedroso pelo companheirismo, apoio e amizade.

À Renata Canuto de Pinho e Tarlei Luiz de Paula por transformarem a convivência em um hino de amizade sincera e generosa.

Aos grandes amigos e companheiros do Laboratório de Nematologia: Alex Botelho, Cléber Maximiniano, Davi do Carmo, Lilian Abreu, Maria Clara Carli e William Terra.

À família do coração, Daniel, Ivany e Hugo, por me acolherem. Eu invadi a casa; vocês, o meu coração.

Aos meus pais Edilço Souza Freire e Paula de Oliveira Freire, meu irmão, Evandro Souza Freire, à minha cunhada, Lucilva Pereira da Silva e à minha sobrinha, Ellen Silva Freire, minha gratidão eterna.

A todos os meus amigos de Lavras, em especial, Tullio Pádua e Silvana Pádua: Deus lhes pague.

Ao Dr. Augusto José Silva, pelo constante amparo.

RESUMO

Os micro-organismos produzem compostos orgânicos voláteis (COV) que são mediadores das interações com outros organismos e podem ser a base para o desenvolvimento de novos métodos para o controle de nematoides parasitas do cafeeiro. No presente trabalho, 35 isolados fúngicos foram inicialmente identificados após serem isolados da rizosfera do cafeeiro, a partir de ovos e massas de ovos de *Meloidogyne exigua*. A maioria dos fungos isolados pertencia ao gênero *Fusarium*. Em testes *in vitro*, estes fungos apresentaram antagonismo e foram classificados como causadores de exclusão mútua e parasitismo contra o fungo predador de nematoides *Arthrobotrys conoides* (isolado de raízes de café). Este resultado e a forte atividade dos COVs contra este fungo, também observada em 12 bactérias endofíticas, podem ser responsáveis pelo fracasso de *A. conoides* em reduzir fitonematoídeos em cafezais. COVs de 13 isolados fúngicos causaram mais de 40% de imobilidade aos juvenis de segundo estágio (J₂) de *M. incognita*, e outros três isolados (dois isolados de *Fusarium oxysporum* (FO) e um de *F. solani*) causaram a mortalidade de J₂, que variou de 88 a 96%. A infectividade de J₂ de *M. incognita* diminuiu em função do aumento do tempo de exposição aos COVs de *F. oxysporum* isolado 21. A análise de cromatografia gasosa-espectrometria de massa (CG-EM) detectou 46 COVs produzidos por culturas de *F. oxysporum* is. 21. Em outro trabalho, a toxicidade de COVs dos isolados 3, 13 e 21 foi testada em ovos e J₂ de *M. incognita*. Os três isolados produziram COVs, que reduziram a eclosão e a mobilidade, mas que aumentaram a mortalidade de J₂. A intensidade de redução da eclosão foi maior em quatro dias de exposição dos ovos aos COVs e também após quatro dias de crescimento de colônias dos isolados de FO. A imobilidade dos J₂ chegou a 80% quando foram expostos aos COVs dos três isolados de FO no intervalo de 0 a 2 dias de crescimento da colônia. No mesmo período, a mortalidade de J₂ foi de 25 a 60% entre os três isolados e continuou a crescer até ao final do ensaio (8 dias).

Palavras-chave: Nematóide de galhas. Cafeeiro. Fungos de solo. Controle biológico.

ABSTRACT

Microorganisms produce volatile organic compounds (VOC) which mediate interactions with other organisms and may be the basis for the development of new methods for control of plant-parasitic nematodes of coffee plants. In the present work, 35 fungal isolates were initially identified after their isolation from coffee plant rhizosphere and *Meloidogyne exigua* eggs and egg masses. Most of the fungal isolated belonged to the genus *Fusarium* and presented *in vitro* antagonism classified as mutual exclusion and parasitism against the nematode-predator fungus *Arthrobotrys conoides* (isolated from coffee roots). These results and the stronger activity of VOC against this fungus by 12 endophytic bacteria may account for the failure of *A. conoides* to reduce plant-parasitic nematodes in coffee fields. VOC from 13 fungal isolates has caused more than 40% immobility to *Meloidogyne incognita* second stage juveniles (J₂), and those of three isolates (two *Fusarium oxysporum* isolates and one *F. solani* isolate) also led to 88-96% J₂ mortality. *Meloidogyne incognita* J₂ the infectivity decreased as a function of increased exposure time to *F. oxysporum* isolate 21 VOC. Gas chromatography-mass spectrometric (GC-MS) analysis lead to the detection of 46 VOC substances produced by *F. oxysporum* is. 21 cultures. In another work, VOCs of three *F. oxysporum* (FO) isolates (isolates 3, 13 e 21) were tested on eggs and *M. incognita* J₂ toxicity. All the three isolates produced VOCs which reduced egg hatching and J₂ mobility, and increased J₂ mortality, when they were exposed to volatiles. The hatching reduction intensity was higher at four days of eggs exposure to VOCs and also after four days of colony growth of FO isolates. The J₂ immobility exposed to the three FO isolate VOCs reached to 80% at the 0-2 days colony growth interval. At the same interval, the J₂ mortality was 25 to 60% among the three isolates and continues until the end of the assay (8-days-FO growth).

Keywords: Root-knot nematode. Coffee. Soil fungi. Biological control.

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	
1	INTRODUÇÃO	08
2	REFERENCIAL TEÓRICO	08
2.1	A cultura do café e os nematoides.....	10
2.2	Controle biológico de nematoides por fungos.....	11
2.3	Compostos Orgânicos Voláteis e as técnicas empregadas para o seu estudo (COV).....	14
3	CONSIDERAÇÕES GERAIS	21
	REFERÊNCIAS	22
	SEGUNDA PARTE – ARTIGOS	30
	ARTIGO 1 Volatile substances produced by <i>Fusarium oxysporum</i> from coffee rhizosphere against <i>Meloidogyne incognita</i> and <i>Arthrobotrys conoides</i>	30
	ARTIGO 2 Efeito de compostos orgânicos voláteis produzidos pelo fungo <i>Fusarium oxysporum</i> da rizosfera cafeeira em ovos e juvenis de segundo estágio de <i>Meloidogyne incognita</i>	58

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

A cultura do cafeeiro ocupa posição de destaque na economia agrícola do Brasil. Contudo, sofre grandes dificuldades com o ataque de pragas e doenças (ALMEIDA, 1986). Dentre os patógenos, os fitonematoides podem causar perdas em até 30% (LORDELLO et al., 1990), sendo o *Meloidogyne exigua*, uma das espécies mais prejudiciais a esta cultura. O controle desse fitoparasita é difícil, pois métodos isolados não apresentam bons resultados. Com isso, em várias pesquisas buscam-se a associação de táticas, incluindo os alternativos para o manejo de fitonematoides (BURG; MYER, 1998).

A atual pressão mundial, pelo aumento da disponibilidade de produtos agrícolas sem resíduos de defensivos, tem incentivado o uso de táticas alternativas de controle de fitopatógenos. Neste contexto, no controle biológico, não se utilizam produtos tóxicos ao homem e ao meio ambiente. Já está disponível para o produtor o emprego de micro-organismos benéficos, via tratamento de semente ou por alterações no solo, resultando no aumento da produtividade ou da defesa da planta (BETTIOL; GHINI, 2005).

Produtos à base de compostos orgânicos voláteis (COVs) poderão constituir-se em método alternativo de controle de fitonematoides no futuro. Na atualidade, a maioria dos estudos sobre a produção de COVs tem se concentrado na produção de tais substâncias pelas plantas (KESSELMEIER; STAUDT, 1999). Segundo Knudsen e Gershenson (2006), as plantas podem produzir mais de 1700 COVs diferentes. Também, há produção de COVs no solo, principalmente por bactérias e fungos (ISIDOROV; JDANOVA, 2002; LEFT; FIERER, 2008). Por ser muito comum em diferentes solos, o fungo *Fusarium oxysporum* vem sendo estudado quanto às interações com outros micro-

organismos no solo, juntamente com a produção de COVs (ALABOUVETTE, 1999; MINERDI et al., 2009). Contudo, ainda não foi estudada a sua possível capacidade de produzir COVs com atividades nematicidas a ovos e juvenis do segundo estágio (J₂) de *Meloidogyne* spp. Da mesma forma, esta capacidade ainda não foi avaliada para outros fungos presentes na rizosfera das plantas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A cultura do café e os nematoides

O Brasil é o maior produtor mundial de café. Desde sua chegada ao país, em 1727, o café foi o maior gerador de riquezas e o produto mais importante da história nacional. Hoje, o café continua sendo um importante gerador de divisas, sendo que o Brasil é responsável pela maior produção mundial, com safra estimada para 2010/2011 de 47,2 milhões de sacas (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2010).

Como toda grande cultura, a produção do café enfrenta sérios problemas com pragas e doenças, dentre elas os nematoides de galhas. Uma das mais antigas publicações a respeito do nematoide de galhas ocorreu por volta de 1887, por Göldi. Nessa ocasião, foi estudado, durante dez anos, galhas em raízes de cafeeiros, criando-se o termo genérico *Meloidogyne* e, posteriormente, o binômio típico da espécie *Meloidogyne exigua*.

Os nematoides associados ao cafeeiro compreendem um grupo numeroso de espécies, destacando-se o gênero *Meloidogyne*, cujas espécies são as mais disseminadas e vêm causando maiores danos à cafeicultura brasileira. Das 14 espécies de *Meloidogyne* que parasitam o cafeeiro nas diversas regiões produtoras de café do mundo, seis ocorrem no Brasil. Dessas, *M. exigua*, *M. incognita* e *M. paranaensis* são as espécies mais associadas a lavouras cafeeiras do Brasil (CAMPOS; VILLAIN, 2005). A espécie *M. exigua* se acha amplamente disseminada na cafeicultura brasileira, mesmo nas regiões emergentes e promissoras, como Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba em Minas Gerais (CAMPOS; VILLAIN, 2005). Esse nematoide causa galhas, o sistema radicular se apresenta fendilhado e muito reduzido. Na parte aérea, observa-se clorose e queda prematura das folhas. Os sintomas são mais intensos em épocas

de seca, quando a falta de água e o comprometimento do sistema radicular prejudicam o desenvolvimento da planta.

A severidade da infecção ocorre de forma mais intensa em lavouras formadas em solo arenoso, degradado por manejo incorreto e com baixos teores de matéria orgânica (ZAMBOLIM; VALE, 2003). Os nematoides do cafeeiro são de difícil controle e, por se tratar de cultura perene, é praticamente impossível erradicar o patógeno de uma área contaminada. O importante é manter a população reduzida, abaixo do nível de dano econômico. O uso de cultivares resistentes a *M. exigua*, obtidas por cruzamento com *Coffea canephora*, aliado ao fato da utilização de mudas saudáveis para a instalação da lavoura cafeeira, estão entre as principais táticas de manejo da doença (MOURA, 1996).

O controle químico também pode ser empregado para a redução do nível populacional de nematoides, recomendando-se o uso de nematicidas sistêmicos granulados ou de contato (organo-fosforados e organo-carbamatos). O uso de produtos químicos no controle de nematoides deve considerar sempre a relação custo/benefício (produtos caros) e o impacto ambiental desses produtos que são altamente tóxicos (CAMPOS; CAMPOS, 1997).

Com a busca cada vez mais intensificada por alimentos produzidos de forma ecologicamente correta, novas formas de controle de doenças vêm surgindo, como é o caso do controle biológico, que parte do princípio de controlar um organismo patogênico com o uso de organismo antagonista.

2.2 Controle biológico de nematoides por fungos

Existem mais de 200 diferentes organismos que são considerados inimigos naturais de fitonemátodes como fungos, bactérias e nematoides predadores (KERRY, 1990). Dentre esses inúmeros inimigos naturais, apenas

algumas espécies de fungos e bactérias apresentam potencial para serem usados como agentes de controle biológico (CAMPOS; SOUZA; SOUZA, 1998; SOUZA; CAMPOS, 1998).

Os fungos são bastante promissores para o controle biológico (FERRAZ et al., 1992), pois ocorrem abundantemente no solo, podem utilizar vários substratos orgânicos e micro-habitats, que promove inúmeras oportunidades de interagirem com os nematoides (STIRLING, 1991). Dentre estes fungos, existem os nematófagos, cuja ação consiste em infectar e se alimentar de nematoides (PIMENTEL; PEIXOTO; PAZ, 2009). Os fungos nematófagos compreendem três grupos distintos: os parasitas de ovos, os endoparasitas e os predadores. Os grupos mais pesquisados e com maior potencial de biocontrole são os fungos predadores e os parasitas de ovos (JATALA, 1986; NORDBRIGHERTZ; JANSSON; TUNLID, 2002). Atualmente são conhecidas mais de 140 espécies de fungos nematófagos, sendo que os principais gêneros relatados são *Monacrosporium*, *Arthrobotrys*, *Fusarium*, *Pochonia*, *Dactylella*, *Paecilomyces*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Curvularia*, entre outros (PIMENTEL; PEIXOTO; PAZ, 2009).

2.2.1 Fungos parasitas de ovos

Verdejo-Lucas et al. (2002) isolaram diversos fungos associados ao parasitismo de ovos de nematoides em Almeria e Barcelona (Espanha), como: *Pochonia chlamydosporia*, *Verticillium catenulatum*, *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *Acremonium strictum*, *Gliocladium roseum*, *Cylindrocarpon* spp., *Engiodontium album* e *Dactylella oviparasitica*.

Pochonia chlamydosporia se destaca por ser capaz de parasitar ovos de nematoides e possuir a capacidade de sobreviver saprofiticamente no solo, característica desejável a um bom agente de controle biológico. Campos e

Campos (1997) verificaram que *P. chlamydosporia* reduziu o número de juvenis de segundo estágio (J_2), o número de ovos e a população total de *M. exigua*, quando comparado com a testemunha que recebeu apenas a inoculação com o nematoide. Ribeiro e Campos (1993) observaram o controle de *M. javanica* em tomateiro por meio da inoculação dos fungos *G. roseum*, *Paecilomyces lilacinus*, *Scybalidium* sp. e *V. chlamydosporium*. Freire e Bridge (1985) observaram que mais de 50% dos ovos de *M. incognita* foram infectados pelo fungo nematófago *P. lilacinus*. Stirling e Mankau (1979) descreveram o fungo *D. oviparasitica* como sendo eficiente no parasitismo de ovos de *Meloidogyne* spp., *Acrobeloides* sp., *Heterodera schachtii* e *Tylenchulus semipenetrans*.

2.2.2 Fungos predadores

No Brasil, a ocorrência de fungos predadores de nematoides tem sido constatada por diversos autores (FERRAZ et al., 1992; SANTOS, 1991), sendo que os principais gêneros são *Arthrobotrys* e *Monacrosporium*. Essas espécies se utilizam de redes ou nódulos adesivos tridimensionais que aprisionam, infectam e colonizam o nematoide. Para a apreensão dos nematoides, os fungos nematófagos têm de atraí-los junto às suas estruturas de captura, onde serão produzidas substâncias hidrolíticas que ajudam na imobilização do nematoide. Após a infecção, o nematoide será tomado por hifas, ocasionando a sua morte (PIMENTEL; PEIXOTO; PAZ, 2009).

Belder, Jansen e Donkers (1996) estudaram a interação entre J_2 de *M. hapla* e *A. oligospora*, observando que as hifas do fungo foram capazes de infectar os J_2 . Oliveira, Ferraz e Dias-Arieira (2003), estudando a predação *in vitro* de *M. javanica* e *M. incognita* por diferentes isolados de *Arthrobotrys* spp., verificaram que poucos isolados capturaram, em uma taxa superior a 50%

2.2.3 Fungos antagonistas

Os fungos antagonistas, com potencial de produção de metabólitos voláteis, são importantes no desenvolvimento de novos métodos de controle de fitonematoides, pois esses compostos podem atuar interferindo nas respostas sensoriais dos nematoides, fator indispensável em algumas fases do ciclo de vida como atração e a migração em direção ao hospedeiro (SILVA; SOUZA; CUTRIM, 2002). A maioria dos isolados de *Trichoderma* sp. produz metabólitos tóxicos voláteis e não voláteis que impedem a colonização por microorganismos antagonistas. Sendo assim, a gama de compostos produzidos permite que *Trichoderma* sp. exerça antagonismo mais eficiente abrangendo maior quantidade de espécies de fungos e nematoides patogênicos quando comparado a outros fungos utilizados em controle biológico (SANTIN, 2008). Riga, Lacey e Guerra (2008) constataram, pela primeira vez, que compostos voláteis produzidos por fungos controlam fitonematoides. Tem-se relatado que voláteis desempenham um papel vital no reconhecimento entre nematoides entomopatogênicos e seus hospedeiros (LEWIS et al., 2006).

