



LARA NASCIMENTO GUIMARÃES

**COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS EMITIDOS PELAS RAÍZES
DE TOMATEIRO NA ATRAÇÃO E REPELÊNCIA DE *Meloidogyne
javanica*: NOVA TÉCNICA EM VASO**

**LAVRAS – MG
2022**

LARA NASCIMENTO GUIMARÃES

**COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS EMITIDOS PELAS RAÍZES
DE TOMATEIRO (*Solanum lycopersicum*) NA ATRAÇÃO E
REPELÊNCIA DE *Meloidogyne javanica*: NOVA TÉCNICA EM VASO**

Dissertação 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 Mestre.

Prof. Pós Dr. Vicente Paulo Campos
Orientador

**LAVRAS – MG
2022**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Guimarães, Lara Nascimento.

Compostos orgânicos voláteis emitidos pelas raízes de tomateiro na atração e repelência de *Meloidogyne javanica*: nova técnica em vaso / Lara Nascimento Guimarães. - 2022.

48 p. : il.

Orientador(a): Vicente Paulo Campos.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2022.

Bibliografia.

1. Quimiotaxia. 2. nematoide de galhas. 3. fitonematoides.
I. Campos, Vicente Paulo. II. Título.

LARA NASCIMENTO GUIMARÃES

**COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS EMITIDOS PELAS RAÍZES
DE TOMATEIRO (*Solanum lycopersicum*) NA ATRAÇÃO E
REPELÊNCIA DE *Meloidogyne javanica*: NOVA TÉCNICA EM VASO**

Dissertação 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 Mestre.

APROVADA em 03 de fevereiro de 2022.
Pós Dr. Vicente Paulo Campos DFP/ UFLA
Dr. Filippe Elias de Freitas Soares DQI/UFLA
Dr. Rodrigo Vieira da Silva Ifgoiano-Campus Morrinhos

Prof. Pós Dr. Vicente Paulo Campos
Orientador

**LAVRAS – MG
2022**

Dedico este trabalho de pesquisa aos meus pais: Najla Nascimento Guimarães e César Tales Guimarães da Silva, minha irmã Nathália Nascimento Guimarães e meu namorado Gabriel Menezes de Souza.

‘Faça o que deve ser feito e faça bem feito. Fazendo a sua parte Deus se encarregará de prosperar o seu sucesso’.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me mantido no caminho certo, me dado forças e esperança de que todo obstáculo que aqui passei era por um bem maior.

Sou grata aos meus pais Najla e César, minha irmã Nathália e meu namorado Gabriel pelo apoio, paciência e persistência que me deram durante os momentos bons e ruins.

À Universidade Federal de Lavras por me proporcionar a realização de um sonho.

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

Ao Prof. Dr. Vicente Paulo Campos, pela orientação e suporte para todo o desenvolvimento da dissertação; Willian César Terra pelos ensinamentos e paciência no decorrer desses dois anos do mestrado; ao Professor de química da UFLA Dr Marcio Pedroso por ter contribuído com as análises dos experimentos, a minha grande amiga Pamella pelo companheirismo, apoio e ajuda nos experimentos, aos colegas do laboratório de nematologia da UFLA: Paulo, Leticia e Daniele e aos meus amigos da fitopatologia e melhoramento genético: Gabriella, Tiago e Ananda por sempre estarem do meu lado me apoiando.

Agradeço também aos membros da banca de dissertação Prof. Dr. Rodrigo Vieira, Prof. Dr Cícero José, Prof. Dr. Filipe Elias e Dra. Rafaela Araújo por terem aceitado compor a banca e contribuir com o meu desenvolvimento profissional.

MUITO OBRIGADA!!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	15
2.1. Objetivo Geral	15
2.2. Objetivos Específicos	15
3. REFERENCIAL TEÓRICO	15
3.1. <i>Meloidogyne javanica</i> (KOFOID & WHITE, 1919) CHITWOOD, 1949	15
3.2. Compostos orgânicos voláteis	17
3.3. Técnicas empregadas para identificação de quimiotaxia de patógenos	19
4. MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1. Obtenção do inóculo de <i>Meloidogyne Javanica</i>	20
4.2. Desenvolvimento de nova técnica para estudo de quimiotaxia de nematoides em solo	21
4.3. Caracterização dos voláteis emitidos por raízes de tomateiro por cromatografia gasosa	26
4.4. Quimiotaxia <i>in vitro</i> de J2 de <i>Meloidogyne javanica</i> pelos compostos orgânicos..... voláteis de raízes e caules de tomateiro.....	28
4.5. Quimiotaxia em vasos de J2 de <i>Meloidogyne javanica</i> pelo composto	
ethylexanol encontrado nas emissões de raízes de tomateiro.....	29
4.6. Delineamento experimental e análise estatística	30
5. RESULTADOS	30
5.1- Desenvolvimento de nova técnica para estudo de quimiotaxia de nematoides em solo	30
5.2- Quimiotaxia em vasos utilizando J2 de <i>Meloidogyne javanica</i> e tomateiro	31
5.3- Caracterização dos voláteis emitidos por raízes de tomateiro.....	33
5.4- Quimiotaxia <i>in vitro</i> de J2 de <i>Meloidogyne javanica</i> pelos compostos orgânicos voláteis de raízes e caules de tomateiro.....	34

5.5. Quimiotaxia em vasos de J2 de <i>Meloidogyne javanica</i> pelos compostos ethylexanol e carvacrol.....	37
6. DISCUSSÃO	38
7. CONCLUSÕES.....	41
8. REFERÊNCIAS	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resumo da anova sobre o efeito do estímulo da planta de tomate na migração dos juvenis de segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne javanica</i> , nas diferentes regiões dos vasos preenchidas com substrato.....	31
Tabela 2. Recuperação de juvenis de segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne javanica</i> pelo método de Jenkins (1964) nos tratamentos com tomate e sem planta. O tratamento sem tomate se diferiu do tratamento com tomate onde o * indica diferença estatística ($P < 0,05$) entre médias da mesma coluna de acordo com o teste T.	31
Tabela 3. Distribuição dos J2 de <i>Meloidogyne javanica</i> nas diversas regiões no ensaio de quimiotaxia em vasos usando tomateiro.....	32
Tabela 4. Compostos orgânicos voláteis identificados na raiz e caule de tomateiro cv. Santa Clara pelo cromatógrafo a gás, acoplado a um espectrômetro de massas SPME -GC-MS:	33
Tabela 5. Dados da quimiotaxia dos J2 de <i>M. javanica</i> composto por: moléculas testadas (carvacrol, ethylexanol, hexanol, 1-menthol, metanol, tetradeceno, tridecanal), número de repetições por tratamento, índice de quimiotaxia (IQ) e desvio padrão (DP).	35

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Esquema ilustrativo do ciclo de vida do fitonematoide *Meloidogyne javanica*. 16
- Figura 2. A. Vista lateral dos cilindros metálicos com 10 cm de altura, B. Vista de cima dos cilindros com as dimensões: 5, 7 e 11 cm de diâmetro. Estes cilindros foram utilizados como moldes para as telas excludora de raízes e delimitadoras de regiões, para dispor as telas no vaso.....23
- Figura 3 A. cilindro de metal envolto por telas. B Telas delimitadoras de regiões: regiões atrativas 1 e 2, neutra e repelente (Telas 5, 7 e 11 cm). No interior da tela de 5 cm de diâmetro foi transplantada a muda de tomate, tal região é denominada região atrativa 1.....23
- Figura 4. A: Distribuição das regiões avaliadas, denominadas: A1 (*região atrativa 1*): expansão das raízes delimitadas pela tela de 5 cm de diâmetro, A2 (*região atrativa 2*): área atrativa isenta de raízes delimitada pelas telas de 5 cm e 7 cm de diâmetro, N (*região neutra*): área de inoculação delimitada pelas telas de 7 cm e 11 cm de diâmetro e por fim a *região de repelência* R: delimitada pela tela de 11 cm de diâmetro e a borda interna do vaso. Figura B: Disposição dos cilindros metálicos envoltos pelas telas excludoras dentro do vaso plástico. Os cilindros metálicos eram apenas suportes temporários das telas até adicionar o substrato. Após sua adição eles eram removidos ficando apenas as telas para delimitar as áreas dentro do vaso.24
- Figura 5. Região repelente (área delimitada entre a borda interna do vaso e a borda externa da região neutra), B: Região neutra (área delimitada pela tela excludora maior de 2 mm de abertura e a tela excludora da região atrativa 2); C: Região atrativa 2 (delimitada pela tela excludora de raízes e a região neutra); D: Região atrativa 1, onde a muda de tomate é transplantada no tratamento com tomate (limitada pela tela excludora de 0,025cm de abertura).....24
- Figura 6. As quatro regiões do tratamento com tomate, separadas para extração de solo e a área central (5 cm de diâmetro) que foi usada para extração de juvenis de segundo estágio no substrato e coloração de raízes.25
- Figura 7. Experimento de quimiotaxia em vaso com os tratamentos com e sem as mudas de tomateiro, contendo as quatro regiões delimitadas pela pelas excludoras de raízes e delimitadora de regiões.....26
- Figura 8. Germinação de sementes de tomateiro para coleta de material para extração de voláteis pelo cromatógrafo.....27
- Figura 9. Tubos de microextração em fase sólida (SPME) contendo 1 g de raízes e caules de tomate 'Santa Clara' e água como tratamento controle, e posteriormente levados ao laboratório

de química da UFLA para posteriormente realizar a cromatografia gasosa no cromatógrafo a gás acoplado um espectrômetro de massas GC-MSQP20.....	28
Figura 10. Esquema usado para avaliar juvenis de segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne javanica</i> por quimiotaxia in vitro empregando placa de Petri contendo agar-água. Foram infestados 100 juvenis de segundo estágio na área neutra (A). Na área teste foi colocado a molécula a testar e na área controle foi adicionado apenas solvente da molécula estudada. ...	29
Figura 11. Número médio de juvenis de segundo estágio de <i>Meloidogyne javanica</i> nas diferentes regiões dos vasos preenchidos com substrato no tratamento (tomate) e controle (sem plantas). (A) região atrativa 1, (B) região atrativa 2, (C) região neutra, (D) região repelente. * indica diferença estatística ($P < 0,05$) entre médias de acordo com o teste T de Student O nível de significância é indicado por: * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$; NS = não significativo.....	32
Figura 12. Boxplot do número de nematoides por regiões: atrativa 1, atrativa 2, neutra e repelente; em (A) controle e (B) tomate. Cada ponto representa uma repetição dos dados observados. As caixas indicam os percentis 25 e 75, as linhas verticais indicam os percentis 25 e 75, as linhas verticais indicam os percentis 5 e 95. A linha horizontal na caixa representa a mediana.....	33
Figura 13. Boxplot do número de nematoides recuperados na região atrativa 1 em cada molécula testada (carvacrol, ethylexanol, hexanol, 1-menthol, metanol, tetradeceno e tridecanal). (A) ensaio 1 e (B) ensaio 2. Cada ponto representa uma observação. As caixas indicam os percentis 25 e 75, as linhas verticais indicam os percentis 5 e 95. A linha horizontal na caixa representa a mediana.....	36
Figura 14. Quimiotaxia in vitro da atratividade dos compostos orgânicos voláteis: ethylexanol, carvacrol e hexanol demonstrando sua atratividade local (molécula depositado dentro do círculo branco).....	37
Figura 15. Quimiotaxia in vivo de <i>Meloidogyne javanica</i> aos compostos orgânicos voláteis em diferentes doses: carvacrol- controle positivo (3 mL e 5 mL) e ethylexanol (1 mL, 3 mL e 5 mL). Controle negativo (água). Médias com a mesma letra não diferem significativamente ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey.....	37

RESUMO

O *Meloidogyne javanica* é um patógeno de grande importância econômica, causando prejuízos em culturas de grande escala como o tomateiro. Este fitoparasita possui órgãos sensoriais que permitem o reconhecimento de semioquímicos presentes na solução do solo e seu direcionamento até as raízes das plantas. No presente trabalho desenvolvemos uma técnica para o estudo da quimiotaxia de juvenis de segundo estágio (J2) de *M. javanica* a semioquímicos. Pela primeira vez foi usada uma técnica que possibilita separar as regiões do substrato do vaso a partir da rizosfera do tomateiro em *regiões atrativas 1 e 2, neutra e repelente* usando telas que permitiram livre movimento dos J2 de *M. javanica*. Mediante o auxílio da nova técnica constatou-se que a rizosfera do tomateiro na *região atrativa 1* altera o perfil de distribuição dos J2 de *M. javanica* comparado com a tratamento controle, sem a planta. A rizosfera do tomateiro causou uma quimiotaxia positiva, atraindo a maioria dos J2 para a *região atrativa 1* contrastando com o controle, onde teve uma menor incidência. Foram encontrados 24 compostos orgânicos voláteis (COVs) nas emissões das raízes do tomateiro em análise feita no cromatógrafo a gás, acoplado a um espectrômetro de massas GC-MSQP20 Ultra (Shimadzu, Japan) equipado com injetor automático para líquido e gases. Pela primeira vez constatou-se que o componente do volátiloma das raízes do tomateiro ethylexanol causa alta atração e que os COVs hexanol e 1-menthol também atraem J2 de *M. javanica*. Com o emprego da nova técnica, constatou-se pela primeira vez, que as quantidades de 1mL e 3mL de ethylexanol atraíram significativamente os J2. A nova técnica possui uma grande precisão nas avaliações quantitativas dos nematoides nos processos atrativos e repelentes por trabalhar com todo o substrato. Também apresenta um baixo custo e economiza tempo, já que pode ser realizada em casa de vegetação com duração de apenas cinco dias de desenvolvimento, além de apresentar uma excelente aproximação com a realidade das pesquisas realizadas a campo.

Palavras-Chave: Quimiotaxia, nematoide de galhas, telas excludoras, fitonematoides.

ABSTRACT

Meloidogyne javanica is a pathogen of great economic importance, causing damage to large-scale crops such as tomato. This phytoparasite has sensory organs that allow the recognition of semiochemicals present in the soil solution and their direction to the roots of the plants. In the present work we developed a technique to study the chemotaxis of second-stage juveniles (J2) of *M. javanica* to semiochemicals. For the first time, a technique was used that makes it possible to separate the regions of the pot substrate from the tomato rhizosphere into *attractive 1* and 2, *neutral* and *repellent regions*, using screens that allowed free movement of *M. javanica* J2. With the aid of the new technique, it was found that the tomato rhizosphere in the *attractive region 1* changes the distribution profile of *M. javanica* J2 compared to the control treatment, without the plant. The tomato rhizosphere caused a positive chemotaxis, attracting most of the J2 to the *attractive region 1*, in contrast to the control, where it had a lower incidence. Twenty-four volatile organic compounds (VOCs) were found in the emissions of tomato roots in the analysis performed in a gas chromatograph, coupled to a GC-MSQP20 Ultra mass spectrometer (Shimadzu, Japan) equipped with an automatic injector for liquid and gases. For the first time it was found that the volatiloma component of tomato roots ethylhexanol causes high attraction and that the VOCs hexanol and 1-menthol also attract J2 from *M. javanica*. Using the new technique, it was found for the first time that the amounts of 1mL and 3mL of ethylhexanol significantly attracted J2. The new technique has great precision in the quantitative evaluations of nematodes in attractive and repellent processes by working with the entire substrate. It also has a low cost and saves time, since it can be carried out in a greenhouse with a duration of only five days of development, in addition to presenting an excellent approximation with the reality of research carried out in the field.

Keywords: Chemotaxis, root-knot nematode, exclusion screens, phytonematodes.