2.3 Compostos Orgânicos Voláteis (COVs) e as técnicas empregadas para o seu estudo

Em decorrência de à sua natureza, os voláteis desses compostos devem ser estudados em ambientes fechados. Uma forma muito comum é a utilização de placas de Petri compartimentadas. Para testar a atividade nematicida da rizobactéria *Bacillus megaterium* contra *M. incognita*, Huang et al. (2010) usaram placas de Petri com três divisões, onde foram distribuídas a suspensão bacteriana, ovos e juvenis do nematoide. Já Chuankun et al. (2004), para explicar a importância dos compostos voláteis na fungistase que ocorre na maioria dos solos, sobrepuseram duas placas de Petri, apenas com as partes

inferiores e selaram-nas com Parafilm®. Na parte inferior foi adicionado solo e, na superior, o meio ágar-água (AA) com uma suspensão de esporos. De forma semelhante, Bruce et al. (2003) cultivaram micro-organismos em placas de Petri separadas. As bases em que os micro-organismos foram cultivados foram sobrepostas, seladas e incubadas. Riga, Lacey e Guerra (2008) usaram uma câmara de fibra de vidro especial, hermeticamente fechada e equipada com um ventilador. Nela, os nematoides ficaram expostos aos COVs produzidos por *Muscodor albus*.

Para a análise das moléculas dos COVs produzidos por micro-organismos, é muito comum a utilização da técnica de microextração por fase sólida (Headspace Solid Phase Microextraction- HS-SPME) (Figura 1). Essa técnica tem como vantagens a rapidez no processo de análise e a sensibilidade. Junto com o HS-SPME, utiliza-se a cromatografia gasosa (CG). Nesse processo, o filtrado do micro-organismo é colocado em frascos de vidro esterilizados com tampa plástica rosqueada e revestida internamente por uma película em silicone ligando a tampa ao frasco, possibilitando total vedação. Um bastão de fibra ótica é acoplado a uma espécie de seringa, que perfura a película de silicone, ficando exposto à atmosfera do frasco. Após o reconhecimento do COV, o bastão é retirado e inserido no injetor do cromatógrafo, onde os compostos serão termicamente dissorvidos sob fluxo do gás de arraste e carregados para a coluna cromatográfica.

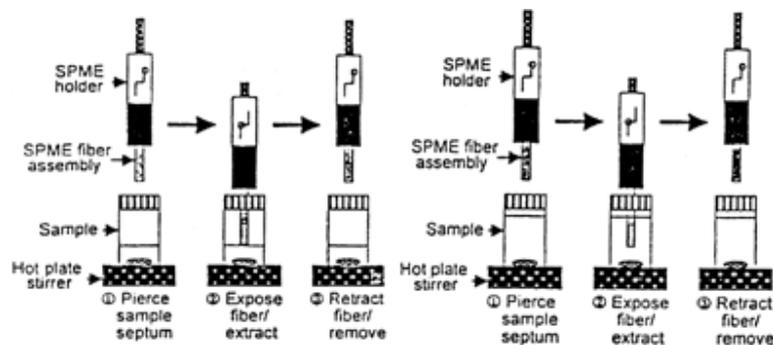


Figura 1 Headspace e a imersão direta do SPME

2.3.1 Controle de fitopatógenos por compostos orgânicos voláteis (COVs) produzidos por fungos

Os efeitos inibitórios de COVs de origem fúngica contra outros micro-organismos são de grande interesse na aplicabilidade como controle biológico. A exposição aos COVs pode inibir a germinação de esporos em um grande número de espécies fúngicas (ROBINSON; MCKEE; THOMPSON, 1989). Por outro lado, a germinação de esporos micorrízicos pode ser estimulada por COVs produzidos por *Streptomyces orientalis* (TYLKA; HUSSEY; RONCADORI, 1991).

2.3.1.1 Atividade fungicida de COVs provenientes de isolados fúngicos

Muitas espécies fúngicas são conhecidas por produzir diferentes concentrações de COVs. Essa produção estará diretamente ligada à disponibilidade de nutrientes, temperatura adequada e fase de crescimento. *Muscodor albus*, um fungo endofítico, produz uma mistura de COVs que inibe efetivamente e mata ampla gama de micro-organismos (EZRA; STROBEL, 2003; RIGA; LACEY; GUERRA, 2008). COVs produzidos por *M. albus* devem ser considerados como potenciais agentes para o tratamento e controle de

patógenos de frutos na pós-colheita (SCHNABEL; MERCIER, 2006). A diversidade de COVs produzidos por *M. albus* pode pertencer a cinco classes químicas: alcoóis, ésteres, cetonas, ácidos e lipídios, que apresentam baixa toxicidade para mamíferos e plantas superiores (O'NEIL et al., 2001; STROBEL et al., 2001). Algumas dessas substâncias voláteis são comuns a muitos fungos, enquanto outras parecem ser exclusivas para determinadas espécies (RAPIOR; FONS; BESSIERE, 2000; SCHNURER; OLSSON; STROBEL, 2001). Quando em meios ricos em sacarose, os níveis de COVs produzidos por *M. albus* podem aumentar em 50% ou mais, potencializando seu efeito inibitório e a capacidade de matar organismos (EZRA; STROBEL, 2003). Outro fungo com grande potencial na produção de COVs é o saprófita *Trichoderma* spp.. Santin (2008) em ensaio com metabólitos voláteis, em que o método consistiu em posicionar placas de Petri sobrepostas, totalmente vedadas. *Trichoderma harzianum* reduziu o crescimento de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*.

2.3.1.2 Interações competitivas entre isolados patogênicos e não patogênicos de *Fusarium oxysporum* no solo e rizosfera

O *Fusarium oxysporum* está comumente presente nas comunidades fúngicas, em solos submetidos a diferentes condições climáticas (BURGESS; NELSON; SUMMERELL, 1989). Essa espécie também é considerada um componente normal das comunidades de fungos na rizosfera de plantas (GORDON; MARTYN, 1997). Alguns isolados de *F. oxysporum* são patogênicos a diferentes espécies vegetais, penetrando nas raízes causando apodrecimento, quando invadem o sistema vascular (LINS; COELHO, 2004). Muitos outros isolados podem penetrar as raízes, mas não são capazes de invadir o sistema vascular e causar doença (OLIVAIN; ALABOUVETTE, 1997).

Para a utilização de um isolado fúngico, como agente de controle biológico, é fundamental que ele seja capaz de se estabelecer no solo e na rizosfera das plantas, permitindo sua funcionalidade (ALABOUVETTE et al., 2007). Existem pesquisas nas quais se buscam o controle da murcha de Fusarium, utilizando isolados não patogênicos de *F. oxysporum* que consigam se estabelecer no solo, mesmo diante de interações com outros micro-organismos. *F. oxysporum* estirpe MSA 35, isolado de solo supressivo à murcha de fusarium na Itália, reduziu a severidade da fusariose em sementes de alface comparável às fornecidas pelos fungicidas testados (GILARDI et al., 2005).

A competição por nutrientes, principalmente carbono e ferro, tem demonstrado ser um dos mecanismos pelos quais os solos supressivos controlam murcha de Fusarium (ALABOUVETTE, 1999). Louvet, Rouxel e Alabouvette (1976) constataram que, em solo supressivo contendo isolados patogênicos e não patogênicos de *F. oxysporum*, ao adicionar glicose, o solo se tornou propício ao aparecimento da doença. Nagao, Couteaudier e Alabouvette (1990) observaram que não houve correlação entre a densidade populacional de isolados de biocontrole de *F. oxysporum* e *F. solani*, quando colocados em solo tratado termicamente. Assim, se a competição por nutrientes, principalmente carbono, é um modo de ação dos isolados utilizados em biocontrole de *F. oxysporum*, não é o único mecanismo de ação (ALABOUVETTE et al., 2007). O mesmo pode ser dito quanto à colonização de raízes, pois Bao e Lazarovitz (2001), usando isolados patogênicos e de biocontrole, ambos colonizaram a superfície da raiz de tomateiro, penetraram nas células epidérmicas e colonizaram as camadas superiores das células corticais. Estudos com solos supressivos sugerem que o controle biológico também pode ser conseguido por meio do aumento do nível de supressividade natural que existe em cada solo (ALABOUVETTE et al., 2007). Outro modo de ação, apenas explorado recentemente, é a produção de COVs por *F. oxysporum*. A produção de COV por *F. oxysporum* isolado MSA

35 modificou e reduziu o crescimento micelial, além de inibir a expressão do gene de virulência de isolados patogênicos de *Fusarium* (MINERDI et al., 2009).

2.3.1.3 Atividade nematicida de COVs provenientes de isolados fúngicos

Riga, Lacey e Guerra (2008), testando COV produzido pelo fungo *M. albus*, constataram, em testes *in vitro*, mortalidade de *Paratrichodorus allius*, *Pratylenchus penetrans* e *M. chitwoodi* variando de 82% a 95%, e redução de quase 70% de J₂ de *M. hapla*. Em outro ensaio, uma formulação de *M. albus* foi misturada ao solo, adicionou-se inóculo de nematoides e o recipiente plástico foi fechado hermeticamente. Sete dias após, uma muda de tabaco ou feijão foi plantada em cada vaso. As populações de *P. allius*, *P. penetrans*, *M. chitwood* e *M. hapla* foram reduzidas entre 85% e 100% nas raízes e, no solo, a redução variou entre 56% e 100%. Assim, os COVs de *M. albus* demonstraram propriedades nematostática e nematicida.

2.3.2 Substâncias solúveis em água

Pesquisas com filtrados de culturas fúngicas cresceram consideravelmente, nos últimos anos. Este progresso se deve, basicamente, ao grande número de toxinas produzidas e ao seu potencial para criação de novos produtos. Entre os isolados fúngicos que possuem alta atividade nematicida, destaca-se *Beauveria bassiana*. Em testes *in vitro*, Liu et al. (2007) observaram que quanto maior a concentração do filtrado de *B. bassiana*, maior foi o percentual de mortalidade de J₂ e inibição da eclosão de ovos de *M. hapla*. Já em experimento em casa-de-vegetação com plantas de tomateiro, obteve-se redução da densidade populacional no solo e na raiz, na formação de galhas e produção

de massa de ovos de *M. hapla*. Mwaura et al. (2010) observaram que filtrados de cultura de *F. oxysporum* provocaram, em média, 70% de mortalidade em *P. goodeyi*.

3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Apesar da expansão dos estudos envolvendo fungos produtores de COVs e o grande potencial que apresentam para uso no controle de fitonematoides, ainda existem lacunas com as suas interações com outros micro-organismos. Considerando todos os grupos de fitopatógenos, são reduzidas as pesquisas envolvendo os COVs fúngicos a nematoides de importância econômica.

No contexto do direcionamento das pesquisas, deve-se explorar o potencial dos micro-organismos isolados e identificados e seus COVs no controle dos fitonematoides tanto em casas de vegetação quanto em testes de campo. Ênfase deve ser dada à utilização de fungos em combinação com outros métodos de biocontrole. Na constatação de que micro-organismos antagonísticos ao principal agente fúngico de biocontrole de nematóides ocorrem no campo, vislumbra-se a necessidade de pesquisas futuras sobre a associação de táticas, além da definição de métodos para eliminar ou modificar a população antagonística antes da introdução do agente de biocontrole.

Pesquisas envolvendo os COVs no controle de fitopatógenos ainda estão no início. Avanços podem ser alcançados na obtenção de nematicidas voláteis com grandes vantagens para o produtor como menor efeito residual, baixa toxicidade ao homem e ao ambiente e viabilidade financeira na sua produção.

REFERÊNCIAS

ALABOUVETTE, C. et al. Using strains of *Fusarium oxysporum* to control *Fusarium* wilts: dream or reality? In: VURRO, M.; GRESSEL, J. (Ed.). **Novel biotechnology for biocontrol agent enhancement and management**. Berlin: Softcover, 2007. p. 157-177.

ALABOUVETTE, C. *Fusarium* wilt suppressive soils: an example of disease suppressive soil. **Australasia Plant Pathology**, Collingwood, v. 28, p. 57-64, Apr. 1999.

ALMEIDA, S. R. Doenças do cafeeiro. In: RENA, A. B. et al. **Cultura do cafeeiro: fatores que afetam a produtividade**. Piracicaba: Instituto do Potássio e Fósforo, 1986. p. 391-399.

BAO, J. R.; LAZAROVITZ, G. Differential colonization of tomato roots by nonpathogenic and pathogenic *Fusarium oxysporum* strains may influence *Fusarium* wilt control. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 91, p. 449-456, May 2001.

BELDER, E. D.; JANSEN, E.; DONKERS, J. Adhesive hypha of *Arthrobotrys oligospora*: an ultra structural study. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 102, n. 5, p. 471-478, July 1996.

BETTIOL, W.; GHINI, R. Solos supressivos. In: MICHEREFF, F. et al. **Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais**. Recife: UFRPE, 2005. p. 125-152.

BRUCE, A. et al. Effect of volatiles from bacteria and yeast on the growth and pigmentation of sap stain fungi. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Birmingham, v. 51, p. 101-108, Mar. 2003.

BURG, I. C.; MYER, P. H. **Manual de alternativas ecológicas para prevenção e controle de pragas e doenças**. Francisco Beltrão: Grafit, 1998. 153 p.

BURGESS, L. W.; NELSON, P. E.; SUMMERELL, B. A. Variability and stability of morphological characters of *Fusarium oxysporum* isolated from soils in Australia. **Mycological Research**, London, v. 96, p. 780–84, Nov. 1989.

CAMPOS, H. D.; CAMPOS, V. P. Efeito da época e forma de aplicação dos fungos *Arthrobotrys conoides*, *A. musiformis*, *Paecilomyces lilacinus* e *Verticillium chlamydosporium* no controle de *Meloidogyne exigua* em cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 22, p. 361-365, set. 1997.

CAMPOS, V. P.; SOUZA, J. T.; SOUZA R. M. Controle de fitonematoides por meio de bactérias. In: LUZ, W. C. (Ed.). **Revisão anual de patologia de plantas**. Passo Fundo: Ediluz, 1998. p. 285-327.

CAMPOS, V. P.; VILLAIN, L. Nematode parasites of coffee and cocoa. In: LUC, M.; SIKORA, R. A.; BRIDGE, J. (Org.). **Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture**. London: CAB International, 2005. p. 529-579.

CHUANKUN, X. et al. Soil volatile fungistasis and volatile fungistatic compounds. **Soil Biology Biochemistry**, Elmsford, v. 36, p. 1997-2004, Dec. 2004.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Disponível em: <<http://www.redebomdia.com.br/Noticias/Economia/30285/Producao+de+cafe+em+2010+deve+ser+quase+20%25+maior+do+que+a+do+ano+passado>>. Acesso em: 21 out. 2010.

EZRA, D.; STROBEL, G. A. Effect of substrate on the bioactivity of volatile antimicrobials produced by *Muscodor albus*. **Plant Science**, Shannon, v. 165, p. 1229-1238, Dec. 2003.

FERRAZ, S. et al. Detecção, isolamento, identificação e avaliação *in vitro* da capacidade predatória de fungos nematófagos de solos brasileiros. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 16, p. 85-86, ago. 1992.

FREIRE, F. C. O.; BRIDGE, J. Parasitism of eggs, females and juveniles of *Meloidogyne incognita* by *Paecilomyces lilacinus* and *Verticillium chlamydosporium*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 10, p. 577-596, Mar. 1985.

GILARDI, G. et al. Seed dressing to control *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*. **Journal of Plant Diseases and Protection**, Grugliasco, v. 112, p. 240-246, May 2005.

GORDON, T. R.; MARTYN, R. D. The evolutionary biology of *Fusarium oxysporum*. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 35, p. 111-128, Sept. 1997.

HUANG, Y. et al. Characterization of volatiles produced from *Bacillus megaterium* YFM 3.25 and their nematicidal activity against *Meloidogyne incognita*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 126, p. 417-422, Jan. 2010.

ISIDOROV, V.; JDANOVA, M. Volatile organic compounds from leaves litter. **Chemosphere**, Davis, v. 48, p. 975-979, Sept. 2002.

JATALA, P. Biological control of plant-parasitic nematodes. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 24, p. 453-489, Sept. 1986.

KERRY, B. R. An assessment of progress toward microbial control of plant parasitic nematodes. **Journal of Nematology**, Lakeland, v. 22, p. 621-631, Oct. 1990.

KESSELMEIER, J.; STAUDT, M. Biogenic volatile organic compounds (VOC): an overview on emission, physiology and ecology. **Journal of Atmospheric Chemistry**, New York, v. 33, n. 1, p. 23-88, May 1999.

KNUDSEN, J. T.; GERSHENZON, J. The chemistry diversity of floral scent. In: DUDAREVA, N.; PICHERSKY, E. (Ed.). **Biology of floral scent**. Boca Raton: CRC, 2006. p. 27-52.