1. INTRODUÇÃO

A produção de hortaliças tem grande importância social e econômica, na alimentação, geração de empregos e desenvolvimento regional (CARVALHO et al., 2014). Destaca-se a cultura do tomate (*Solanum lycopersicum* L.), hortaliça pertencente à família das Solanáceas, produzida e consumida em todo o mundo (FAO, 2019). A suscetibilidade do tomateiro a fatores bióticos e abióticos como pragas, doenças e variações meteorológicas dificulta o seu cultivo

Os nematoides estão entre os patógenos que mais prejuízos causam à produção de tomate (NICOL et al., 2011). No Brasil, os nematoides de galhas, *Meloidogyne* spp. são os que mais causam redução na produtividade do tomateiro (KOFOID & WHITE, 1919). Estes patógenos possuem uma ampla distribuição geográfica e gama de hospedeiros, sendo mais frequentes em regiões quentes, com solos arenosos e baixo teor de matéria orgânica (SILVA, 2015). Em hortaliças a exemplo do tomateiro os sintomas mais típicos provocados por *Meloidogyne* spp. são: formação de galhas no sistema radicular e na parte aérea nanismo, amarelecimento foliar (CARVALHO, 2017), dependendo da densidade populacional deste patógeno no solo, o cultivo do tomateiro se torna inviável na área.

Os fitonematoides possuem órgãos sensoriais presentes na cutícula ou internamente (JONES, 2002), que são responsáveis por orientá-los a longas e curtas distâncias. O direcionamento destes patógenos para as raízes ocorre por meio da atuação de substâncias químicas presentes no solo, como os compostos orgânicos voláteis (COVs) (BIRD, 2004; KIHKA et al., 2017), ácidos tânicos, flavonóides e glicosídeos, que podem atuar como atrativos ou repelentes (CHITWOOD, 2002; RASMANN et al., 2012)

Os COVs liberados pelas plantas podem atuar na comunicação entre plantas vizinhas, na interação com microrganismos presentes no solo (DELORY et al., 2016), em estratégia de defesa da planta contra fitoparasitas (BRILLI et al., 2019) e na atração de polinizadores (RAMYA et al., 2020; DELORY et al., 2016).

Nos últimos anos diversas pesquisas enfocando COVs atrativos e repelentes (KIHKA et al., 2017; KIHKA et al., 2020; MURUNGI et al., 2018; DELORY et al., 2016) vem sendo realizadas com o intuito de desvendar como os fitonematoides se comportam na presença dos COVs presentes no solo e na rizosfera. Muitas técnicas foram desenvolvidas para estes estudos, incluindo aquelas *in vitro* utilizando placas de Petri (WARNOCK et al., 2017; SHIVAKUMARA et al., 2018) e *in vivo* utilizando vasos plásticos com materiais acoplados ou no equipamento olfatômetro para estudo de quimiotaxia (PACHECO et al., 2021; KIHKA et

al., 2020). Embora existam várias técnicas para o estudo da quimiotaxia de fitonematoides, muitas delas apresentam limitações como: custo de equipamentos e técnicas que não correspondem à realidade vivenciada em condições de campo de cultivo. Devido a várias barreiras encontradas para o estudo da quimiotaxia, faz-se necessário o desenvolvimento de técnicas que se aproxime da realidade de campo, que apresente um baixo custo de implementação e represente a realidade da interação dos fitonematoides com os COVs presentes no solo. Além disso, é preciso entender melhor o papel atrativo e repelente de COVs emitidos por raízes de plantas e para isso se faz necessário a utilização de técnica viável para estudos de quimiotaxia em vaso.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Validar a técnica de tela de exclusão utilizando compostos orgânicos voláteis que atraem ou repelem os juvenis de segundo estágio em cultivar de tomateiro suscetível ao nematoide e compostos orgânicos voláteis.

2.2. Objetivos Específicos

- Identificar quais as moléculas presentes nos compostos orgânicos voláteis emitidos por tomateiros que podem atuar como atrativas e repelentes ao *M. javanica*;
- Avaliar in vitro cinco moléculas isoladamente que foram identificadas nos compostos orgânicos voláteis disponíveis para compra utilizando a concentração do *M. javanica* como indicativo de repelência e ou atração a esta molécula.
- Utilizar a técnica com telas em vaso para testar atração ou repelência de juvenis de segundo estágio às moléculas identificadas em cromatografia gasosa.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. *Meloidogyne javanica* (KOFOID & WHITE, 1919) CHITWOOD, 1949

A espécie *Meloidogyne javanica* (KOFOID & WHITE, 1919) CHITWOOD (1949), também conhecida como causadora de galhas, completa seu ciclo de vida em aproximadamente 25 dias a 27 °C. Em temperaturas superiores e inferiores podem retardar seu desenvolvimento

(AGRIOS, 2005). O ciclo de vida do *Meloidogyne* spp. começa a partir da oviposição da fêmea, com média de 700 ovos envolvidos por uma matriz gelatinosa (TORRES, 2019). Para a espécie *M. javanica* na cultura do tomate em condições de ambiente de aproximadamente 29 °C, o surgimento de fêmeas acontece até 15 dias após a penetração no sistema radicular e, em seguida, ocorre a deposição de massa de ovos na área externa da raiz (MOENS et al., 2009). Dentro do ovo ocorre o desenvolvimento embrionário, desenvolvendo o primeiro estágio juvenil (J1) que sofre a primeira ecdise ainda dentro do ovo, passando para o juvenil de segundo estágio (J2) (figura 1). A forma vermiforme infectiva (J2) eclode dos ovos utilizando como auxílio o próprio estilete bucal (ABAD et al., 2009). Após eclodirem os J2 são direcionados até as raízes por quimiotaxia, seguindo um gradiente de exsudatos radiculares liberados pelas plantas (TORRES, 2019).



Figura 1: Esquema ilustrativo do ciclo de vida do fitonematoide *Meloidogyne javanica*.

Durante o processo infectivo o J2, após, introduzir seu estilete bucal na região basal da coifa da raiz, onde ocorre frequente divisão celular migram através dos tecidos utilizando enzimas presentes na glândula esofagiana. Chegando ao tecido parenquimático, próximo ao

cilindro vascular, estabelece seu sítio de alimentação, e em seguida se tornam sedentários, fazendo com que as fêmeas permanecem neste local até o final de seu ciclo (HUSSEY & JANSSEN, 2002; GAL et al., 2006).

3.2. Compostos orgânicos voláteis

Os compostos orgânicos voláteis (COVs) possuem baixo peso molecular, (SILVA et al., 2019). Funcionam como uma ponte de comunicação entre as plantas e microrganismos e macrorganismos, como os polinizadores, animais disseminadores de sementes e patógenos da parte aérea e terrestre (TEIXEIRA, 2016). Os voláteis são liberados pelas plantas no solo a partir do desenvolvimento radicular. Os COVs são constituídos por uma mistura de diversas moléculas com funções, concentrações e liberados em variados pontos do sistema radicular, podendo também oscilar sua natureza química (WILLADINO et al., 2005), e a nível de espécie ou variedade (GONZALEZ-MAS et al., 2011).

O sistema de emissão de (COVs) pode ser ativado a partir do momento em que a planta se identifica em uma situação invasiva por ataques de fitopatogenos, e então esses compostos têm a função de repelir, atrair, ou induzir a defesa indireta. (HOLOPAINEN & BLANDE, 2012) ou pode ser liberado rotineiramente na parte aérea ou pelo sistema radicular se propagando na rizosfera do solo (MWAMBA, 2016).

Os fitonematoides necessitam de compostos sinalizadores liberados pelas plantas hospedeiras para identificar a localização do seu sítio de alimentação (OKA, 2020). Os nematoides do gênero *Meloidogyne*, a exemplo de *M. javanica* e na fase de J2 encontram maior facilidade de identificar COVs presentes nas pontas das raízes, em culturas como tomateiro e trevo de barril (*Medicago truncatula*) em comparação a COVs liberados por plantas do mutante *Medicago truncatula hipernodulante* (ČEPULYTĚ et al., 2018). E assim que detectam, são capazes de se alimentarem e completarem seu ciclo de vida (TEILLET et al., 2013).

Os COVs contêm basicamente hidrocarbonetos. Dentre estes estão inclusos os ácidos carboxílicos, aldeídos, cetonas, éteres, ésteres e álcoois, sendo que os isoprenoides, isopreno e monoterpenos, possuem maior liberação pelas plantas, além dos álcoois e carbonilas (TEIXEIRA, 2016). No sistema radicular de Asteraceae foram encontradas classes de compostos como monoterpenos, monocíclicos, bicíclicos, sesquiterpenos, flavanoides, tiofenos e aromáticos (GIL et al., 2002).

Além de atuarem na quimiotaxia dos nematoides, os COVs também podem atuar como nematicida. Um exemplo é quando os J2 de *M. javanica* entram em contato com acetato de 3-

metilbutila a uma concentração de 500 µg/mL durante 1 h, onde aproximadamente 80% dos J2 morreram (TERRA et al., 2018; SILVA et al., 2019). Mwamba (2016) identificou compostos como os monoterpenos e sesquiterpenos presentes em quatro espécies de plantas: *Tagetes minuta*, *Artemisia annua*, *Bidens pilosa* e *Chrysanthemum cinerariaefolium* que foram repelentes aos J2 de *M. incognita*. Estes compostos também foram observados por Wichittrakarn, et al (2013), tendo reações nematicidas e repelentes para *M. javanica*.

Os COVs além de controlar a densidade populacional de fitonematoides por possuir ação nematicida, podem também ser atrativos ou repelentes ao gênero *Meloidogyne*. Os nematoides identificam estes compostos por meio da percepção quimiossensorial, e posteriormente se orientam em direção as plantas suscetíveis ou hospedeiras (KIHKA et al., 2017). Esses compostos podem ser perceptivos pelos fitonematoides a curta distância, direcionando-os ao hospedeiro mais atrativo. Reynolds et al (2011) ao colocarem duas culturas opcionais, uma teoricamente mais atrativa (tomate) e outra não tão atrativa (arroz), concluíram-se que a primeira atraiu maior quantidade de *Meloidogyne* sendo 4X mais do que a segunda, em rota curta 2 cm de distância da fonte emissora dos voláteis do que quando comparado a longa distância (3,5 cm).

A quimiotaxia influencia a movimentação dos microrganismos, direcionando-os para localização de alimentos, acasalamento e resposta a plantas hospedeiras (WANG et al., 2021). Os J2 de *Meloidogyne* spp., utilizam mecanismos para se direcionarem a favor ou contra as concentrações elevadas de semioquímicos exsudados, reconhecendo-as como: plantas hospedeiras, resistentes ou más hospedeiras (REYNOLDS et al., 2011)

Quando as pistas difusíveis dos COVs estão em forma gasosa elas se dissipam no solo com maior velocidade, estando presentes nos poros ocupados por ar presentes no solo. No entanto quando os COVs são solúveis, funcionam a curta distância ficando mais próximos a rizosfera (TYC et al., 2017; WESTHOFF et al., 2017). São preferíveis para os fitonematoides que as plantas hospedeiras estejam localizadas em regiões mais próximas possíveis, pois estádios infecciosos dos nematoides *Heterodera* spp. e *Meloidogyne* spp. contém reservas lipídicas restritas (CURTIS, 2007).

O sistema nervoso dos fitonematóide é influenciado por estímulo dentre os principais estímulos que influenciam os fitonematoides estão os quimiossensoriais que são identificados por órgãos específicos presentes na morfologia dos nematoides (CURTIS, 2008). Os órgãos sensoriais dos nematoides são compostos por seis papilas labiais externas, quatro papilas cefálicas, dois anfídios localizados na região dos lábios laterais e na região caudal e dois

fasmídeos (JONES, 2002) sendo os anfídios e as papilas cefálicas os mais importantes na identificação de semioquímicos (FERRAZ & BROWN, 2016) como os COVs.

Na cultura do tomate, considerada como padrão de suscetibilidade aos nematoides do gênero *Meloidogyne* foram identificados sete componentes exsudados pelas raízes, dentre eles apenas três (α - e β -cedreno], δ -3-careno, sabineno e salicilato de metila) se comportaram como atraentes a *M. incognita* (MURUNGI et al., 2018). Da mesma forma que as raízes de tomate podem liberar semioquímicos que atraem os fitonematoides, há também a liberação de repelentes como o etileno ou os produtos das vias responsivas ao etileno (ČEPULYTĖ et al., 2018). Em estudo realizado por Duarte et al., (2015) foram identificados voláteis reguladores de genes influenciadores do parasitismo de *Meloidogyne* spp. como as calreticulinas, β -1,4 endoglucanases-1, catepsinas L cisteína proteases, retinóis de ácido graxo proteína de ligação.

Os semioquímicos exsudatos pelas raízes de tomateiro podem afetar desde a eclosão dos J2 de nematoides parasitas (OKA et al., 2009), até sua orientação podendo ser em direção a favor ou contra a planta hospedeira (CURTIS, 2008).

3.3. Técnicas empregadas para identificação de quimiotaxia de patógenos

Para entender o comportamento dos fitonematoides ao se movimentarem no solo em busca de plantas hospedeiras os pesquisadores desenvolveram várias técnicas. A cultura do tomate é a mais estudada quando se trata de COVs, isso devido a sua alta suscetibilidade aos fitonematoides, principalmente aqueles do gênero *Meloidogyne*. Em pesquisas realizadas por Reynolds et al., (2011) foi possível avaliar a quimiotaxia de *M. incognita* ao tomate e outras duas culturas, arroz e mostarda, utilizando uma estrutura de olfatômetro com formato de Y, compostas por duas rotas: longa e curta. Observaram que os J2 de *M. incognita* preferem a rota mais curta e que mesmo quando submetido a rota longa com dupla escolha entre o arroz e o tomate, há a preferência pela cultura do tomate.

Um micro ensaio contendo gel plurônico para acompanhar a reação dos J2 de *M. hapla*, *M. incognita* e *M. javanica* aos semioquímicos liberados pelas pontas de raízes de tomate e *Medicago truncatula* foi proposto por Čepulytė et al., (2018). Com essa finalidade foram depositados 200 J2/ml em seis poços contendo uma solução de PF-127 e tampão (Tris e ácido morfolinoetanossulfônico) e no centro de cada poço foi introduzida uma muda de tomate e *Medicago*. Após 4 horas foram quantificados os J2 e confirmada a atração dos semioquímicos pelas duas culturas testadas.

Os ensaios de dupla escolha vêm sendo cada vez mais empregados nos estudos de quimiotaxia. MURUNGI et al (2018) trabalharam com as culturas de tomate e espinafre, utilizando olfatômetro de dupla escolha, o experimento foi dividido em duas etapas, onde cada cultura foi avaliada com um controle (areia úmida esterilizada) e o tomate contra o espinafre. Os autores observaram que o espinafre produz os compostos 2-isopropil-3-metoxipirazina e tridecano ao passo que o tomate produz o composto salicilato de metila contribuintes para a atratividade de *M. Incognita*.

Somente os estímulos dos COVs liberados por plantas suscetíveis não são suficientes para fazer com que o J2 de *Meloidogyne* spp. encontre o hospedeiro e cause doença na planta, é necessário também que este J2 tenha energia corporal o suficiente para se locomover do local onde está até a fonte emissora de COVs atrativos. Na pesquisa de Rocha et al. (2008), foi avaliada a migração e a perda da energia corporal dos J2 de *M. incognita* quando se deslocavam a diferentes distâncias (0, 2, 4 e 6 cm) de profundidade da raiz de soja. E foi observado que quanto maior a distância percorrida pelos J2 menor era a sua capacidade de parasitar a planta.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Obtenção do inóculo de *Meloidogyne Javanica*

A população pura de *M. javanica* foi caracterizada em PCR e multiplicada inicialmente em tomateiro (*Solanum lycopersicum*), cultivar Santa Clara, cultivado em casa de vegetação. A seguir, foi inoculada em plantas de jiló (*Gilo Group*) e mantidas em casa de vegetação durante 60 dias. Decorrido este período, procedeu-se a extração de ovos de *M. javanica* utilizando-se a técnica proposta por Hussey e Barker (1973) modificado por Boneti & Ferraz (1981) onde as raízes foram imersas em um Becker com água para retirar o excesso do substrato aderido as raízes, picadas em pedaços de aproximadamente 2cm e trituradas no liquidificador com baixa rotação durante 20 segundos, juntamente com solução de hipoclorito de sódio a 0,5% e água em um volume total de 300 mL. A suspensão foi vertida em uma peneira de 200 mesh, sobreposta a uma de 500 mesh. O resíduo da peneira de menor mesh foi descartado. Com a ajuda de uma pisseta com água, o resíduo da peneira de 500 mesh foi recolhido em um Becker.