LEFT, J. W.; FIERER, N. Volatile organic compound (VOC) emissions from soil and litter samples. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 40, n. 7, p. 1629-1636, July 2008.

LEWIS, E. E. et al. Behavioral ecology of entomopathogenic nematodes. **Biological Control**, London, v. 38, p. 66-79, July 2006.

LINS, S. R. O.; COELHO, R. S. B. Ocorrência de doenças em plantas ornamentais tropicais no Estado de Pernambuco. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, p. 332-335, maio/jun. 2004.

LIU, T. et al. Nematicidal activity of culture filtrate of *Beauveria bassiana* against *Meloidogyne hapla*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, London, v. 24, p. 113-118, Aug. 2007.

LORDELLO, R. R. A. et al. Plantio de cafezal em área infestada por *Meloidogyne exigua*. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 14, p. 18-19, fev. 1990.

LOUVET, J.; ROUXEL, F.; ALABOUVETTE, C. Recherches sur la résistance des sols aux maladies, mise en évidence de la nature microbiologique de la résistance d'un sol au développement de la fusariose vasculaire du melon. **Annales de Phytopathologie**, Paris, v. 8, p. 425-436, juil. 1976.

MINERDI, D. et al. Volatile organic compounds: a potential direct long-distance mechanism for antagonistic action of *Fusarium oxysporum* strain MSA 35. **Environmental Microbiology**, Malden, v. 11, p. 844-854, Apr. 2009.

MOURA, R. M. O gênero *Meloidogyne* e a Meloidoginose. In: LUZ, W. C. et al. (Ed.). **Revisão anual de patologia de plantas**. Passo Fundo: Embrapa, 1996. p. 281-315.

MWAURA, P. et al. Effect of endophytic *Fusarium oxysporum* on paralysis and mortality of *Pratylenchus goodeyi*. **African Journal of Biotechnology**, Victoria, v. 9, n. 8, p. 1130-1134, Feb. 2010.

NAGAO, H.; COUTEAUDIER, Y.; ALABOUVETTE, C. Colonization of sterilized soil and flax roots by strains of *Fusarium oxysporum* and *Fusarium solani*. **Symbiosis**, California, v. 9, n. 1/3, p. 343-354, Oct. 1990.

NORDBRING-HERTZ, B.; JANSSON, H. B.; TUNLID, A. Nematophagous fungi. In: MATOS, M. (Org.). **Encyclopedia of life sciences**. Basingstoke: Macmillan, 2002. p. 10-12.

OLIVAIN, C.; ALABOUVETTE, C. Colonization of tomato root by a non-pathogenic strain of *Fusarium oxysporum*. **New Phytologist**, Lancaster, v. 137, p. 481-494, July 1997.

OLIVEIRA, R. D. L.; FERRAZ, S.; DIAS-ARIEIRA, C. R. Eficácia de isolados de *Arthrobotrys* spp. no controle de *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* e *Heterodera glycines*. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 26, n. 1, p. 49-57, jun. 2003.

O'NEIL, M. J. et al. **The merck index**. 13th ed. Whitehouse Station: Merck & Co, 2001. 230 p.

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.

RAPIOR, S.; FONS, F.; BESSIERE, J. The fenugreek odor of *Lactarius helvius*. **Mycologia**, Corballis, v. 92, p. 305-308, Jan. 2000.

RIBEIRO, R. C. F.; CAMPOS, V. P. Isolamento, identificação e efeito da temperatura no crescimento *in vitro* de fungos parasitas de ovos de *Meloidogyne* spp. do sul de Minas Gerais. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 17, n. 2, p. 132-139, ago. 1993.

RIGA, E.; LACEY, L. A.; GUERRA, N. *Muscodor albus*, a potential biocontrol agent against plant-parasitic nematodes of economically important vegetable crops in Washington State, USA. **Biological Control**, Orlando, v. 45, p. 380-385, June 2008.

ROBINSON, P. M.; MCKEE, N. D.; THOMPSON, L. A. A. Autoinhibition of germination and growth in *Geotrichum candidum*. **Mycological Research**, London, v. 93, n. 2, p. 214-222, Sept. 1989.

SANTIN, R. C. M. **Potencial do uso dos fungos *Trichoderma* spp. e *Paecilomyces lilacinus* no biocontrole de *Meloidogyne incognita* em *Phaseolus vulgaris***. 2008. 91 p. Tese (Doutorado em Fitossanidade) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

SANTOS, M. A. **Detecção, identificação e avaliação do potencial antagonista de fungos nematófagos presentes em solos do Brasil**. 1991. 97 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1991.

SCHNABEL, G.; MERCIER, J. Use of a *Muscodor albus* pad delivery system for the management of brown rot of peach in shipping cartons. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 42, p. 121-123, Oct. 2006.

SCHNURER, J.; OLSSON, J.; BORJESSON, T. Fungal volatiles as indicators of food and feeds spoilage. **Fungal Genetics Biology**, New York, v. 27, p. 209-217, July 1999.

SILVA, G. S.; SOUZA, I. M. R.; CUTRIM, F. A. Efeito da incorporação de sementes trituradas de feijão de porco ao solo sobre o parasitismo de *Meloidogyne incognita* em tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 412-413, jul./ago. 2002.

SOUZA, J. T.; CAMPOS, V. P. Quantificação de endósporos de *Pasteuria penetrans* em solo e raízes. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 1, p. 22-31, jun. 1998.

STIRLING, G. R.; MANKAU, R. Mode of parasitism of *Meloidogyne* and other nematode eggs by *Dactylella oviparasitica*. **Journal of Nematology**, College Park, v. 11, n. 3, p. 282-288, July 1979.

STIRLING, G. R. Naturally occurring biological control. In: STIRLING, G. R. (Ed.). **Biological control of plant-parasitic nematodes**. Oxon: CAB International, 1991. p. 99-124.

STROBEL, G. A. et al. Volatile antimicrobials from *Muscodor albus*, a novel endophytic fungus. **Microbiology**, New York, v. 147, p. 2943-2950, Nov. 2001.

TYLKA, G. L.; HUSSEY, R. S.; RONCADORI, R. W. Axenic germination of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi: effects of selected *Streptomyces* species. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 81, p. 754-759, July 1991.

VERDEJO-LUCAS, S. C. et al. Species of root-knot nematodes and fungal eggs parasites recovered from vegetable in Almeria and Barcelona, Spain. **Journal of Nematology**, Lakeland, v. 34, p. 405-408, Dec. 2002.

ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R. Estratégias múltiplas no manejo integrado de doenças do cafeeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 28., 2003, Uberlândia. **Anais...** Uberlândia: SBN, 2003. p. 137-153.

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

ARTIGO 1

Volatile substances produced by *Fusarium oxysporum* from coffee rhizosphere and others microbes against *Meloidogyne incognita* and *Arthrobotrys conoides*

(Accepted by the Journal of Nematology)

Freire, E.S., Campos, V.P., Oliveira, D.F., Pohlit, A.M., Noberto, N.P., Faria, M.R., Pinho, R.S.C., Rezende, E.L., Pfenning, L.H. and Silva, J.C.P.

Abstract

Microorganisms produce volatile organic compounds (VOC) which mediate interactions with other organisms and may be the basis for the development of new methods for control of plant-parasitic nematodes of coffee plants. In the present work, 35 fungal isolates were initially identified after their isolation from coffee plant rhizosphere and *Meloidogyne exigua* eggs and egg masses. Most of the fungal isolates belonged to the genus *Fusarium* and presented *in vitro* antagonism classified as mutual exclusion and parasitism against the nematode-predator fungus *Arthrobotrys conoides* (isolated from coffee roots). These results and the stronger activity of VOC against this fungus by 12 endophytic bacteria may account for the failure of *A. conoides* to reduce plant-parasitic nematodes in coffee fields. VOC from 13 fungal isolates caused more than 40% immobility to *Meloidogyne incognita* second stage juveniles (J₂), and those of three isolates (two *Fusarium oxysporum* isolates and an *F. solani* isolate) also led to 88-96% J₂ mortality. *M. incognita* J₂ infectivity decreased as a function of increased exposure time to *F. oxysporum* isolate 21 VOC. Gas chromatography-mass spectrometric (GC-MS) analysis lead to the detection of 46 VOC substances produced by *F. oxysporum* is. 21 culture. Those most intensive in the TIC chromatograms using the HS-SPME method developed were: caryophyllene, 4-methyl-2,6-di-tert-butylphenol, 1-(1,1-dimethylethyl)-2-methyl-1,3-propanediyl, 2-methylpropanoate and acoradiene.

Keywords: Biological Control. *Meloidogyne exigua*. *Fusarium*. Antagonism.

INTRODUCTION

The plant parasitic nematode *Meloidogyne incognita* causes loss of many crops worldwide including coffee which is also attacked by *M. exigua*, the most widespread species in Brazil (Campos and Villain, 2005; Luc et al., 2005). The largest incidence of *Meloidogyne exigua* in coffee plantations is in southern Minas Gerais State which is where about one fourth of all Brazilian coffee is grown (Campos and Villain, 2005; Castro et al., 2008). However a natural regulation of *M. exigua* population increase occur in some infested plantations (personal communication of Dr. Vicente Paulo Campos) making possible good yield in *M. exigua* infested field discouraging farmers on using nematicide which is a recommended strategy for the control of this nematode. The involvement of the microflora in this natural regulation is most likely. Fungi associated with *Meloidogyne* sp. egg masses include nematode antagonistic fungi which have been extensively studied (Rodriguez-Kabana and Morgan-Jones, 1988; Costa et al. 1997). In addition, the fungus *Fusarium oxysporum* is found on nematode eggs and inside plant (endophytic) and has shown capacity on suppressing nematode population (Verdejo-Lucas et al., 2002; Sikora et al., 2008). However, relatively little information on similar activity of fungi from the coffee rhizosphere are available and those have focused on *Pochonia chlamydosporia*, *Verticillium psalliotae* and *V. suchlasporium* (Hidalgo-Diaz et al., 2000). One species *A. conoides* was found in Brazilian coffee (Naves and Campos, 1991). This nematode-predatory fungus *Arthrobotrys* sp. has been used on the control of *Meloidogyne* spp. and mushroom nematodes (Cayrol et al., 1978; Cayrol and Frankowski, 1979).

Beside the competition as a mode of action in plant rhizosphere for antagonism explanation among microorganisms an additional one is most likely to occur which is the production of toxic volatile organic compounds (VOC) by

a competitor. Although microorganisms present in soil and litter samples also produce VOC (Left and Fierer, 2008; Isodorov and Jdanova, 2002), only a few studies have investigated the production of these substances by soil bacteria and fungi (Bjurman and Kristensson, 1992; Left and Fierer, 2008). Even scarcer are the studies on the role of VOC on rhizosphere organisms such as fungi, bacteria and nematodes, especially on the interaction among them in the same site (Gu et al., 2007; Zou et al., 2007; Fernando et al., 2005; Campos et al., 2010).

Specifically regarding the interaction between fungi and plant-parasitic nematodes, Riga et al. (2008) described the ability of *Muscodor albans* to produce VOC which cause immobility and mortality of *M. chitwoodi*, *Paratrichodorus allius* and *Pratylenchus penetrans*. Similarly, bacterial VOC can have nematocidal activity against nematodes such as *Panagrellus redivivus* and *Bursaphelenchus xylophilus* (Gu et al., 2007). Furthermore, some of these substances also inhibit the mycelial growth of plant-pathogenic fungi like *Sclerotinia sclerotiorum*, *Phytophthora vignae* and *Rhizoctonia solani* (Fernando and Linderman, 1994; Fiddaman and Rossall, 1994; Fernando et al., 2005).

Despite the above-mentioned antagonistic effects of VOC, these substances also can present beneficial properties to some organisms (Dudareva et al., 2006), especially when they co-exist in the same site. Consequently, the study of the influence of these substances on the interaction between fungi, bacteria and plant-parasitic nematodes may generate relevant information for the development of bionematicides or to explain the failure of nematode-control by microorganism introduction in field settings (Zou et al., 2007). Then, the aim of the present work was to explore interactions of organisms present in the coffee plant and rhizosphere in a way which may contribute to the development of new methods to control *Meloidogyne* spp. in coffee plantations. To accomplish this, the following objectives were established: (1) isolate fungi from different sites

of *M. exigua* infested coffee rhizosphere and study the possible antagonism between some of them found in coffee rhizosphere, (2) estimate the possible nematicidal activities of fungal VOC produced by isolated fungi from coffee rhizosphere sites on second stage juveniles (J₂) of *M. incognita* and on host infectivity of *M. incognita* J₂ exposed to VOC of selected fungus, (3) determine the effect of bacterial VOC on selected fungi isolated from *M. exigua* infested coffee rhizosphere, (4) estimate the body energy loss (lipid) from J₂ exposed to select fungal VOC and (5) identify fungal and nematicidal VOC through the use of headspace-solid-phase microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometric analysis.

MATERIALS AND METHODS

Fungus isolation and storage

***Meloidogyne exigua* egg masses.** Egg masses from *M. exigua*-infested field coffee roots were placed onto 0.028 mm sieves in petri dishes filled with distilled water. Seven days later, the egg masses covered by fungal mycelia were transferred to petri dishes containing water-agar that were sealed and maintained at 25°C in darkness. After two weeks, fungal colonies which were similar by observation under a microscope were transferred to petri dishes containing malt medium to obtain pure cultures which were incubated and stored.

***Meloidogyne exigua* eggs.** Field coffee roots infected with the nematode were cut into 1-2 cm fragments and eggs were released according to the Hussey and Barker (1973) procedure. Those eggs showing adhered fungal hyphae when observed under a microscope were transferred to petri dishes with 2 % water-agar and placed at 25°C in darkness. After 15 days, fungal colonies which were similar by observation under a microscope were transferred to petri dishes

containing malt medium to obtain pure cultures which were incubated and stored.

Soil. A sample of 10 g of soil adhered to rootlets from the coffee rhizosphere was added to 200 ml distilled water to afford a mixture that was stirred for 10 min at 2.53 g. After decanting for 2 min, the supernatant was discharged and the precipitate was suspended in water and filtrated through 1.0 mm, 0.7 mm, 0.5 mm, and 0.21 mm aperture sieves. The residue held by the 0.21 mm sieve was placed onto filter paper to eliminate excess water, and poured onto petri dishes containing corn meal agar (CMA) medium plus the bacteriocide chloramphenicol. After incubation at 25°C in darkness, the fungal colonies were transferred to petri plates containing malt medium, incubated and stored.

Roots. *M. exigua*-infested roots obtained from coffee plants in the field were cut into small pieces, washed carefully with sterilized distilled water, transferred to a beaker containing 400 ml sterilized distilled water, and slowly stirred for 30 min. After filtration through 0.075 and 0.025 mm sieves, the residue held by the 0.025 mm sieve was washed with water and centrifugated for 2 min at 2816 g. After discharging the supernatant, the residue was dispersed with a Drigalski loop on water-agar (WA)-containing petri dishes, which were sealed and incubated at 25°C in the dark. Daily, a search for fungal colonies in the WA was carried out under a microscope. Selected fungal colonies were transferred to malt medium, incubated at 25°C and identified. All fungal strains were morphologically identified to the genus or species level if possible (Domsch et al., 1980; Barnett and Hunter, 1987).

Bacterial isolates

This work was carried out with bacterial strains isolated from tomato and red pepper stems (Silva et al., 2008), which are on deposit at the Department

of Phytopathology - Federal University of Lavras, MG, Brazil. After a previous screening (unpub. data) a total of 12 bacterial isolates belonging to six species were examined for their potential to produce fungicidal VOC (Table 2). These isolates were incubated in peptone-glycerol medium (20.0 ml peptone, 10.0 ml glycerol, 1.5 g K₂HPO₄, 1 liter distilled water) and stored at -80°C. Prior to the experiments, the stock cultures were streaked onto tryptic soy agar medium (TSA) (Difco Laboratories, Detroit, MI) and incubated at 28°C for 24 hr. How were bacteria harvested for assays? It is already stated the begin of this paragraph. So we use the bacterial isolates from previous work.

Nematodes

M. incognita J₂ were used to assess the *in vitro* activity (J₂ mortality and mobility), and the assessment of lipid body content and host plant infectivity using J₂ exposed to fungal VOC. *M. incognita* was cultured on tomato plants in a greenhouse. After three months, eggs were obtained from galled roots by the Hussey and Barker (1973) procedure. Eggs were placed in a hatching chamber and nematode J₂ were collected and used for the tests.

In vitro antagonism assay

Thirty five fungal isolates obtained as described above (Table 1) were tested in duplicate for activity against the nematode predator fungus *A. conoides* which was isolated from coffee root surface (Table 1). *A. conoides* and the isolates tested were point inoculated 3 cm distant from each other on 6 cm diameter petri dishes. The test was performed at 15 °C on malt agar medium and the observations were made 12 days after the inoculation. Interactions between the developing colonies were classified as follows: 1) no interaction: colonies growing over each other; 2) mutual exclusion: colony growth stops when rims of colonies touch; 3) parasitism: the isolate tested destroys *A. conoides*.