Em seguida os ovos foram vertidos em um Becker e quantificados em câmara de Peters com auxílio de microscópio fotônico de lente invertida na ampliação de 100x. Os J2 foram obtidos por meio da adaptação da técnica de funil de Baermann (BAERMANN, 1917) onde os

ovos de *M. javanica* foram depositados na peneira de 500 mesh dentro do funil contendo água, no primeiro dia após a deposição dos ovos, o inoculo foi descartado e a partir do segundo dia foram coletados.

Os experimentos com vasos foram conduzidos em sala climatizada do laboratório de Nematologia da Universidade Federal de Lavras, localizada no município de Lavras, região Sul de Minas Gerais. Na sala climatizada a temperatura média foi de aproximadamente 25 °C com fotoperíodo de 12 h: 12 h (claro:escuro).

4.2. Desenvolvimento de nova técnica para estudo de quimiotaxia de nematoides em solo

A metodologia buscou simular um ambiente próximo daquele encontrado pelos nematoides no campo, onde os J2 se encontram em distâncias próximas da rizosfera de culturas de interesse agrônomo e em ambiente composto por solo, irrigado e exposto a luz e escuro (12 h / 12 h) durante cinco dias. Para isso foram utilizados vasos com 12 cm de diâmetro e altura. Para quantificar os J2 migrantes dentro dos vasos, o espaço interno foi dividido em quatro áreas. Foram então confeccionados três cilindros metálicos com 10 cm de altura, nas dimensões de cinco, sete e 11 cm de diâmetros (Figura 2). Os cilindros foram dispostos dentro dos vasos e ao redor deles foram alocadas telas de plástico. O cilindro menor (5 cm) foi envolto por uma tela com 0,025 mm de abertura, para impedir a passagem de raízes, porém permitir a passagem de J2, então denominada de tela excludora de raízes. Os demais cilindros metálicos (sete e 11 cm de diâmetros) foram envoltos por tela com abertura maior (2 mm) com a função de separar as demais regiões dentro do vaso (Figura 4) então denominadas telas delimitadoras de regiões.

Para facilitar a retirada do solo de cada região e evitar perdas, as telas foram costuradas no fundo formando uma “cesta” (Figura 3). Com a inserção destas telas no interior dos vasos, o espaço interior ficava dividido em quatro regiões definidas aqui neste experimento após realização de alguns pré-testes (dados não mostrados) para distância ideal de infestação do solo com os J2, onde os J2 possuem reserva energética o suficiente para se moverem em direção a favor ou contra a fonte emissora de estímulo (Figura 5). As regiões dentro do vaso foram denominadas de: *região atrativa 1* ou *região central*, localizada no centro dos vasos que foi delimitada pela tela de cinco cm de diâmetro, com 0,025 mm de abertura; *região atrativa 2* delimitada pelas telas de cinco e sete cm de diâmetro; *região neutra* delimitada pela tela de sete e 11 cm de diâmetro; e a *região de repelência*, localizada externamente à de 11 cm de diâmetro até a borda interna do vaso. Após a colocação das telas os vasos foram preenchidos com 1 Kg

de areia e solo na proporção 2:1 para facilitar a motilidade dos J2 de *M. javanica* previamente esterilizados em autoclave a 120 °C por 40 minutos. E então os cilindros metálicos foram removidos. Eles serviam apenas de suporte temporário para as telas.

Para quantificar e averiguar o efeito dos exsudados radiculares de tomateiro na migração dos J2 de *M. javanica* estabeleceu-se o ensaio denominado de quimiotaxia em vasos utilizando a metodologia acima, composto por dois tratamentos com e sem o tomateiro composto por oito repetições. Na *região atrativa 1* foi transplantada uma muda de tomateiro com dois pares de folhas verdadeiras. Decorridos sete dias, na *região neutra* foram colocados 3000 J2 de *M. javanica*. Para tanto, utilizou-se uma pipeta para depositar o inóculo em quatro pontos equidistantes a três cm de distância da borda externa da tela de 5 cm de diâmetro, sendo distribuídos aproximadamente 750 J2 por orifício (Figuras 3A e B). Como controle utilizaram-se vasos sem a presença de plantas. Cinco dias após a infestação com o auxílio de cada tela (cesta) as regiões foram criteriosamente separadas e os substratos disponíveis para extração e quantificação dos J2 (Figuras 4 A e B e Figura 6) procedeu-se a extração dos J2 dos substratos (*regiões atrativas 1 e 2*) de acordo com o método de Jenkins (1964) com algumas modificações.

Os solos das diferentes regiões foram agitados em um Becker contendo água e vertido por completo em peneira de 60 mesh sobreposta a peneira de 500 mesh, assim o sobrenadante retido na peneira de 500 mesh foi coletado e depositado em tubos Falcon, posteriormente foram centrifugados a 1700 rpm durante cinco minutos, o sobrenadante foi descartado e os tubos foram preenchidos com sacarose previamente preparada com 454 g de açúcar e completado com 1 L de água. Os tubos Falcon foram agitados e imediatamente foram centrifugados a 2000 rpm durante um minuto, posteriormente o sobrenadante foi vertido cuidadosamente em uma peneira de 500 mesh e lavado utilizando uma pisseta para retirar o excesso de sacarose e evitar grande perda dos J2 presentes na solução. A solução foi vertida em pequenos frascos de vidro. Este processo de centrifugação foi realizado duas vezes para cada amostra de cada região (*atrativa 1 e 2, neutra e repelente*). Após a coleta das amostras, estas foram armazenadas em câmara fria e no dia seguinte iniciaram-se as avaliações, quantificando os J2 presentes em toda a amostra em microscópio de lente invertida a 100x.



Figura 2. A. Vista lateral dos cilindros metálicos com 10 cm de altura, B. Vista de cima dos cilindros com as dimensões: 5, 7 e 11 cm de diâmetro. Estes cilindros foram utilizados como moldes para as telas excludora de raízes e delimitadoras de regiões, para dispor as telas no vaso.



Figura 3 A. cilindro de metal envolto por telas. B Telas delimitadoras de regiões: *regiões atrativas 1 e 2, neutra e repelente* (Telas 5, 7 e 11 cm). No interior da tela de 5 cm de diâmetro foi transplantada a muda de tomate, tal região é denominada *região atrativa 1*.

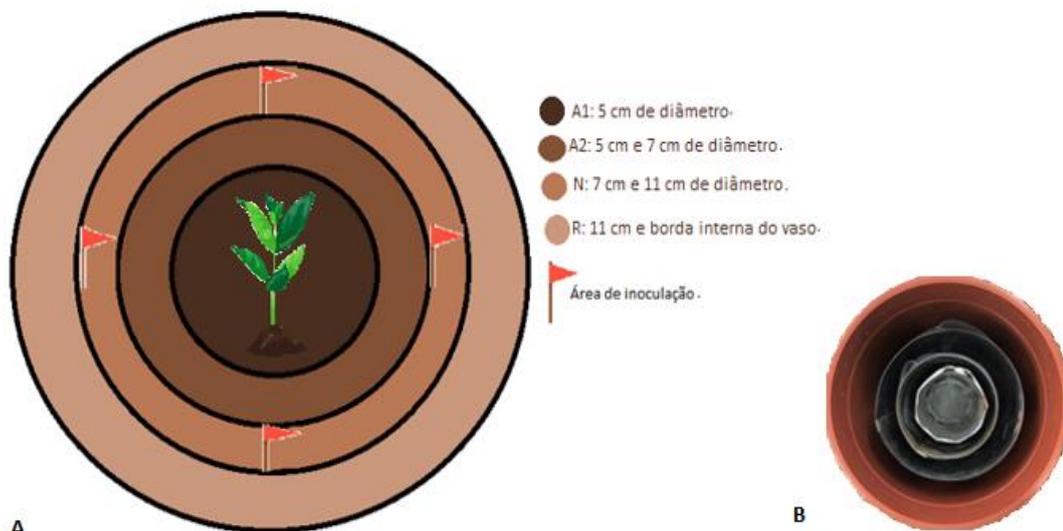


Figura 4. A: Distribuição das regiões avaliadas, denominadas: A1 (*região atrativa 1*): expansão das raízes delimitadas pela tela de 5 cm de diâmetro, A2 (*região atrativa 2*): área atrativa isenta de raízes delimitada pelas telas de 5 cm e 7 cm de diâmetro, N (*região neutra*): área de inoculação delimitada pelas telas de 7 cm e 11 cm de diâmetro e por fim a *região de repelência* R: delimitada pela tela de 11 cm de diâmetro e a borda interna do vaso. Figura B: Disposição dos cilindros metálicos envolvidos pelas telas exclusoras dentro do vaso plástico. Os cilindros metálicos eram apenas suportes temporários das telas até adicionar o substrato. Após sua adição eles eram removidos ficando apenas as telas para delimitar as áreas dentro do vaso.