Fungicide activity (FA) of bacterial VOC

The nematode predator fungus *A. conoides* (isolated from coffee roots), *F. oxysporum* - isolate (is.) 21 (the most prevalent species on coffee soil rhizosphere) (Table 1) and endophytic bacterial strains obtained from tomato and pepper plants (Table 2) were used in a bioassay designed to allow only volatile compounds from bacteria (*Bacillus* spp.) to be the cause of fungal (*A. conoides* and *F. oxysporum* is. 21) mycelial growth inhibition. Bacterial suspensions (300 µl) obtained by cultivation at 28°C for 24 h, were poured onto half of a two-compartmented petri plate containing TSA medium. A 5 mm round plug taken from the border of a newly grown *A. conoides* or *F. oxysporum* colony was placed on the surface of the other half of the petri plate which contained malt agar medium. All plates were wrapped with two layers of Parafilm and incubated at 25°C in the dark. At 24 h intervals, the linear growth of the filamentous fungi was measured from the edge of the inoculum plugs until the colony c. Fungicidal activities (FA) due to bacterial VOC were presented as percentage of mycelium growth reduction compared to control (TSA medium) with no bacteria.

In vitro nematocidal activity of fungal VOC (*J*₂ immobility and mortality tests)

Nematicidal activities (NA) of fungal VOC were evaluated according to the method of Fernando et al. (2005) with some modifications. Briefly, each fungus was inoculated on one half of two-compartmented petri plate which contained malt agar medium. When the fungus colony reached 4.5 cm diameter, about 200 *M. incognita* J₂ were added onto the other half, which contained a layer of WA. As a control, the same amount of malt medium, without fungus inoculation, was added into one compartment. Plates were immediately wrapped with Parafilm to prevent the escape of the volatiles and incubated at 25 °C in the dark for 72 hr. Mobile and non-mobile J₂ were counted under a microscope and

the J₂ were transferred to 150 µl wells of ELISA plates that contained 150 µL sterilized distilled water. After 24 h, non-mobile J₂ were considered dead (mortality). The NA was calculated using the following formula: $NA = \frac{IN}{SN} \times 100 \%$, where IN represents numbers of dead or immobile J₂ and SN represents the numbers of all J₂ counted. There were four replicates for each treatment and the experiment was repeated twice.

Infectivity of *Meloidogyne incognita* J₂ on tomato after exposure to *Fusarium oxysporum* (is. 21) VOC

F. oxysporum (is. 21) was selected to carry out this experiment, since it caused increased immobility and mortality levels to *M. incognita* J₂ (Table 1). The setup described in NA tests was also used to expose 350 J₂-stage *M. incognita* to fungal VOC for 24, 48, 72 or 96 h. As a control, water substituted for the fungus. About 300 exposed J₂ (50 J₂ were kept for lipid content test) were inoculated on twenty-five day old tomato seedlings through four holes (1.5 cm deep) in the substrate around the plant base using a micropipette. Seedlings were arranged in randomized block design with four replicates and placed in a temperature controlled room at 28 °C with a photoperiod of 12 h. Thirty days after J₂ inoculation, root systems were harvested, washed gently, weighted, and galls were counted. Galls per gram of roots were estimated after dividing the total numbers per root weight.

Meloidogyne incognita J₂ lipid content after exposure to *Fusarium oxysporum* (is. 21) VOC

The 50 exposed J₂ to *F. oxysporum* is. 21 VOC over time used in this test were essentially the same as those used in the infectivity test. J₂ body lipid content was determined according to the method of Christophers *et al.* (1997) with some modifications, after exposure to fungal VOC for 24, 48, 72 or 96 h, or

water (control) as described above. Briefly, Oil Red O stain (3.0 ml of a 0.5 % solution) was added to an aqueous J_2 suspension and heated in a water bath at 60°C for 20 min. After cooling to room temperature, the suspension containing stained J_2 was centrifugated for 3 min at 1416 g. The supernatant was eliminated and 1.5 ml of a glycerin: water solution (1:1) was added to the J_2 suspension. Twenty randomly selected J_2 were mounted on a microscope slide with glycerin and photographed. The red-stained area of the J_2 body, corresponding to lipids, and the full area of the nematode body were calculated by analyzing the photographs with the “Image Tools for Windows” software, version 3.0. Measurement of the red-stained area allowed us to infer lipid percentage in relations to the full J_2 body area. There were four replications for each treatment.

Analysis *Fusarium oxysporum* VOC by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS)

Headspace-solid-phase microextraction (HS-SPME). *F. oxysporum* (is. 21) was selected to carry out this analysis since it caused increased immobility and mortality level to *M. incognita* J_2 , decreased infectivity of exposed J_2 to its VOC (Table 1 and Fig. 3). Fungus-culture plugs from recently grown colonies were inserted into vials containing liquid malt medium and shaking-incubated at 25°C by seven days at 0.34 g speed. After centrifugation the supernatant was filtered through a 0.22 μm membrane. Aliquots of 9 ml of the filtered fungal culture were transferred to 80 \times ϕ 28 mm (39 mL internal volume) sterilized Supelco™ SPME glass vials sealed with silicone septas and stored at 0-4 °C. The volatiles were collected on a 100 μm fused silica-non-bonded polydimethyl siloxane (PDMS) Supelco™ Fiber Core. The fiber was introduced into the headspace of each vial using a Supelco™ Solid-Phase Micro Extraction Fiber Manual Holder. After insertion of the fiber, the vial was warmed in a 45°C water bath for 30 min.

Each extraction was performed and immediately analyzed as described below. Malt culture medium (no fungal culture) was also extracted using this procedure for comparison. There were four replications for each treatment and the experiment was repeated twice.

Gas Chromatography-Mass Spectrometer (GC-MS) analysis of HS-SPME

samples. After each extraction above, the SPME fiber was exposed for 3 min in the injector of a Shimadzu Gas Chromatograph (Model GC-2010)-Mass Spectrometer (Model QP2010) running GCMSSolution Release 2.30 Software. Analysis conditions: injector temp. 220 °C, splitless, injection mode: splitless, sampling time 1.5 min, flow control mode: linear velocity, press.: 64.7 kPa, total flow: 16.3 ml/min, column: DB-5MS (30 m × 0.25 mm × 0.25 µm), carrier gas: helium, column flow: 1.21 ml/min, linear velocity: 39.7 cm/s, split ratio: 10, oven temp.: 40.0°C (5 min), rate 5.0°C/min to 280°C (48 min), 280°C (15 min). Equilibrium time: 2.0 min, ion source temp: 250°C, interface temp.: 280°C, solvent cut time: 1.50 min, detector gain mode: relative, detector gain: 0.0 kV, threshold: 1000, acquisition mode: scan, interval: 0.30 s, scan speed: 1250, m/z range: 50.00-400.00. Substances were tentatively identified by comparison of their spectra to Wiley 7.0, NIST 12 and NIST 62 mass spectral libraries.

Data analysis and statistics

Data were analyzed using analysis of variance (ANOVA). Nematicidal activity - NA (mortality, immobility), and fungicidal activity - FA (mycelial growth diameter) were calculated as the means of four replicates. VOC categories were built based on grouping analysis done by Scott and Knott test (1974) at 5% probability, then defining: for immobility $NA \leq 17.25$ (I), $30.50 \leq NA \leq 47.00$ (II), and $NA \geq 68.50$ (III), were considered to have no NA (I), moderate (II) and very strong (III); for mortality $NA \leq 12.25$ (I),

$22.25 \leq \text{NA} \leq 34.25$ (II), and $\text{NA} \geq 68.50$ (III) were considered to have no NA (I), low (II) and very strong (III) VOCs activities. The categories established for *F. oxysporum* FA were $\text{FA} \leq 5.23$ (I), $10.47 \leq \text{FA} \leq 23.26$ (II) considered to have no FA (I) and low (II); for *A. conoides* FAs were $13.04 \leq \text{FA} \leq 13.30$ (I), $20.13 \leq \text{FA} \leq 30.43$ (II), considered to have no NA (I), moderate (II), VOC activities. In galls per gram of root (infectivity test) and percentage lipid (body lipid content) data regression analysis were used.

RESULTS

Fungus isolation and *in vitro* antagonism

Thirty five fungal isolates were obtained from coffee rhizosphere sites. The isolates belonged to five different species (Table 1) but three isolates were identified to genus level only. Altogether, twenty three *F. oxysporum* isolates were obtained from coffee roots (isolates 3, 13, 24, 33 and 35), *M. exigua* egg mass (isolates 6, 7, 8, 8b, 9, 10a, 20 and 20a) and *M. exigua* eggs (isolates 1, 4, 12, 21, 22, 37, 40, 41, 42a and 42b). Most of the 35 fungal isolates obtained and all *F. oxysporum* isolates were associated with coffee plant roots or nematode eggs. Species belonging to the *Fusarium* genus were found in all isolation sites. They were found most frequently in *M. exigua* eggs and egg masses. In coffee rhizosphere soil only *Fusarium* species occurred. Of all the isolated fungi used in the dual culture test, only *Fusarium* species showed some type of antagonistic effect against *A. conoides* isolated from coffee roots (Fig. 1). Isolates no. 40, 30 and 22 caused mutual exclusion while, no. 10a presented parasitism.

Table 1 Fungal isolates (identified by sequential numbers) with nematicidal activities (NA) *Meloidogyne incognita* J₂.

Fungal species	Number of isolates and isolation sites	Isolate notations into different NA categories					
		Immobility			Mortality		
		I	II	III	I	II	III
<i>Arthrobotrys conoides</i>	R: 1 (43)	43	-	-	43	-	-
<i>Fusarium</i> sp.	S: 1 (30) EM:1(39)	-	30,39	-	-	30,39	-
<i>Fusarium oxysporum</i>	E: 10 R: 5 EM: 8	1,4,6,8,8b, 12,13,20, 22,24,33, 35,41,42a, 42b	3,7, 10a, 37,40	9,20a, 21	1,3,4,6,7,8, 8b,9,10a,12, 20,22,24,33, 35,40,41, 42a,42b	13,37	20a,21
<i>F. solani</i>	E: 1 (16) S:1 (18) EM:1(32)	16,32	-	18	16, 32	-	18
<i>Gliocladium penicilliado</i>	E:2 (2,28) ¹ R:2 (15,36)	2,15,28,36	-	-	2,15,28,36	-	-
<i>G. roseum</i>	EM:1(14)	14	-	-	14	-	-
<i>Trichoderma</i> sp.	R: 1 (34)	34	-	-	34	-	-
TOTAL	35	24	07	04	28	04	03

For immobility: I - No NA; II - Moderate; III - Very strong. For mortality: I - No NA; II - Low; III - Very strong. Each category is different from each other at 5% probability according to Scott and Knott test (1974). Isolations sites: R - root; E - egg; EM - egg mass; S - soil. (1) No. between brackets refers to isolates obtained from this specific isolation site.

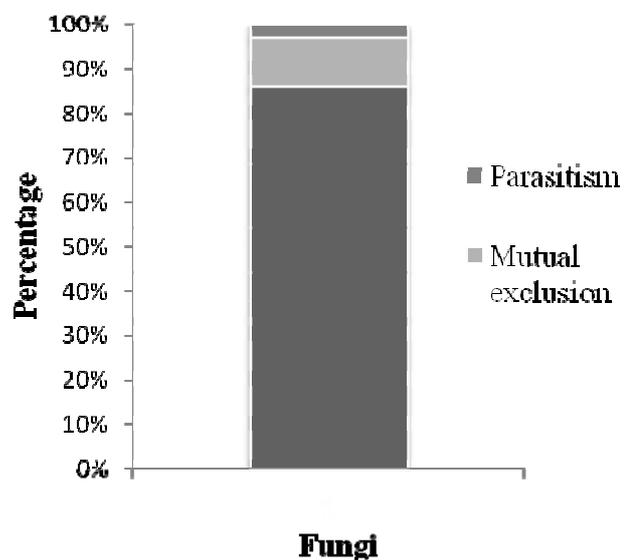


Figure 1 Frequency (%) of *in vitro* antagonism by dual test against *Arthrobotrys conoides* of fungi isolated from eggs, egg mass, soil and coffee roots.

Bacterial VOC production against *Arthrobotrys conoides* and *Fusarium oxysporum* (is. 21)

Among the 12 bacterial isolates screened for the production of antifungal volatiles, eight moderately inhibited *A. conoides* micelial growth (from 20.13 % to 30.43 %). However, only seven isolates produced VOC able to marginally reduce *F. oxysporum* mycelial growth (from 10.47% to 23.26%) which was less affected than that of *A. conoides* (Table 2).

Table 2 Bacterial isolates with fungicidal activities (FA) *Fusarium oxysporum* (is. 21) and *Arthrobotrys conoides*.

Bacterial species	N° of isolates	FA% of VOCs			
		<i>F. oxysporum</i>		<i>A. conoides</i>	
		I	II	I	II
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	2	-	2	1	1
<i>B. cereus</i>	1	1	-	-	1
<i>B. macerans</i>	1	1	-	-	1
<i>B. pumilus</i>	5	1	4	3	2
<i>B. sphaericus</i>	3	2	1	-	3
TOTAL	12	5	7	4	8

For *F. oxysporum* (is. 21) FAs: I – no FA; II – low; for *A. conoides*: FAs: I – no FA; II – moderate. Each category is different from each other at 5% probability according to Scott and Knott test (1974).

Influence of fungal VOC on motility, mortality and lipid content of *M. incognita*

J₂

VOC from *F. oxysporum* isolates showed diverse effects (none, low, moderate, strong and very strong) on *M. incognita* J₂. *F. oxysporum* isolates 20a and 21 were the most active. They caused both very strong immobility and mortality to the nematode. The isolate 9 caused very strong immobility (over 68.50 %), but the J₂ didn't died. Isolate 18 (*F. solani*) also caused very strong immobility and mortality. All the other isolates afforded moderate to no mortality (Table 1). Then among *Fusarium* spp. isolates the VOC effect can be either nematostatic (immobility) or nematocidal (mortality). But *F. oxysporum* is. 21 VOC caused very strong nematocidal effect against J₂ of *M. incognita*.

Regarding the body lipid content of J₂-stage *M. incognita* exposed to VOC produced by *F. oxysporum* (isolate 21), the values decreased similarly to that observed for the control until the second day. Thereafter, control values continued to decrease, while the values for the fungal volatiles tended to remain unchanged (Fig. 2), therefore saving energy.

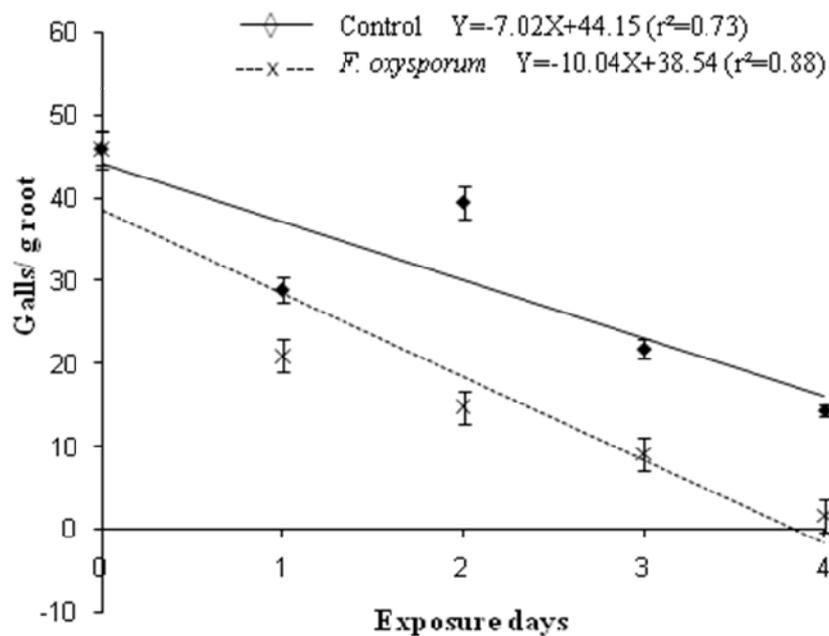


Figure 2 Body lipid content (%) in *Meloidogyne incognita* J₂ after exposure to *Fusarium oxysporum* is. 21 VOC overtime and control (without VOC exposure).

Infectivity of J₂-stage *Meloidogyne incognita* on tomato plantlets after exposure to VOC produced by *Fusarium oxysporum* (is.21)

Exposure of *M. incognita* J₂ to VOCs produced by *F. oxysporum* (isolate 21) highly decreased the nematode infectivity on tomato over time as compared to the controls (Fig. 3).

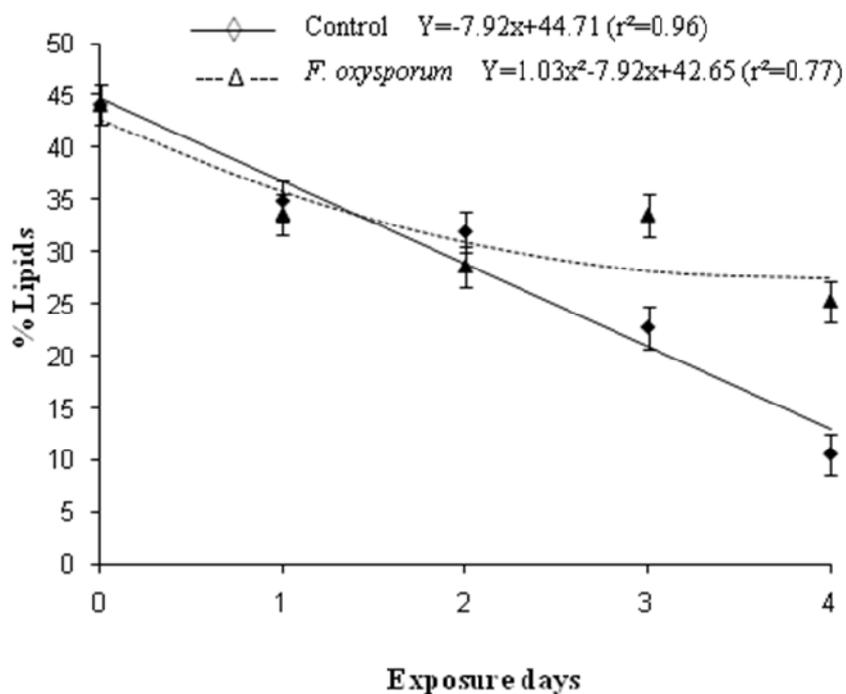


Figure 3 Tomato galls per gram of roots caused by *Meloidogyne incognita* J₂ after exposure to *Fusarium oxysporum* is. 21 VOC and control (without VOC exposure).

Identification of VOC produced by *F. oxysporum* (is.21) using GC/MS

Analysis by GC/MS of the volatiles produced by *F. oxysporum* (is. 21) revealed the presence of 46 substances. Those most intense in the TIC chromatograms using the HS-SPME method developed were tentatively assigned as caryophyllene, 4-methyl-2,6-di-tert-butylphenol, 1-(1,1-dimethylethyl)-2-methyl-1,3-propanediyl 2-methylpropanoate and acoradiene (Table 3).

Table 3 Major volatile organic substances produced by *Fusarium oxysporum* (is. 21), quantified and identified by gas chromatography-mass spectrometry.

Retention time (min)	Substance ^a	Amount (%) ^b
26.411	Caryophyllene	21.86
28.007	4-methyl-2,6-di-tert-butylphenol	3.81
30.046	1-(1,1-dimethylethyl)-2-methyl-1,3-propanediyl 2-methylpropanoate	2.46
30.817	Caryophyllene	8.77
31.191	Acoradiene	3.10

^a Obtained by comparison of the mass spectra to Wiley 7.0, NIST 12 and NIST 62 mass spectral libraries

^b Percentage = (area of the peak corresponding to the substance in the chromatogram) x 100/(sum of areas of all peaks in the chromatogram).

DISCUSSION

The isolation and identification of fungi carried out in the present study are in agreement with the literature, since all of these microorganisms belong to genera known to contain species associated with nematode eggs, cysts or egg masses (Rodrigues-Kabana and Morgan Jones, 1988; Crump, 1991; Naves and Campos, 1991; Ribeiro and Campos, 1993; Costa et al., 1997). Ribeiro and Campos (1993), for example, reported the presence of the fungi *Penicillium* sp. in coffee roots infected by *M. exigua*. Analogously, other research groups have described the isolation of *F. oxysporum* and *F. solani* from soil and nematode cysts (Crump, 1987; Meyer et al., 1990; Costa et al., 1997).

Fusarium spp. accounted for the largest number (83%) of fungal species isolates found in the *M. exigua*-infested coffee rhizosphere. These isolates caused mutual exclusion and parasitic interactions with *A. conoides* which suggests a good adaptability of these fungi to this habitat. These results and the

moderate activity of most bacterial VOC against *A. conoides* may explain the possible lack of competitive power of *A. conoides* as a biocontrol agent against *Meloidogyne* sp. in the field. Strong antagonism has been found against *Pochonia chlamydosporia* – a nematode biocontrol agent – by *Trichoderma harzianum* on dual test (Kok et al., 2001). Further studies on the antagonistic effect of fungi and bacterial VOC should include the species *A. robusta* and *A. irregularis* which are the basic active ingredients of Royal 300 and Royal 350 (Cayrol et al., 1978; Cayrol and Frankowski, 1979). This will provide information on competitive capacity of these biocontrol species against *Fusarium* spp and bacteria in soil once those bionematicides (Royal 300 and 350) are applied in the field.

Although this is the first time the activity of bacterial VOC against *A. conoides* is reported, other research groups have already described the antifungal properties of such substances against *Paecilomyces lilacinus* and *Pochonia chlamydosporia* (Zou et al., 2007) and also against plant-pathogenic fungi (Fernando et al., 2005; Liu et al., 2007; Arrebola et al., 2009).

The high *in vitro* immobility of J₂-stage *M. incognita* caused by some *F. oxysporum* isolate VOC may retard the nematode life cycle. This would be similar to what has been observed for some commercial organophosphate and organocarbamate nematicides (Sikora et al., 2005). These results also seem similar to the reports by Riga et al. (2008), since the authors described the immobility and mortality effects of *Muscodora albus* VOC on *M. chitwoodi*, *Paratrichodorus allius*, and *Pratylenchus penetrans*. Some of the fungal VOC in the present study, especially those produced by two isolates of *F. oxysporum* (isolates 20a and 21) and one of *F. solani* (isolate 18) caused very strong J₂ mortality, revealing nematicidal effect. Then some of the molecules presented in the *F. oxysporum* VOCs may, possibly, become structural model for future fumigant nematicide. In fact, the killing action of *F. oxysporum* VOC

was proved by infectivity (galls) decrease when the *M. incognita* J₂ were inoculated in tomato after exposure to *F. oxysporum* (is. 21) VOC.

The stable body energy content of J₂ exposed to *F. oxysporum* VOC over time in contrast to control indicates reduced energy spending, also confirmed by exposed J₂ death. To prove that *M. incognita* J₂ were dead after VOC exposure, the lipid body energy was estimated. It is already known that in juvenile nematodes exposed to pesticides which retard their movement without killing them, the lipid energy is exhausted and infectivity decreases (Andaló et al., 2008). Previously, it has been shown that *F. moniliforme* produces a non-volatile metabolite toxic to *M. exigua* (Amaral, et al., 2003), our study is the first to characterize the nematocidal activity of fungal volatiles from rhizosphere *Fusarium* species plant parasitic nematodes.

Comparison of the mass spectrum of the substance detected more intensely in the VOC from *F. oxysporum* (is. 21) to the mass spectral libraries used in the present work suggests this substance corresponds to Caryophyllene. This compound is a natural bicyclic sesquiterpene that is a constituent of many essential oils (Ghelardini et al., 2001; Gertsch et al., 2008; Ormeño et al. 2008) and produced by fungi in the *Fusarium* genus (Jelén et al., 1995). It is usually found as a mixture with isocaryophyllene (the *cis* double bond isomer) and α -humulene (obsolete name: α -caryophyllene), a open-ring isomer. Caryophyllene is notable for having a cyclobutane ring, a rarity in nature. Larvae of the leaf beetle *Diabrotica virgifera virgifera* feeding on maize roots induce the production of caryophyllene, which is attractive to the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis megidis* in the laboratory and field (Rasmann et al. 2005). However this compound presented no toxicity against the pine wood nematode (*Bursaphelenchus Xylophilus*) (Park et al., 2007). Meyer et al. (2008) demonstrated the nematocidal activity against *Meloidogyne incognita* by the caryophyllene-rich essential oil from *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. and

Perry. Also worth of mention is the toxicity of the essential oil of *Aloysia gratissima* to *Meloidogyne* spp., since caryophyllene oxide is one of the major components (12.06%) of this product (Duschatzky et al., 2004).

According to comparisons to the mass spectral libraries, another substance possibly present in the VOC from *F. oxysporum* is 4-methyl-2,6-di-tert-butylphenol (3.80% of isolate 21 VOC). Although no report on the nematocidal activity of this substance, also known as butylated hydroxytoluene (BHT), was found in the literature, this phenol is moderately toxic to molluscs, daphnids and fish, with EC50s of 1 to 20 mg/L (Aherns, 2008). This lipophilic (fat-soluble) organic compound is primarily used as an antioxidant food additive (E number E321) as well as an antioxidant additive in cosmetics (Branen, 1975). Apparently, no fungus has ever produced this substance, suggesting that this is the first report on the production of BHT by a fungus.

Regarding 1-(1,1-dimethylethyl)-2-methyl-1,3-propanediyl 2-methylpropanoate and acoradiene, which respectively corresponded to 1.35% and 1.71% of the VOC produced by isolate 21, their identification were also tentative, since it relied only on the comparison to the mass spectral libraries. No report any activity against nematodes was found in the literature for these substances. Similarly to caryophyllenes, the latter substance is a natural compound produced by fungi of the *Fusarium* genus (Jelén et al., 1995).

The isolate 21 of *F. oxysporum* may become a control agent as well as the VOC molecules produced by it which present potential for the development of new commercial products for the control of plant-parasitic nematodes. Other research groups have already pointed out the *F. oxysporum* potential for biocontrol agents (Kerry and Evans, 1996). On other hand *F. oxysporum* is also reported as a pathogen (Cardoso, 1986), especially when forming a disease complex with *M. incognita* and *M. arabicida* (Negrón and Acosta, 1989;

Betrand et al., 2000). Consequently, further studies should be carefully carried out to determine the real potential of *F. oxysporum* (is. 21) and the metabolites (and analogues) produced by this fungus for the control of *Meloidogyne* spp. in coffee fields.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors gratefully acknowledge the financial support provided by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

LITERATURE CITED

- Aherns, M. 2008. Review of organic chemical of potential environmental concern in use in Auckland. Auckland Regional Council Technical Report 2008-2028.
- Amaral, D. R., Oliveira, F. E. R., Oliveira, D. F., Campos, V. P. and Silva, G. H. 2003. Purificação de metabólito produzido por *Fusarium moniliforme* tóxico a *Meloidogyne exigua*. Summa Phytopathologica 29(1):25-29.
- Andaló, V., Maximiniano, C., Campos, V. P. and Moino Jr, A. 2008. Efeito de filtrados entomobacterianos sobre juvenis de *Meloidogyne* spp.. Nematologia Brasileira 31:186-194.
- Arrebola, E. Sivakumar, D. and Korsten, L. 2010. Effect of volatile compounds produced by *Bacillus* strains on postharvest decay in citrus. Biological Control 53(1):122-128.
- Barnett, H. L. and Hunter, B. B. 1987. Illustrated genera of imperfect fungi. 4 ed. New York, Macmillan Publishing Company.
- Betrand, B., Nunez, C. and Sarah, J. L. 2000. Disease complex in coffee involving *Meloidogyne arabicida* and *Fusarium oxysporum*. Plant Pathology 49:383-388.
- Bjurman, J. and Kristensson. 1992. Volatile production by *Aspergillus versicolor* as possible cause of odor in houses affected by fungi. Mycopathology 118:173-178.
- Branen, A. L. 1975. Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. Journal of the American Oil chemistry Society 52(2):59-63.
- Campos, V. P.; Pinho, R. S. C. and Freire, E. S. 2010. Volatiles produced by interacting microorganisms potentially useful for the control of plant pathogens. Ciência e Agrotecnologia 34: 525-535.
- Campos, V. P. and Villain, L. 2005. Nematodes parasites of coffee and cocoa. Pp. 529-579 in Luc, M., Sikora, R. A. and Bridge, J. (eds). Plant Parasitic nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture, 2nd ed. Wallingford: CAB International Publishing.

- Cardoso, R. M. L. 1986. Ocorrência da murcha vascular do cafeeiro (*Coffea arabica*) no estado do Paraná-Brasil, induzida por *Fusarium oxysporum* f.sp. *coffeeae*. Fitopatologia Brasileira 11:753-760.
- Castro, J. M. C.; Campos, V. P.; Pozza, E. A.; Naves, R. L.; Andrade Junior, V. C.; Dutra, M. R.; Coimbra, J. L.; Maximiniano, C. and Silva, J. R. C. 2008. Levantamento de fitonematóides em cafezais do sul de Minas Gerais. Nematologia Brasileira 32:56-64.
- Cayrol, J. C., Frankowski, J. P.; Laniece, A.; D'Hardemare, G. and Talon, J. P. 1978. Contre les nematodes en champignonnière. Mise au point d'une méthode de lutte biologique a l'aide d'un hyphomycete prédateur: *Arthrobotrys robusta* souche antipolis (Royal 300). Revue Horticole 184:23-30.
- Cayrol, J. C. and Frankowski, J. P. 1979. Une méthode de lutte biologique contre les nématodes à galles des racines appartenant au genre *Meloidogyne*. Revue Horticole 193:15-23.
- Christophers, A. E. P., Patel, M. N., Benson, J. A., Saka, V.W., Evans, A. A. F. and Wright, D. J. 1997. A rapid field-laboratory bioassay to assess the infectivity of *Meloidogyne* spp. second stage juveniles. Nematologica 43(1):117-120.
- Costa, S. B., Campos, V. P. and Menezes, M. 1997. Fungos associados a cistos de *Heterodera glycines* no Brasil. Nematologia Brasileira 21(2):31-37.
- Crump, D. H. 1987. Effect of time sampling, method of isolation and age of nematode on the species of fungi isolated from females of *Heterodera schachtii* and *H. avenae*. Revue Nematologie 10(3):369-373.
- Crump, D. H. 1991. Fungal species isolated from beet, cereal and potato cyst nematodes. Bulletin IOBC/WPRS 14:58-64.
- Domsch, K. H., Gams, W. and Anderson, T. H. 1980. Compendium of soil fungi, vol. 1. London, Academic Press.
- Dudareva, N., Negre, F., Nagegowda, D. A. and Orlova, I. 2006. Plant volatiles: Recent advances and future perspectives. Critical Reviews in Plant Sciences 25:417:440.
- Duschatzky, C. B., Martinez, A. N., Almeida, N. V. and Bonivardo, S. L. 2004. Nematicidal activity of the essential oils of several Argentina plants against the root-knot nematode. Journal of Essential Oil Research 16(6):626-628.

- Fernando, W. G. D. and Linderman, R. 1994. Inhibition of *Phytophthora vignae* and root rot of cowpea by soil bacteria. *Biological Agriculture and Horticulture* 12:1–14.
- Fernando, W. G. D., Ramarathnam, R., Krishnamoorthy, A. and Sauchuk, S. C. 2005. Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol. *Soil Biology & Biochemistry* 37:955-964.
- Fiddaman, D. J. and Rossall, S. 1994. Effect of substrate on the production of antifungal volatiles from *Bacillus subtilis*. *Journal of Applied Bacteriology* 76:396:405.
- Gertsch, J., Leonti, M., Raduner, S., Racz, I., Chen, J. Z., Xie, X. Q., Altmann, K. H., Karsak, M. and Zimmer, A. 2008. Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(26):9099-9104.
- Ghelardini, C., Galeotti, N., Di Cesare Mannelli, L., Mazzanti, G. and Bartolini, A. 2001. Local anaesthetic activity of beta-caryophyllene. *Farmaco* 56(5-7): 387-389.
- Gu, Y. Q., Mo, M. H., Zhou, J. P., Zou, C. S. and Zhang, K. Q. 2007. Evaluation and identification of potential organic nematicidal volatiles from soil bacteria. *Soil Biology & Biochemistry* 39:2567-2575.
- Hidalgo-Diaz, L., Bourne, J. M., Kerry, B. R. and Rodriguez, M. G. 2000. Nematophagous *Verticillium* spp. in soils infested with *Meloidogyne* spp. in Cuba: Isolation and screening. *International Journal of Pest Management* 46(4):277-284.
- Hussey, R. S. and Barker, K. R. 1973. A comparison of methods for collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. *Plant Disease Reporter* 57:1025-1028.
- Isidorov, V. and Jdanova, M. 2002. Volatile organic compounds from leaves litter. *Chemosphere* 48(9):975-979.
- Jelén, H. H., Mirocha, C. J., Wasowicz, E. and Kamiński, E. 1995. Production of volatile sesquiterpenes by *Fusarium sambucinum* strains with different abilities to synthesize trichothecenes. *Applied and Environmental Microbiology* 61(11):3815-3820.