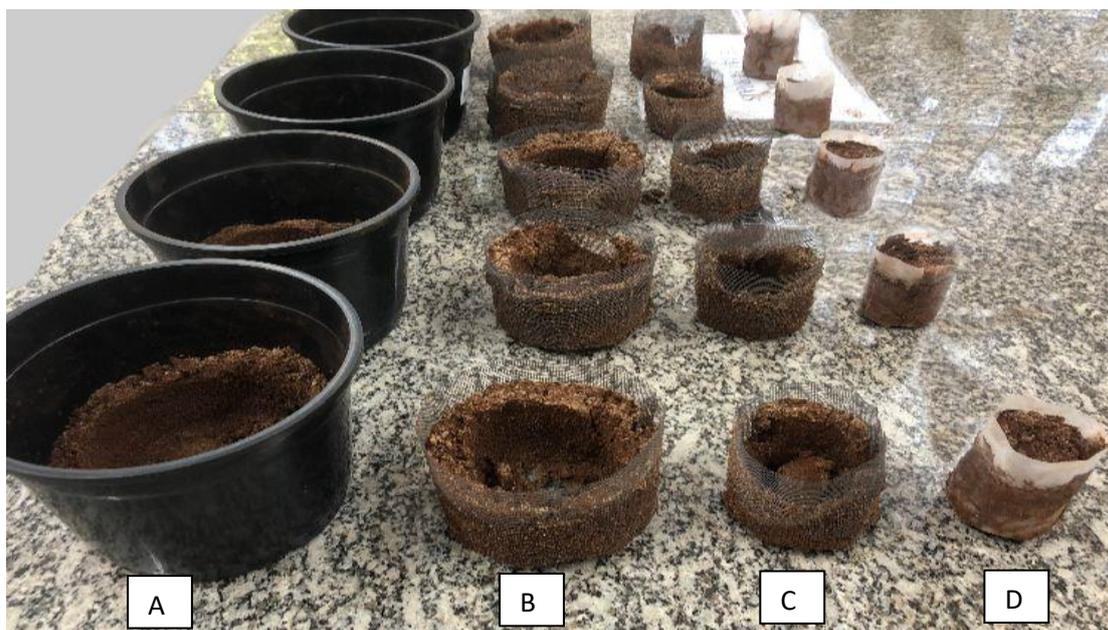


Figura 5. *Região repelente* (área delimitada entre a borda interna do vaso e a borda externa da região neutra), B: *Região neutra* (área delimitada pela tela exclusora maior de 2 mm de abertura e a tela exclusora da região atrativa 2); C: *Região atrativa 2* (delimitada pela tela exclusora de raízes e a região neutra); D: *Região atrativa 1*, onde a muda de tomate é transplantada no tratamento com tomate (limitada pela tela exclusora de 0,025cm de abertura).

No presente ensaio, a muda de tomateiro presente na área central (tela de 0,025 mm) (Figura 6 e Figura 7) foi retirada do substrato, cuidadosamente, lavada em um Becker contendo água e utilizada para coloração de raízes e observação dos J2 que penetraram nas raízes.



Figura 6. As quatro regiões do tratamento com tomate, separadas para extração de solo e a área central (5 cm de diâmetro) que foi usada para extração de juvenis de segundo estágio no substrato e coloração de raízes.

As raízes foram coloridas com fucsina ácida utilizando-se a técnica descrita por (BYRD et al., 1983). As raízes foram em um Becker contendo água, e picadas em aproximadamente 2 cm, e posteriormente foram colocados em solução com concentração de 1,5% de NaOCl, durante 4 minutos. Em seguida as raízes foram lavadas em água corrente por, aproximadamente, 45 segundos e colocadas em água por 15 minutos para retirar o excesso de NaOCl, em seguida foi adicionado 30 mL de água e 1 mL de solução estoque de fucsina ácida, previamente preparada (3,5 g de fucsina ácida diluídas em 250 mL de ácido acético e 750 mL de água destilada). Posteriormente as raízes em solução foi levada ao microondas em potência máxima durante 2 minutos, até levantar fervura. Após o resfriamento, as raízes foram lavadas em água corrente e adicionados 20 mL de glicerina. Após 24 hrs foram montadas placas utilizando placas de vidro e glicerina para evitar o ressecamento das raízes. As amostras foram levadas ao microscópio de lente invertida para quantificação dos J2 de *M. javanica* no interior das raízes e quantificados.



Figura 7. Experimento de quimiotaxia em vaso com os tratamentos com e sem as mudas de tomateiro, contendo as quatro regiões delimitadas pela excluidoras de raízes e delimitadora de regiões.

4.3. Caracterização dos voláteis emitidos por raízes de tomateiro por cromatografia gasosa

As sementes do tomateiro cv. Santa Clara foram previamente desinfestadas, e depositadas em placas de Petri contendo agar-água para evitar a interferência de microrganismos nos COVs emitidos pelas plantas (Figura 8). Em seguida foram levadas para a BOD a 28 °C, e assim que emitido o primeiro par de folhas foi iniciado o procedimento para análise. Na região do caulículo foi feita um corte logo abaixo do cotilédone, assim tanto as raízes quanto os caules seccionados foram colocados separadamente, em frasco de vidro (Supelco) de 20 ml para microextração por fase sólida (SPME) (Figura 9). As raízes e os caules foram cortados em seções de, aproximadamente, 0,5 cm. Em seguida, foi pesado 1,0 g tanto de caule como de raiz para uso na análise de COVs no departamento de química da UFLA pelo cromatógrafo a gás. Foi utilizado um cromatógrafo a gás, acoplado a um espectrômetro de massas GC-MS QP 2010 Ultra (Shimadzu, Japan) equipado com injetor automático para líquidos e gases AOC-5000 (Shimadzu, Japan) e coluna HP-5 (5% ferril-95% dimetilsiloxano), de dimensões 20x0,25 mm x 0,25 μ m. A temperatura do injetor foi de 250°C, da interface de 240°C e a da fonte de íons do detector de 200°C. O injetor foi operado no modo splitless ou no modo split 1:4, de acordo com a intensidade dos picos nas amostras. Como gás de arraste foi utilizado He grau 5.0 a 1,0 ml min⁻¹. A programação da temperatura do forno do GC foi de 40 °C até 160 °C a 3 °C min⁻¹ e então até 240 °C a 10 °C min⁻¹. O espectrômetro de massa por cromatografia em fase gasosa (GC-MS) foi operado no modo de varredura na faixa de 40-350 v. Para identificação dos COVs nas amostras, os espectros de massas de cada pico do

cromatograma foram extraídos através do programa Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System (AMDIS). A identificação dos COVs foi realizada por comparação dos espectros de massas dos picos das amostras com espectros da biblioteca NIST, pelo programa Mass Spectral Search Program v. 1.7 (NIST, Washington 8 DC, USA) e por comparação entre os índices de retenção obtidos experimentalmente (RI Exp.) com os índices de retenção da literatura (RI Lit.) (NIST, 2013; ROHLOFF e BONES, 2005). Para a comparação entre os espectros de massa foram considerados somente picos em que as similaridades entre os espectros foram maiores que 80%. Os índices de retenção experimentais foram obtidos através da injeção de uma série homóloga de alcanos.



Figura 8. Germinação de sementes de tomateiro para coleta de material para extração de voláteis pelo cromatógrafo.



Figura 9. Tubos de microextração em fase sólida (SPME) contendo 1 g de raízes e caules de tomate 'Santa Clara' e água como tratamento controle, e posteriormente levados ao laboratório de química da UFLA para posteriormente realizar a cromatografia gasosa no cromatógrafo a gás acoplado um espectrômetro de massas GC-MSQP20.