- Kerry, B. R. and Evans K. 1996. News strategies for the management of plant-parasitic nematodes. Pp. 134-152 in Hall, R. (ed.) Principles and Practice of Managing Soilborne Plant Pathogens, 1st ed. Saint Paul: APS Press.
- Kok, C. J., Papert, A. and Bok-A-Bin, C. B. 2001. Microflora of *Meloidogyne* egg masses: Species composition, population density and effect on the biocontrol agent *Verticillium chlamydosporium* (Goddard). Nematology 3(8):729-734.
- Left, J. W. and Fierer, N. 2008. Volatile organic compound (VOC) emissions from soil and litter samples. Soil Biology & Biochemistry 40(7):1629-1636.
- Liu, W. W., Mu, W., Zhu, B. Y., Du, Y. C. and Liu, F. 2008. Antagonistic activities of volatiles from four strains of *Bacillus* spp. and *Paenibacillus* spp. against soil-borne plant pathogens. Agricultural Sciences in China 7(9):1104-1114.
- Luc, M., Sikora, R. A. and Bridge, J. 2005. Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture, 2nd ed. Wallingford: CABI Publishing.
- Meyer, S. L. F., Huettel, R. N. and Sayre, R. M. 1990. Isolation of fungi from *Heterodera glycines* and in vitro bioassays for their antagonism to eggs. Journal of Nematology 22(4):532-537.
- Meyer, S. L. F., Lakshman, D. K., Zasada, I. A., Vinyard, B. T. and Chitwood, D. J. 2008. Dose-response effects of clove oil from *Syzygium aromaticum* on the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. Pest Management Science 434:223-229.
- Naves, R. L. and Campos, V. P. 1991. Ocorrência de fungos predadores de nematóides no Sul de Minas Gerais e estudo da capacidade predatória e crescimento *in vitro* de alguns de seus isolados. Nematologia Brasileira 15(2):152-162.
- Negron, J. A. and Acosta, N. 1989. The *Fusarium oxysporum* f.sp. *coffea* – *Meloidogyne incognita* complex in “Bourbon” coffee. Nematropica 19:161-168.
- Ormeño, E., Baldy, V., Ballini, C. and Fernandez, C. 2008. Production and diversity of volatile terpenes from plants on calcareous and siliceous soils: effect of soil nutrients. Journal of Chemical Ecology 34(9):1219-1229.

- Park, I. K., Kim, J., Lee, S. G. and Shin, S. C. 2007. Nematicidal activity of plant essential oils and components from ajowan (*Trachyspermum ammi*), allspice (*Pimenta dioica*) and litsea (*Litsea cubeba*) essential oils against pine wood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*). *Journal of Nematology* 39(3):275–279.
- Rasmann, S., Rasmann, S., Kollner T. G., Degenhardt, J., Hiltbold, I., Toepfer, S., Kuhlmann, U., Gershenson, J. and Turlings, T. C. J. 2005. Recruitment of entomopathogenic nematodes by insect-damaged maize roots. *Nature* 434:732-737.
- Ribeiro, R. C. F. and Campos, V. P. 1993. Isolamento e identificação e efeito de temperatura no crescimento *in vitro* de fungos parasitas de ovos de *Meloidogyne* spp. no sul de Minas Gerais. *Nematologia Brasileira* 17:132-138.
- Riga, E., Lacey, L. A. and Guerra, N. 2008. *Muscodor albus*, a potential biocontrol agent against plant-parasitic nematodes of economically important vegetable crops in Washington State, USA. *Biological Control* 45(3):380-385.
- Rodriguez-Kabana, R. and Morgan-Jones, G. 1988. Potential for nematode control by mycofloras endemic in the tropics. *Journal of Nematology* 20(2):191-203.
- Scott, A. J. and Knott, M. 1974. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. *Biometrics* 30(3):507-512.
- Sikora, R. A., Bridge, J. and Starr, J. L. 2005. Management practices: An overview of integrated nematode technologies. Pp. 793-825 in Luc, M., Sikora, R. A. and Bridge, J. (eds.) *Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture*, 2nd ed. Wallingford: CAB International Publishing.
- Sikora, R. A., Pocasangre, L., Felde, A., Niere, B., Vu, T. T. and Dababat, A. A. 2008. Mutualistic endophytic fungi and in-plant suppressiveness to plant parasitic nematodes. *Biological Control* 46(1):15-23.
- Silva, J. R. C., Souza, R. M., Zacarone, A. N., Silva, L. H. C. P. and Castro, A. M. 2008. Bactérias endofíticas no controle e inibição *in vitro* de *Pseudomonas syringae* pv *tomato*, agente da pinta bacteriana do tomateiro. *Ciência e Agrotecnologia* 32(4):1062-1072.

Verdejo-Lucas, S. C.; Ornat, C.; Sorribas, F.J.; Stchiegel, A. 2002. Species of root-knot nematodes and fungal eggs parasites recovered from vegetable in Almeria and Barcelona, Spain. *Journal of Nematology* 34:405-408.

Zou, C., Mo, M.; Gu, Y., Zhou, J. and Zhang, K. 2007. Possible contributions of volatile-producing bacteria to soil fungistasis. *Soil Biology & Biochemistry* 39:2371-2374.

ARTIGO 2

Efeito de compostos orgânicos voláteis produzidos pelo fungo *Fusarium oxysporum* da rizosfera cafeeira em ovos e juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne incognita*

Preparado de acordo com as normas da Nematologia Brasileira
(Versão preliminar)

Freire, E.S.; Campos, V.P.; Pinho, R.S.P.; Costa, L.S.A.S.; Pedroso, L.A. &
Faria, M.R.

Resumo- Freire, E.S.; Campos, V.P.; Pinho, R.S.P.; Costa, L.S.A.S.; Pedroso, L.A. & Faria, M.R., 2010. Efeito de compostos orgânicos voláteis produzidos pelo fungo *Fusarium oxysporum* da rizosfera cafeeira em ovos e juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne incognita*

Os ovos e juvenis do segundo estágio (J₂) de *Meloidogyne* spp. estão presentes nos solos, constituindo alvos para as atividades nematicidas dos compostos orgânicos voláteis (COVs). Utilizando-se a técnica que emprega tubos SUPELCO[®], os COVs de três isolados (3, 13 e 21) de *Fusarium oxysporum* (FO) foram testados quanto à toxicidade a ovos e J₂ de *Meloidogyne incognita*. Os três isolados produziram COVs que reduziram a eclosão de ovos e a imobilidade de J₂ e aumentaram a mortalidade de J₂. A intensidade na redução da eclosão de J₂ foi maior aos quatro dias de exposição dos ovos aos COVs e também, mediante quatro dias de crescimento das colônias dos isolados de FO. A análise do desenvolvimento embrionário dos ovos expostos aos COVs demonstrou menor número deles com J₂ formados internamente e maior número na fase de desenvolvimento do embrião, quando comparado com a testemunha. A imobilidade de J₂, expostos aos COVs dos três isolados de FO, chegou a 80% no intervalo de crescimento das colônias de 0 a 2 dias. Nesse mesmo intervalo de crescimento fúngico, a mortalidade foi de 25 a 60% entre os três isolados e continuou a crescer em taxas diferentes entre isolados até o final do ensaio (8 dias). Dados semelhantes foram obtidos, empregando-se a técnica de placas bipartidas, nos testes de eclosão de J₂, expostos aos COVs das culturas dos isolados, nos diferentes períodos de cultivo. Porém, maior capacidade do isolado 21 de *F. oxysporum*, em produzir COVs tóxicos a J₂ de *M. incognita* foi observada nos testes com J₂ expostos aos COVs, apenas em um período de crescimento das culturas fúngicas. Os COVs de FO são tóxicos a *M. incognita* e interferem no seu ciclo de vida em hospedeiro suscetível.

Summary- Freire, E.S.; Campos, V.P.; Pinho, R.S.P.; Costa, L.S.A.S.; Pedroso, L.A. & Faria, M.R., 2010. The effect of volatile organic compounds produced by the fungus *Fusarium oxysporum* from coffee rhizosphere on eggs and second stage juveniles of *Meloidogyne incognita*.

The eggs and second stage juveniles (J₂) of *Meloidogyne* spp. are present in the soil becoming, thereafter, targets of the nematicidal activities of the volatiles organic compounds (VOCs). By using a technique which employs SUPELCO[®] vials, VOCs of the three *F. oxysporum* (FO) isolates were tested on eggs and *M. incognita* J₂ toxicity. All the three isolates produced VOCs which reduced egg hatching and J₂ mobility, and increased J₂ mortality when they were exposed to the volatiles. The hatching reduction intensity was higher at four days of egg exposure to VOCs and also after four days of colony growth of FO isolates. The analysis of embryonic development inside eggs exposed to VOCs demonstrated lower number of them with J₂ formed internally and higher number in the embryonic development phase compared to the control. The immobility of J₂ exposed to the three FO isolate VOCs reached 80% in the 0-2 day colony growth interval. In the same colony growth interval, the J₂ mortality was 25% to 60% among the three isolates and continued to grow at different rates among isolates until the assay conclusion (8-day-growth). Similar data were obtained on the hatching when eggs were exposed to isolate colony VOCs. using the technique of compartmental Petri dishes. Nevertheless, on the tests with J₂ exposed to VOCs with only one time period for each isolate culture growth, the isolate 21 of *F. oxysporum* demonstrated greater capacity to increase both immobility and mortality of J₂ exposed to its VOCs compared to the other isolates tested. The *F. oxysporum* VOCs are toxic to *M. incognita* and interfere in its life cycle in a susceptible host.

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de café e o Estado de Minas Gerais contribui com cerca de 50% do café nacional (CONAB, 2010). A região Sul de Minas Gerais produz metade do café do Estado e 22% de suas lavouras cafeeiras estão infestadas por *Meloidogyne exigua* (Castro et al., 2008). *M. incognita* ataca diversas culturas, entre as quais o cafeeiro (Carneiro et al., 1992; Campos e Villain, 2005).

Fusarium oxysporum tem várias *formae specialis* que causam doenças vasculares em diversas culturas (Both, 1971). Entretanto, existem diversos isolados de *F. oxysporum* que ocorrem tanto no solo quanto dentro do tecido da planta (endofítico) sem causar nenhum dano à cultura (Olivain e Alabouvette, 1997). Esses isolados não patogênicos a plantas têm comprovada capacidade de reduzir doenças causadas por outros fungos e também por nematoides (Gilardi et al., 2005), podendo constituir-se em agentes biológicos de controle. Os mecanismos de ação dos isolados de *F. oxysporum* no biocontrole ainda não estão bem esclarecidos. Entretanto, sabe-se que alguns isolados de *F. oxysporum* produzem compostos orgânicos voláteis (COVs) tóxicos a nematoides (Halmman e Sikora, et al., 1994; Diedhiou, 2003; Freire et al., 2011). Os COVs são produzidos no solo por fungos e bactérias e podem ter papel na supressividade de solos a fitopatógenos (Campos et al., 2010).

Ovos e juvenis do segundo estágio (J_2) de *Meloidogyne* spp. ocorrem no solo, onde plantas infestadas e suscetíveis estão crescendo (Evans et al., 1993). Desta forma, esses estádios estarão sujeitos aos efeitos dos COVs na rizosfera das plantas. Por outro lado, *F. oxysporum* não patogênico ocorre comumente no solo e em cistos de *Heterodera glycines* (Morgan-Jones et al., 1981) e tem alto poder de competição com outros fungos residentes da rizosfera. Portanto, objetivou-se, neste trabalho, testar o efeito tóxico dos COVs, produzidos por

isolados de *F. oxysporum* não patogênicos a plantas, em ovos e J₂ de *M. incognita*, bem como estudar a influência do tempo de crescimento das colônias desses isolados na produção de COVs tóxicos a ovos e J₂ de nematoide.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Utilizaram-se, nos ensaios, isolados de *F. oxysporum* (3, 13 e 21) obtidos em trabalhos anteriores.

Culturas de *Fusarium oxysporum*: utilizaram-se, nos ensaios, três isolados de *F. oxysporum* (3, 13 e 21) da rizosfera cafeeira obtidos em trabalhos anteriores (Freire et al., 2011) e armazenados em BOD a 25°C. Antes dos experimentos, os isolados das culturas estoques foram repicados para meio de cultura malte ágar (20g de malte, 20g de ágar e 20g de dextrose) (MA) e incubados a 25°C por seis dias. A seguir, das bordas das colônias, repicaram-se os isolados para novas placas com o meio MA e deixaram-nas nas mesmas condições anteriores. Desta forma, as culturas estavam em condições para uso nos ensaios.

Ovos e juvenis do segundo estágio (J₂) de *Meloidogyne incognita*: de população pura de *M. incognita* mantida em tomateiros em casa-de-vegetação por dois meses, extraíram-se ovos das raízes galhadas, pela técnica de Hussey e Barker, 1973, modificada por Boneti & Ferraz, 1981. Os ovos obtidos foram colocados em câmara de eclosão a 25°C. Os J₂ eclodidos, a partir do terceiro dia da montagem da câmara, foram colocados em peneiras de 500 mesh e imersos em água. Os J₂ que se deslocaram da peneira para a água (móveis) foram utilizados nos ensaios.

Atividade de compostos orgânicos voláteis (COVs) de *Fusarium oxysporum* em ovos de *Meloidogyne incognita* pela técnica de Botelho et al., 2011: utilizou-se, neste ensaio, a técnica desenvolvida por Botelho et al., 2011 e modificada para uso de culturas fúngicas, pois a técnica original foi desenvolvida para ensaios com COVs de solos. Essa técnica permite a colocação do nematoide teste, em qualquer período após a vedação do frasco contendo a fonte produtora de COVs, neste caso, *F. oxysporum* (FO). Resumidamente, a técnica emprega frascos de 80x28 mm (39 mL de volume interno) SUPELCO® SPME com tampa rosqueada e revestida internamente por uma película de silicone, permitindo total vedação. No frasco colocaram-se 15 mL de meio ágar-água (AA). Após a solidificação, acresceram-se 6 mL de meio MA para possibilitar o cultivo de *F. oxysporum*. Um microtubo esterilizado de 1,5 mL foi introduzido no meio de cultura, até a altura mediana. Dois discos de 2 mm de diâmetro foram retirados das bordas da colônia de *F. oxysporum*, com seis dias de crescimento em placas de Petri de 9 cm de diâmetro, incubadas a 25°C no escuro e depositados sobre o meio MA ao lado do microtubo em posições opostas. Após a vedação, foram incubados em BOD a 25°C no escuro por 0, 2, 4 ou 8 dias. Em cada período de incubação nos frascos cultivados com FO, com o auxílio de uma seringa, 1 mL de uma suspensão com 2000 ovos foi depositado dentro do microtubo interno. Nessa suspensão, avaliou-se em seis leituras de 50 ovos cada, o desenvolvimento embrionário. Como controle, foram utilizados frascos com meio de cultura, porém sem a repicagem de FO, os quais também receberam em cada período de incubação a mesma suspensão de ovos. Após a retirada da seringa, o orifício deixado foi vedado com fita adesiva e os frascos com os ovos foram incubados em BOD por 48 e 96 h. O experimento foi organizado em delineamento inteiramente casualizado com seis repetições e três isolados (3, 13 e 21) de FO. Ao final de cada período de exposição dos ovos aos COVs de FO, nos quatro períodos de crescimento das colônias, abriram-se os

frascos e os microtubos foram retirados, agitados e contados o numero de J₂ eclodidos. Retiraram-se duas alíquotas de 200 µL de cada repetição e transferidas para células de placa ELISA. Foram contados o número de J₂ eclodidos/célula e o desenvolvimento embrionário dentro dos ovos. O volume da célula da placa ELISA foi completado com água destilada. A placa foi colocada em BOD a 25°C e, depois de quatro dias, contado o número de J₂ eclodidos.

Atividade de compostos orgânicos voláteis (COVs) de *Fusarium oxysporum* em juvenis do segundo estágio (J₂) de *Meloidogyne incognita* pela técnica de Botelho et al., 2011: utilizou-se o mesmo procedimento para testes com ovos de *M. incognita* sendo que, em vez de ovos, injetou-se 1 mL de suspensão com 250 J₂ e os frascos foram mantidos em BOD por 48 h a 25°C. Testou-se também a produção de COVs por FO em períodos de 0, 2, 4 ou 8 dias de cultivo antes da introdução dos J₂. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado com seis repetições e três isolados (3, 13 e 21) de FO. Na avaliação, após a abertura dos frascos, contaram-se o número de J₂ móveis e imóveis. Para avaliar a mortalidade entre os J₂ imóveis, cada célula da placa ELISA com os J₂ que foram expostos aos COVs foi completada com água destilada e mantida em BOD por 24 h a 25°C. Os J₂ imóveis foram considerados mortos. A atividade nematicida (AN) dos COVs foi avaliada pela: $AN = JM / JT \times 100\%$, em que JM representou o número de J₂ mortos ou imóveis e JT, o número total de J₂ contados.

Atividade de compostos orgânicos voláteis (COVs) de *Fusarium oxysporum* em juvenis de segundo estágio (J₂) de *Meloidogyne incognita* pela técnica de placas bipartidas de Fernando et al., 2005: nesta técnica empregam-se placas bipartidas. Desta forma, o nematoide teste é colocado no compartimento contíguo à fonte produtora do volátil, que neste caso é o FO,

somente antes do fechamento hermético da placa. Resumidamente, o meio de cultura MA foi colocado em um dos compartimentos da placa. No centro, sobre o meio, foi repicado um disco de 5 mm de diâmetro, retirado das bordas da colônia de FO. As placas foram colocadas em BOD a 25°C no escuro. Quando as colônias atingiram 4,5 cm de diâmetro, colocaram-se no compartimento contíguo com o meio AA 1%, 250 J₂ de *M. incognita* concentrados em 1,5 mL de suspensão. Como controle, utilizou-se o meio MA sem a repicagem do fungo em um compartimento e, no lado oposto, foi colocada a suspensão de J₂ na mesma concentração sobre o meio AA. O ensaio foi organizado em delineamento inteiramente casualizado com seis repetições e três isolados (3, 13 e 21) de FO. As placas foram imediatamente seladas com Parafilm[®], para evitar escape dos COVs, e colocadas em BOD a 25°C no escuro por 72 h. Após esse período, as placas foram abertas, coletadas duas alíquotas de 200 µL de cada repetição e transferidas para células de placa ELISA. Avaliaram-se também a mobilidade e mortalidade, bem como a mortalidade 24 horas após completar o volume do recipiente da placa ELISA com água destilada. Com os dados, calculou-se a atividade nematicida (NA).

Atividade de compostos orgânicos voláteis (COVs) de *Fusarium oxysporum* em ovos de *Meloidogyne incognita* pela técnica de placas bipartidas de Fernando et al., 2005: utilizou-se o mesmo procedimento para testes com J₂ de *M. incognita*. Os isolados de FO foram repicados para o meio MA colocado em um dos compartimentos e deixado crescer por 0, 2, 4 ou 8 dias a 25°C no escuro em BOD. Após cada período de crescimento da colônia, a placa foi aberta e colocada, no compartimento contíguo, uma suspensão de 1,5 mL com um total de 2000 ovos de *M. incognita*. Como controle, foi colocado em um compartimento, o meio MA sem a repicagem de FO e, no lado oposto, a suspensão de ovos na mesma concentração. O ensaio foi organizado em

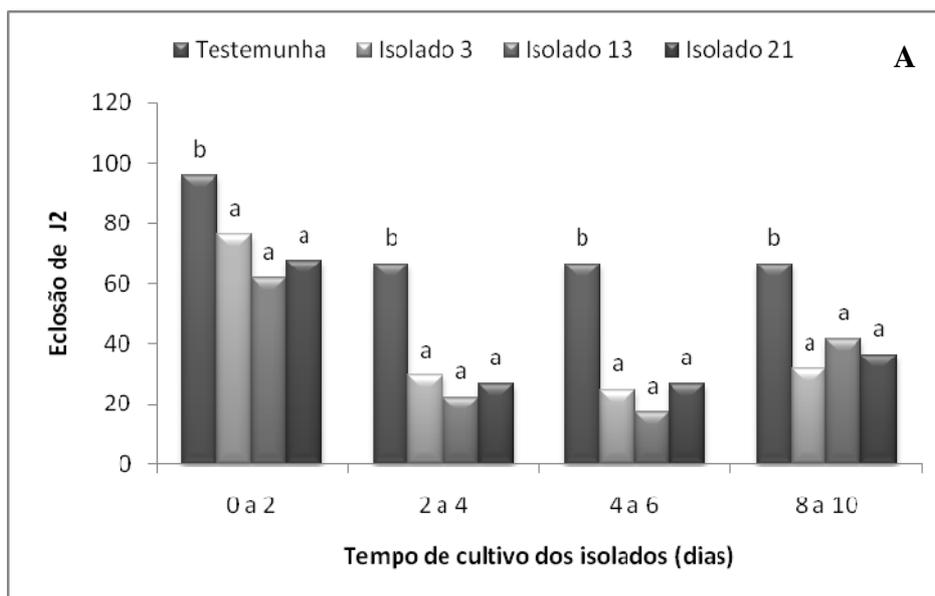
delineamento inteiramente casualizado, com seis repetições, três isolados (3, 13 e 21) de FO e quatro períodos de crescimento das culturas fúngicas: 0, 2, 4 ou 8 dias. As placas foram fechadas hermeticamente com Parafilm[®] e colocadas em BOD a 25°C no escuro, por 48 h. Avaliaram-se, então, os números totais de J₂ eclodidos e o desenvolvimento embrionário em 50 ovos, em seis contagens, obtendo-se a média que representou o valor para cada uma das placas, em que uma placa foi considerada uma repetição. Os valores foram calculados em porcentagem da população total de ovos (2000 ovos).

Análise dos dados: utilizou-se o programa Sisvar versão 4.6 para a realização da análise de variância (ANOVA). As médias de cada tratamento foram agrupadas e diferenciadas pelo teste de Scott & Knott (1974), a 5% de significância. Para as variáveis imobilidade e mortalidade de J₂ influenciadas pelos COVs das colônias dos isolados de FO, utilizou-se análise de regressão

3 RESULTADOS

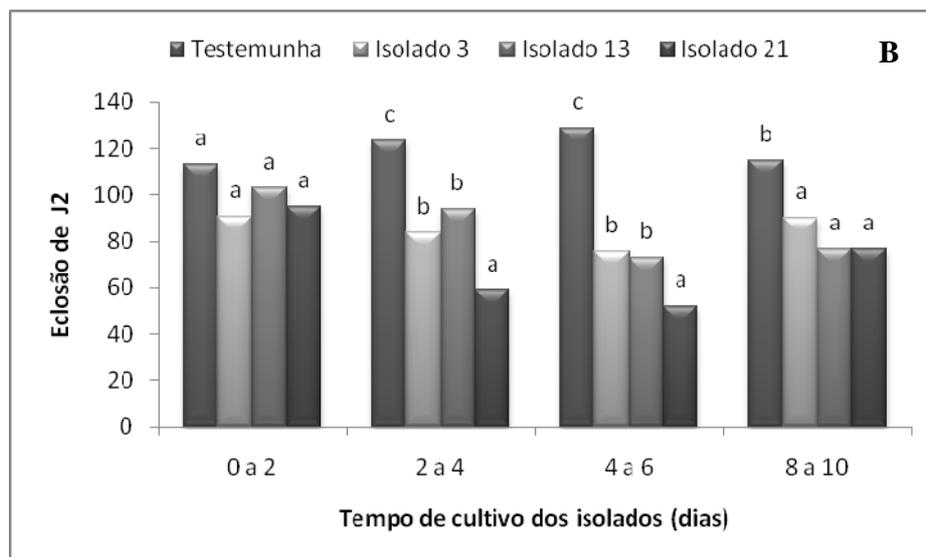
Atividade de compostos orgânicos voláteis (COVs) de *Fusarium oxysporum* em ovos de *Meloidogyne incognita* pela técnica de Botelho et al., 2011: A eclosão de J₂ de *Meloidogyne incognita*, após a exposição por 2 ou 4 dias aos COVs dos três isolados de FO durante os quatro períodos de crescimento das colônias testadas, foi reduzida em comparação à testemunha, quando avaliada logo após a exposição aos COVs, como também quatro dias após. Entretanto, no início do crescimento de FO (0-2 dias), a redução foi menor. A partir desse período até o último período de crescimento fúngico avaliado (8-10 dias), a redução na eclosão de J₂ foi sempre elevada (Figuras 1A e 1B; 2 A e 2B). Na avaliação feita, logo depois de encerrado o período de exposição, os COVs dos isolados de FO reduziram igualmente a eclosão de J₂

(Figuras 1A e 2A). Porém, ovos com dois dias de exposição aos COVs do isolado 21 de FO com 4-6 dias e 6-8 dias de crescimento das colônias tiveram a eclosão de J₂ reduzida significativamente, comparada com os demais isolados (Figura 1B).



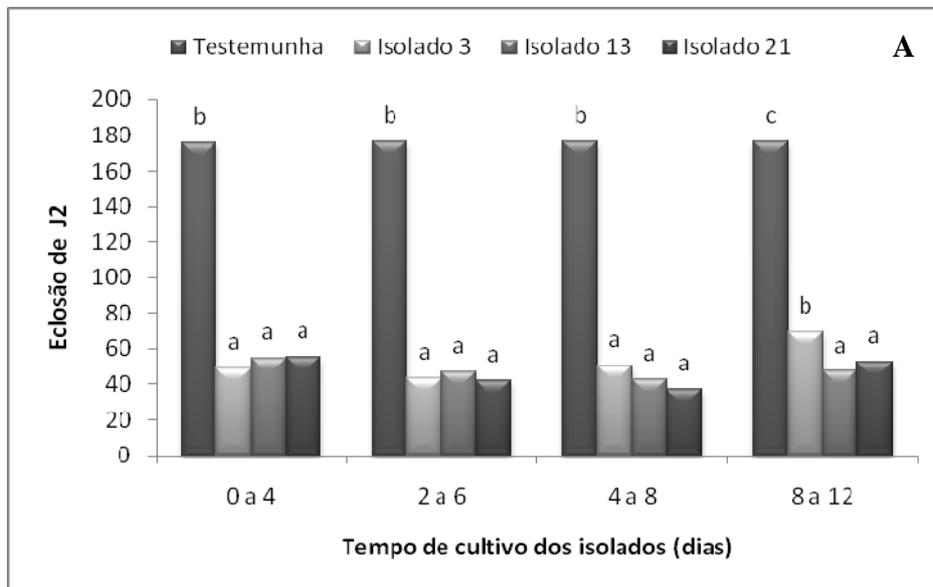
...continua...

Figura 1, cont.



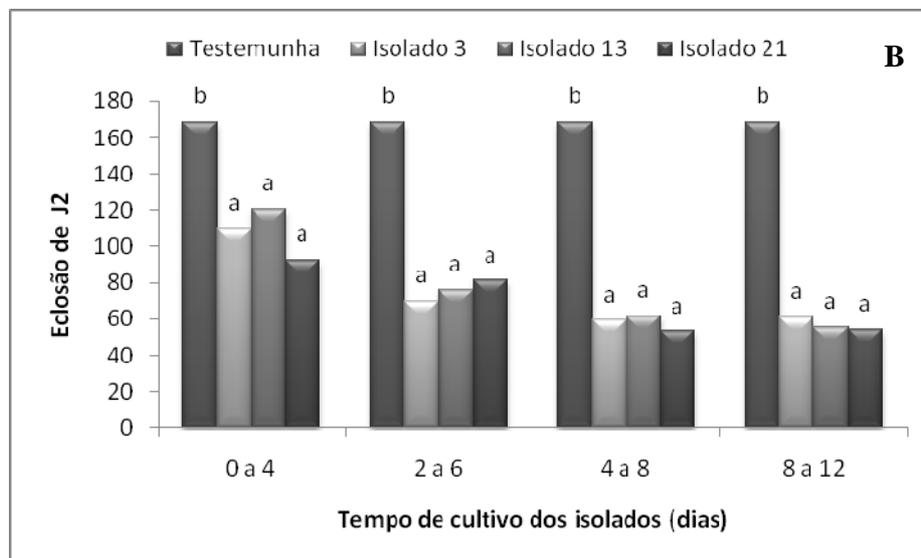
Barras com mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade no mesmo período de amostragem. Os dois dias acrescidos a cada tempo de crescimento da colônia fúngica refere-se à duração da exposição dos ovos aos COVs, período em que o fungo continua crescendo.

Figura 1 Eclosão de juvenis do segundo estágio (J_2) após 48 h de exposição dos ovos de *Meloidogyne incognita* aos compostos orgânicos voláteis produzidos durante a curva de crescimento (4 períodos) de três isolados do fungo *Fusarium oxysporum*. A) Logo após 48 h de exposição. B) Quatro dias em água pura após o encerramento do período de exposição.



...continua...

Fig. 2, cont.



Barras com mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade no mesmo período de amostragem. Os quatro dias acrescidos a cada tempo de crescimento da colônia fúngica refere-se à duração da exposição dos ovos aos COVs, período em que o fungo continua crescendo.

Figura 2 Ecloração de juvenis do segundo estágio (J_2) após 96 h de exposição dos ovos de *Meloidogyne incognita* aos compostos orgânicos voláteis produzidos durante a curva de crescimento (4 períodos) de três isolados do fungo *Fusarium oxysporum*. A) Logo após 96 h de exposição. B) Quatro dias em água pura após o encerramento do período de exposição.

Como os COVs dos três isolados de FO reduziram a ecloração, buscou-se o estudo do desenvolvimento embrionário para definir a fase mais sensível. No crescimento fúngico, durante os quatro períodos avaliados com exposição dos ovos por 48 ou 96 h, a multiplicação celular se desenvolveu normalmente, não parecendo ser afetada pelos COVs. Entretanto, na fase de desenvolvimento embrionário (DE), ocorreu sempre maior número de ovos comparado com a

testemunha, o que resultou em menor número de ovos com juvenis formados internamente (H), principalmente após o segundo período de cultivo dos isolados FO testados (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1 Porcentagem de ovos em diversas fases de desenvolvimento embrionário após a exposição por 48 horas aos compostos orgânicos voláteis produzidos durante a curva de crescimento (4 períodos) de 3 isolados de *Fusarium oxysporum* e seguido de 96 horas em água pura.

Isolado 3				
Período	Fases (%)			
	0	MC	DE	H
Inicial	12,17 c	29,17 b	38,83 a	19,83 b
0-2	10,33 c	16,83 a	56,17 b	16,33 b
2-4	5,33 b	29,00 b	62,83 c	2,83 a
4-8	0,67 a	29,83 b	67,17 c	2,33 a
8-10	0,33 a	28,17 b	69,50 c	2,00 a
Isolado 13				
Período	Fases (%)			
	0	MC	DE	H
Inicial	12,17 c	29,17 b	38,83 a	19,83 c
0-2	9,00 b	14,67 a	63,67 b	12,67 b
2-4	11,83 c	27,50 b	60,33 b	0,33 a
4-8	0,00 a	21,33 b	74,33 c	4,33 a
8-10	0,33 a	23,33 b	75,00 c	1,33 a
Isolado 21				
Período	Fases (%)			
	0	MC	DE	H
Inicial	12,17 b	29,17 a	38,33 a	19,83 b
0-2	14,17 b	17,17 a	51,33 a	17,33 b
2-4	1,00 a	28,17 a	65,67 b	5,17 a
4-8	0,33 a	31,33 a	66,67 b	1,67 a
8-10	0,00 a	29,17 a	67,00 b	0,67 a

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Fase do desenvolvimento embrionário avaliadas: 0: ovos unicelulares, MC: multiplicação celular, DE: agrupamento das fases (gástrula e “tadpole”), H: ovos com juvenil formado internamente. Os dois dias acrescidos a cada tempo de crescimento da colônia fúngica refere-se à duração da exposição dos ovos aos COVs, período em que o fungo continua crescendo.

Tabela 2 Porcentagem de ovos em diversas fases de desenvolvimento embrionário após a exposição por 96 horas aos compostos orgânicos voláteis produzidos durante a curva de crescimento (4 períodos) de 3 isolados de *Fusarium oxysporum* e seguido de 96 horas em água pura.

Isolado 3				
Período	Fases (%)			
	0	MC	DE	H
Inicial	7,60 a	30,00 b	47,20 a	15,20b
0-4	15,00 b	12,00 a	54,80 b	18,20b
2-6	13,40 b	12,00 a	72,60 c	2,00 a
4-8	16,60 b	8,20 a	74,40 c	0,80 a
8-12	20,40 c	10,20 a	69,40 c	0,00 a
Isolado 13				
Período	Fases (%)			
	0	MC	DE	H
Inicial	7,60 a	30,00 b	47,20 a	15,20 c
0-4	16,40 b	9,40 a	67,60 c	6,60 b
2-6	17,20 b	12,20 a	70,60 c	0,00 a
4-8	21,00 b	10,60 a	68,40 c	0,00 a
8-12	26,40 c	14,60 a	56,80 b	2,20 a
Isolado 21				
Período	Fases (%)			
	0	MC	DE	H
Inicial	7,60 a	30,00 b	47,20 b	15,20 b
0-4	17,00 b	11,60 a	70,60 c	0,80 a
2-6	17,20 b	12,60 a	67,40 c	2,80 a
4-8	23,60 c	26,00 b	40,00 a	10,40 b
8-12	21,00 c	30,00 b	51,00 b	5,60 a

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Fase do desenvolvimento embrionário avaliadas: 0: ovos unicelulares, MC: multiplicação celular, DE: agrupamento das fases (gástrula e “tadpole”), H: ovos com juvenil formado internamente. Os quatro dias acrescidos a cada tempo de crescimento da colônia fúngica refere-se a duração da exposição dos ovos aos COVs, período em que o fungo continua crescendo.