4.4. Quimiotaxia *in vitro* de J2 de *Meloidogyne javanica* pelos compostos orgânicos voláteis de raízes e caules de tomateiro

As moléculas utilizadas neste ensaio foram adquiridas no mercado (Sigma-Aldrich) com alto grau de pureza. Foram utilizadas placas de Petri de nove cm de diâmetro esterilizadas e preenchidas com agar-água 2%. Foram estudadas o ethylexanol, 1-menthol, hexanol, tetradeceno e tridecanal, todos identificados pela cromatografia gasosa nas emissões de raízes do tomateiro. Como comparativo (controle) foi estudada a molécula carvacrol relatada como atraente aos J2 de *Meloidogyne* spp. por Oka et al., (2020) e utilizada como controle positivo nos ensaios *in vitro* e *in vivo*. A molécula 1-menthol por ser uma molécula sólida foi preciso diluí-la em metanol na concentração de 500 mg da molécula pura diluída em 1000 μ L de metanol, sendo assim o metanol foi utilizado como controle do 1-menthol. A placa de Petri com agar-água 2% foi dividida em três áreas: 1) área neutra, 2) área teste e 3) área controle de acordo com metodologia de Wang et al., (2019) (Figura 10). Na área teste da extremidade da placa de Petri foi depositado 1 μ L do volátil a testar, na extremidade oposta (área controle), não foi depositado nada. No centro da placa de Petri (área neutra) foram colocados 100 J2 de *M. javanica*. A seguir, a placa foi incubada no escuro a 20 °C por 8 h. Foi, então, quantificado o número de J2 que se moveu a direita e a esquerda do local central de inserção. Em seguida calculou-se o índice de quimiotaxia (IQ).
$$IQ = (\text{número de J2 na área teste} - \text{o número de J2 na área controle}) / \text{número de J2 na área neutra}$$

área controle) / (n° de J2 em área teste + número de J2 na área controle), conforme Saeki et al., (2001).

Após calcular o IQ dos J2 de *M. javanica* foram considerados $IQ \geq 0,2$ altamente atraentes; $0,1 \leq IQ < 0,2$ levemente atraentes; $-0,1 \leq IQ < 0,1$ resposta aleatória $-0,2 < IQ < -0,1$ repelentes; $IQ \leq -0,2$ altamente repelentes. Os experimentos foram repetidos duas vezes e os tratamentos (moléculas presentes no volatiloma da raiz de tomateiro) com no mínimo cinco e no máximo 10 repetições.

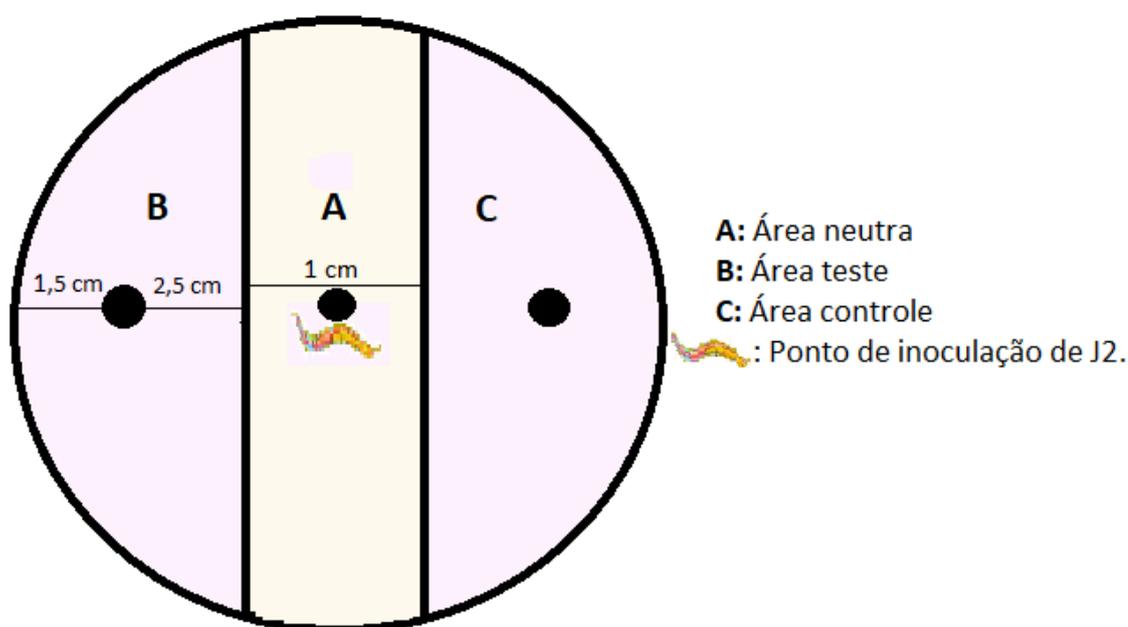


Figura 10. Esquema usado para avaliar juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* por quimiotaxia *in vitro* empregando placa de Petri contendo agar-água. Foram infestados 100 juvenis de segundo estágio na área neutra (A). Na área teste foi colocada a molécula a testar e na área controle foi adicionado apenas solvente da molécula estudada.

4.5. Quimiotaxia em vasos de J2 de *Meloidogyne javanica* pelo composto ethylexanol encontrado nas emissões de raízes de tomateiro

As concentrações utilizadas foram determinadas após várias tentativas realizadas em pré-testes, até chegar nas concentrações aqui apresentadas cujos resultados preliminares foram mais expressivos e que não oscilaram de forma discrepante entre as repetições dos tratamentos.

Para este ensaio foram utilizados vasos com 12 cm de altura e 12 cm de diâmetro, contendo 1 kg de areia e solo autoclavados na proporção 2:1 e usando apenas a tela excludora de raízes de 0,025 mm de abertura que delimita a *região atrativa 1* de 5 cm de diâmetro. Os J2 de *M. javanica* foram inoculados em uma concentração de 3000 J2 distribuídos em quatro

pontos cardiais, a mesma distância do ponto central, aproximadamente 750 J2 por orifício, a 3 cm de distância da borda externa da tela de 5 cm de diâmetro.

Foram definidos os seguintes tratamentos: carvacrol (atrativa- controle 1) nas quantidades de 3 e 5 mL, ethylexanol nas quantidades de 1, 3 e 5 mL. Como controle 2 ocorreu a aplicação da quantidade equivalente de água substituindo a molécula. Todas as moléculas voláteis e a água (controle 2) foram aplicadas no círculo central de 5 cm bem no centro substituindo a planta de tomate do ensaio 3.2. As moléculas voláteis e a água (controle 2) foram injetadas no ponto central dentro da *região atrativa 1* com o auxílio de uma seringa. Foram realizadas seis repetições para cada tratamento e controles 1 e 2, sendo avaliadas a 5 dias após a infestação do solo, extraindo os J2 segundo o método de Jenkins, (1964). Nessa avaliação foram quantificados os J2 encontrados na *região atrativa 1*.

4.6. Delineamento experimental e análise estatística

Todos os ensaios foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizados, com repetições que variam de acordo com o experimento realizado. Os dados foram previamente submetidos ao teste de normalidade (Shapiro-Wilk) e de homogeneidade (Barlett). Os dados do efeito do estímulo da planta sobre a migração dos J2 nas diferentes regiões do vaso foram submetidos a análise de variância (ANOVA) fatorial 2 (estímulos: tomate ou controle) x 4 (regiões dentro do vaso). Para a análise deste teste os dados foram transformados para Log x. Utilizou-se o *test T de student* para averiguar a ocorrência de diferença no número de J2 entre regiões similares, provenientes de vasos com planta e sem planta. O Box plot (diagrama de caixa) foi utilizado para representar a variação de dados observados nos ensaios sobre o efeito do estímulo da planta na migração dos J2 nas diferentes regiões do vaso e no ensaio de quimiotaxia *in vitro*. No ensaio de quimiotaxia em vasos, os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as médias referentes aos diferentes tratamentos foram comparadas pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$).