Atividade de compostos orgânicos voláteis (COVs) de *Fusarium oxysporum* em juvenis do segundo estágio (J₂) de *Meloidogyne incognita* pela técnica de Botelho et al., 2011: Os COVs produzidos pelos isolados de FO testados reduziram a mobilidade do J₂, logo no limiar de crescimento das colônias (entre 0-2 dias), com alta imobilidade no período de 2 a 4 dias, sem

distinção da eficácia entre isolados (Figura 3A). Já a mortalidade foi mais baixa no período de crescimento de colônias de 0-2 dias, mas atingiu níveis elevados aos 4 dias de crescimento das colônias dos isolados 3 e 21. Porém, a mortalidade causada pelo COV do isolado 13 continuou crescendo até o final de ensaio (Figura 3B).

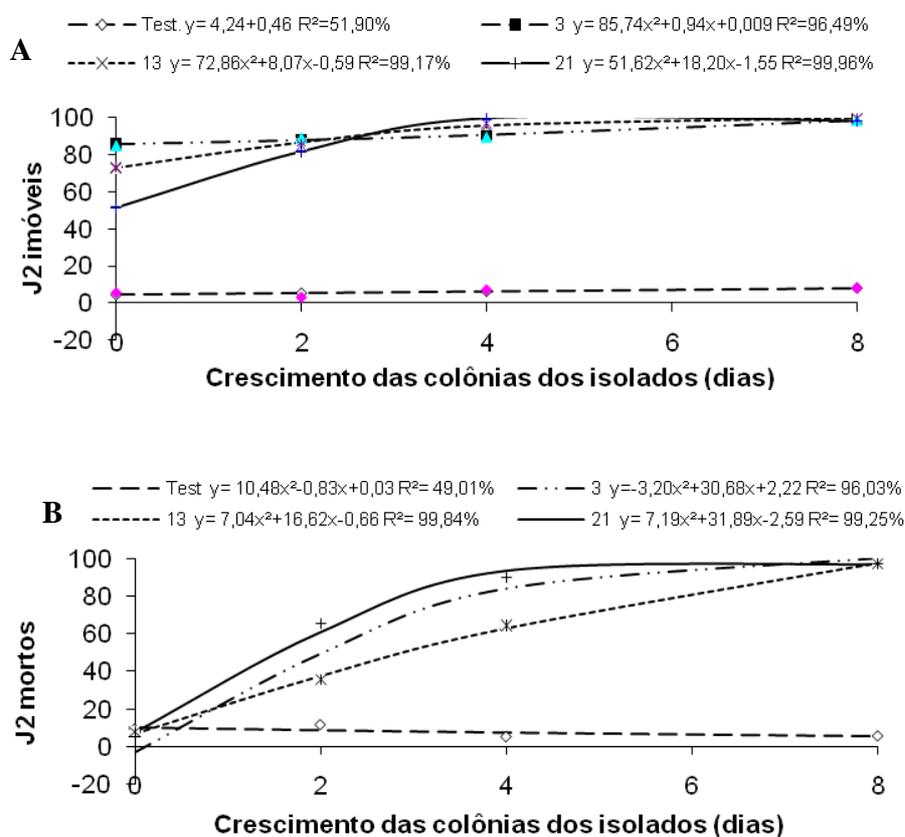
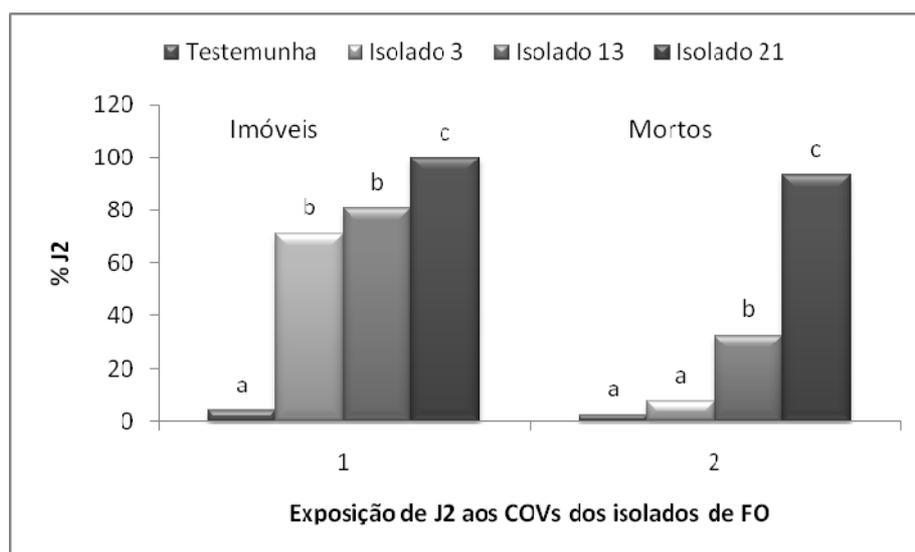


Figura 3 Percentual de juvenis do segundo estágio (J_2) mortos de *Meloidogyne incognita*, mortos após a exposição por 48 h aos compostos orgânicos voláteis produzidos durante quatro períodos avaliados do crescimento das colônias de três isolados de *Fusarium oxysporum*. A) J_2 imóveis, B) J_2 mortos.

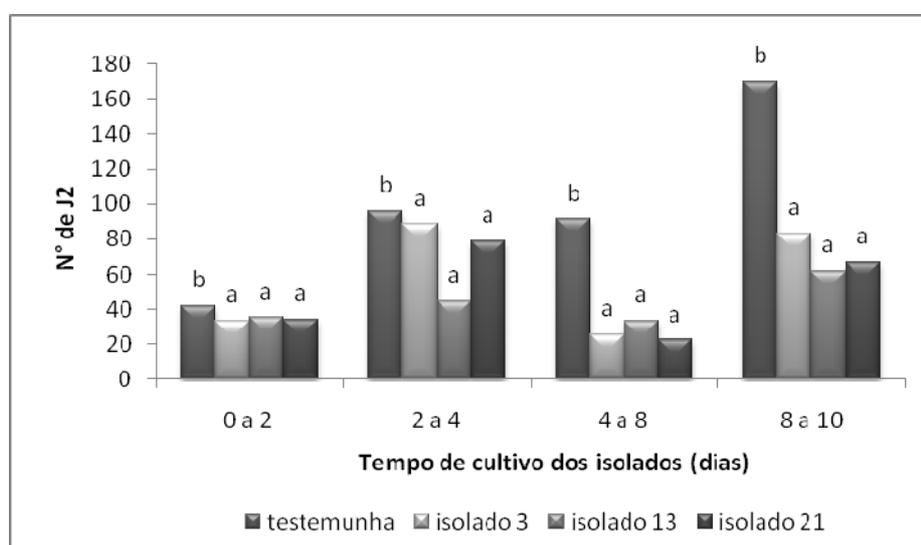
Atividade de compostos orgânicos voláteis (COVs) produzidos por *Fusarium oxysporum* em juvenis de segundo estágio (J₂) de *Meloidogyne incognita* pela técnica de placas bipartidas de Fernando et al., 2005: os COVs produzidos pelos três isolados de FO testados causaram imobilidade significativa aos J₂ de *M. incognita* quando comparados à testemunha. Maior imobilidade e mortalidade foram causadas pelos COVs do isolado 21. Entretanto, bem menor ($P \leq 0,05$) quando expostos aos COVs dos isolados 3 e 13. Todavia, os COVs do isolado 3 não causaram efeito nematicida no J₂ de *M. incognita* (Figura 4).



Barras com mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade no mesmo período de amostragem

Figura 4 Imobilidade e mortalidade de juvenis do segundo estágio (J₂) de *Meloidogyne incognita*, após a exposição por 72 horas aos compostos orgânicos voláteis (COVs) de colônias com 4,5 cm de diâmetro de isolados de *Fusarium oxysporum* (FO).

Atividade de compostos orgânicos voláteis (COVs) de *Fusarium oxysporum* em ovos de *Meloidogyne incognita* pela técnica de placas bipartidas Fernando et al., 2005: Os COVs produzidos pelos três isolados de FO reduziram semelhantemente ($P \leq 0,05$) a eclosão de J_2 de *M. incognita* quando comparada com a testemunha. Entretanto, a partir do quarto dia de crescimento das culturas, a diferença foi mais pronunciada entre a eclosão na testemunha e aquela resultante da exposição aos COVs dos isolados (Figura 5).



Barras com mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade no mesmo período de amostragem. Os dois dias acrescidos a cada tempo de crescimento da colônia fúngica refere-se à duração da exposição dos ovos aos COVs, período em que o fungo continua crescendo.

Figura 5 Eclosão de juvenis do segundo estágio (J_2) após 48 h de exposição dos ovos de *Meloidogyne incognita* aos compostos orgânicos voláteis produzidos por colônias de três isolados de *Fusarium oxysporum* em quatro períodos de crescimento.

4 DISCUSSÃO

A produção dos compostos orgânicos voláteis (COVs) por fungos tem sido conhecida há muito tempo (Tamimi & Hutchinson, 1975; Campbell, 1989). Entretanto, os estudos sobre a toxicidade de COVs a nematoides têm sido enfatizados na década atual (Riga et al., 2008; Campos et al., 2010). Nos estudos aqui desenvolvidos, observou-se que FO produz COVs tóxicos aos ovos e J₂ de *M. incognita* demonstrando outro modo de ação desse fungo aos nematoides de galhas. Como este fungo é encontrado em solos e em cistos de nematoides (Morgan-Jones et al., 1981), o controle biológico pode ser operativo no campo. Tem-se demonstrado que FO produz COVs tóxicos a fungos (Gilardi et al., 2005), porém ainda não tem sido notificado o efeito tóxico a ovos de *Meloidogyne* spp. Freire et al., 2011, demonstraram toxicidade de COVs de isolados de FO a *M. incognita*. Mendonza e Sikora (2009) encontraram redução de 70% da população de *Radopholus similis* aplicando FO em mudas de bananeira, porém não mencionaram que tal efeito fosse relacionado aos COVs.

A redução na eclosão de J₂, observada nos testes *in vitro* pelos COVs de FO, neste trabalho, parece ser resultante da penetração dos voláteis na fase de desenvolvimento do embrião, período em que inicia a fragilização das barreiras internas do ovo (membrana e camada lipídicas), e se completa na fase de J₂ dentro do ovo (Jones et al., 1998). Essas barreiras à penetração de moléculas tóxicas dentro do ovo ainda estão intactas na fase de multiplicação celular (Lee & Atinkson, 1977).

A rapidez na redução da mobilidade de J₂ de *M. incognita* pelos COVs de FO levará o nematoide à letargia retardando o seu ciclo de vida. Redução em torno de 70% na mobilidade de J₂ de *Meloidogyne chitwoodi*, *Paratrichodorus allius* e *Pratylenchus penetrans* foi encontrada por Riga et al. (2008). Entretanto, os isolados de FO demonstraram diferentes ações nematicidas aos J₂ de *M.*

incognita nos períodos de crescimento das colônias anterior a oito dias. Esses estudos têm sido, na maioria, conduzidos com placas bipartidas (Fernando et al., 2005), em que o nematoide teste só pode ser colocado ao lado da fonte produtora do COVs (fungo) no momento de sua vedação. Entretanto, na técnica em que se utilizam tubos Supelco[®] (Botelho et al., 2011), o nematoide teste pode ser introduzido a qualquer momento do crescimento fúngico, possibilitando, portanto, estudar a produção de COVs durante o transcorrer do crescimento da colônia.

Os COVs de FO são tóxicos a ovos e J₂ de *M. incognita*. São produzidos diferentemente durante o crescimento da colônia causando, desde o seu limiar de crescimento, imobilidade e mortalidade dos J₂, progressivas até atingir o máximo aos oitos dias de crescimento das colônias.

LITERATURA CITADA

BONETI, J. I. S.; FERRAZ, S. Modificação do método de Hussey e Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 6, n. 3, p. 553, out. 1981.

BOTELHO, A. O. et al. Fatores de supressividade a *M. exigua* na rizosfera cafeeira no campo: nova técnica para avaliação de compostos orgânicos voláteis tóxicos a fitonematóides. **Biological Control**, 2011. (Prelo)

BOTH, C. The Genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England. 1971.

CAMPBELL, R. **Biological control of microbial plant pathogens**. Sidney: C.U.P., 218p. 1989.

CAMPOS, V. P.; PINHO, R. S. C.; FREIRE, E. S. Volatiles produced by interacting microorganisms potentially useful for the control of plant pathogens. **Ciência e Agrotecnologia**. Lavras, v. 34, p. 525-535, may/jun 2010.

CAMPOS, V. P.; VILLAIN, L. Nematode parasites of coffee and cocoa. In: LUC, M., SIKORA, R. A.; BRIDGE, J. **Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture**. Wallingford UK. CAB. Internacional, p. 529-579, 2005.

CARNEIRO, R.G.; ALTÉIA, A.A.K.; BRITO, J.A. Levantamento da ocorrência e da frequência de espécies e raças fisiológicas de *Meloidogyne* no Nordeste do Paraná. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, 16., 1992, Lavras. Resumos... Lavras: SBN, 1992. p. 44.

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

CONAB. Disponível em:

<<http://www.redebomdia.com.br/Noticias/Economia/30285/Producao+de+cafe+em+2010+deve+ser+quase+20%25+maior+do+que+a+do+ano+passado>>.

Acesso em: 21 out. 2010.

DIEDHIU, P. M. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi and a non-pathogenic *Fusarium oxysporum* on *Meloidogyne incognita* infestation of tomato. **Mycorrhiza**, v. 13, p. 199–204, jan. 2003.

EVANS, K.; TRUDGILL, D. L.; WEBSTER, J. M. Plant parasitic nematodes in temperature agriculture. CAB Internacional, Wallingford, UK. 1993. 648p.

FERNANDO, W. G. D. et al. Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 37, n. 5, p. 955-964, 2005.

FREIRE, E. S. et al. Volatile substances on the antagonism between fungi, bacteria and *Meloidogyne incognita* and potentially fungi for nematode control. **Journal of Nematology**, 2011. (enviado e aceito para publicação).

GILARDI, G. et al. Seed dressing to control *Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucae*. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v. 112, p. 240–246, 2005.

HALLMANN, J.; SIKORA, R.A. Influence of *Fusarium oxysporum*, a mutualistic fungal endophytic, on *Meloidogyne incognita* infection of tomato. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v. 101, p. 475–481, 1994.

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

JONES, P.W.; TYLKA, G.L.; PERRY, R.N. Hatching. In: PERRY, R. N.; WRIGHT, D.J. **The physiology and Biochemistry of free-living and plant-parasitic Nematodes**, p. 438, 1998.

LEE, D.L. ATKINSON, H.J. **Physiology of nematodes**. New York: Columbia University, p. 215, 1977.

MENDOZA, A. R.; SIKORA, R. A. Biological control of *Radopholus similis* in banana by combined application of the mutualistic endophytic *Fusarium oxysporum* strain 162, the egg pathogen *Paecilomyces lilacinus* strain 251 and the antagonistic bacteria *Bacillus firmus*. **BioControl**, v. 54, p. 263–272, 2009.

MORGAN-JONES, G.; OWNLEY-GINTIS, B.; RODRIGUEZ-KABANA, R. Fungal colonization of *Heterodera glycines* cysts in Arkansas, Florida, Mississippi, and Missouri soils. **Nematropica**, v. 11, p. 155–164, 1981.

OLIVAIN, C.; ALABOUVETTE, C. Colonization of tomato root by a non-pathogenic strain of *Fusarium oxysporum*. **New Phytologist**, v. 137, p. 481 – 494, 1997.

RIGA, E.; LACEY, L. A.; GUERRA, N. *Muscodor albus*, a potential biocontrol agent against plant-parasitic nematodes of economically important vegetable crops in Washington State, USA. **Biological Control**, Orlando, v. 45, p. 380-385, jun. 2008.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, v. 30, n. 2, p. 507-512, 1974.

TAMIMI, K. M.; HUTCHINSON, S. A. Differences between the biological effects of culture gases from several species of *Trichoderma*. **Transactions of the British Mycological Society**. London, v. 64, n. 3, p. 455-463, 1975.