5. RESULTADOS

5.1- Desenvolvimento de nova técnica para estudo de quimiotaxia de nematoides em solo

O uso dos cilindros metálicos como suporte de telas e as telas em diferentes distâncias do centro, local de atração, definiram bem as diversas áreas caracterizadas como *regiões atrativas 1 e 2, neutra e repelente* e possibilitaram com precisão a análise dos nematoides nelas presentes. Esta técnica possibilitou o trabalho com moléculas e plantas no processo de atração.

5.2- Quimiotaxia em vasos utilizando J2 de *Meloidogyne javanica* e tomateiro

O perfil de distribuição dos J2 de *M. javanica* nas diferentes áreas definidas nos vasos com transplântio de tomate (tratamento) e sem planta (controle) foi bem diverso. No tratamento sem a planta a menor incidência de J2 foi na *região atrativa 1* enquanto no tratamento este valor aumenta. Na *região repelente* do controle ocorreu a maior incidência de J2 do que na neutra, porém ambas com valores elevados. Contudo, no tratamento com tomate, na *região repelente* (53,6 J2), a incidência de J2 foi bem próximo daquela encontrada na *atrativa 1* (58,6 J2) (Tabela 1). Na região neutra não houve diferença significativa entre as incidências de J2 no tratamento sem tomate (53,6 J2) e no tratamento com tomate (117,4 J2) mas diferentes ($P \leq 0,05$) nos demais (Figura 11).

Não houve diferença significativa entre o número de J2 recuperados nas *regiões neutras* dos vasos com e sem tomateiro. Entretanto, na *região repelente* dos vasos com tomateiro foram encontrados menos J2 ($P < 0,001$).

Tabela 1. Resumo da anova sobre o efeito do estímulo da planta de tomate na migração dos juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica*, nas diferentes regiões dos vasos preenchidas com substrato.

Fonte	GL	SQ	QM	F	P
Tratamento	1	1.871	1.8711	24.147	<0.0001
Regiões	3	1.699	0.5662	7.307	<0.0001
Tratamento*Região	3	2.491	0.8304	10.716	<0.0001
Resíduo	52	4.029	0.0775		

GL= grau de liberdade, SQ= soma dos quadrados, QM= quadrado médio, F= teste de fisher, P= significância.

A recuperação dos J2 no processo de extração do substrato foi maior no tratamento sem tomate (337,24 J2) do que no tratamento com tomate (150,27 J2). E os J2 encontrados nas raízes, cinco dias após a inoculação, foi de 1,3% do total recuperado na extração (Tabela 2).

Tabela 2. Recuperação de juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* pelo método de Jenkins (1964) nos tratamentos com tomate e sem planta. O tratamento sem tomate se diferiu do tratamento com tomate onde o * indica diferença estatística ($P < 0,05$) entre médias da mesma coluna de acordo com o teste T.

	J2 recuperados ^a	J2 dentro das raízes ^b
--	-----------------------------	-----------------------------------

Tomate	150,27	40
Controle	337,24*	-

a número médio de J2 recuperados. Dados referentes a oito repetições por tratamento

b número médio de J2 observados no interior do sistema radicular de tomateiro. Dados referentes a oito repetições

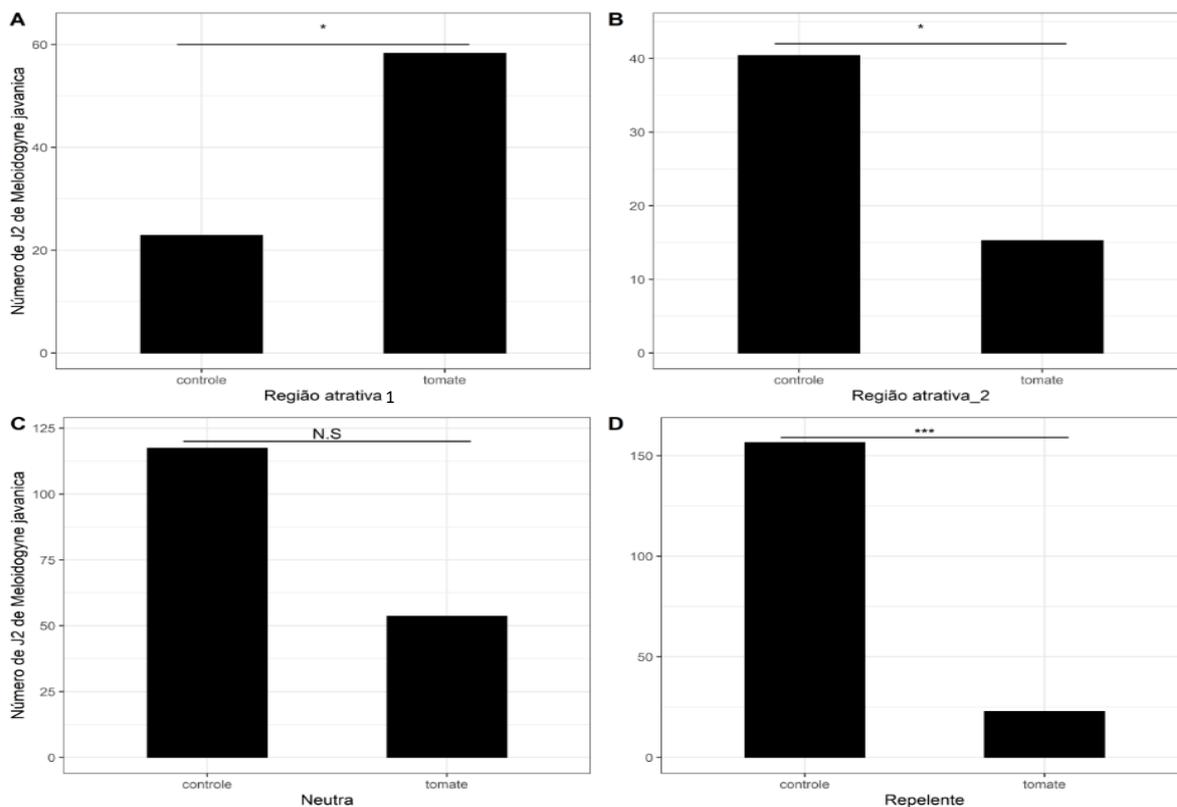


Figura 11. Número médio de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne javanica* nas diferentes regiões dos vasos preenchidos com substrato no tratamento (tomate) e controle (sem plantas). (A) região atrativa 1, (B) região atrativa 2, (C) região neutra, (D) região repelente. * indica diferença estatística ($P < 0,05$) entre médias de acordo com o teste T de Student O nível de significância é indicado por: * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$; NS = não significativo. * indica diferença estatística ($P < 0,05$) entre médias da mesma coluna de acordo com o teste T de Student. Dados brutos foram transformados para Logx para a satisfazer os pressupostos de homogeneidade de variâncias e normalidade.

A distribuição dos J2 ao longo das diferentes regiões *Atrativa 1* (58,6 J2) e *atrativa 2* (15,2 J2) do vaso foi influenciada pela presença da planta de tomate ($P < 0,01$) (Tabela 3) quando comparado com o tratamento sem planta, neste houve uma distribuição aleatória dos J2, onde a maioria foram recuperados nas *regiões neutra* (117,4 J2) e *repelente* (156,57 J2).

Tabela 3. Distribuição dos J2 de *Meloidogyne javanica* nas diversas regiões no ensaio de quimiotaxia em vasos usando tomateiro.

Sem planta				Com tomate			
Região	Rep ^a	N° J2	DP*	Região	Rep	N° J2	DP
Atrativa 1	7	22,85	7,31	Atrativa 1	7	58,6	37,6
Atrativa 2	7	40,42	18,1	Atrativa 2	8	15,2	3,41
Neutra	7	117,4	67,6	Neutra	8	53,6	34
Repelente	7	156,57	28,6	Repelente	8	22,87	11,6

*DP: Desvio padrão da média

^a Rep: Número de repetições.

A análise descritiva dos dados demonstra a ocorrência de uma grande dispersão dos dados nas *regiões neutras* tanto dos vasos com tomate quanto naqueles vasos sem plantas. Este padrão também foi observado na *região atrativa 1* dos vasos com planta e na *região repelente* dos vasos sem tomateiro (Figura 12).

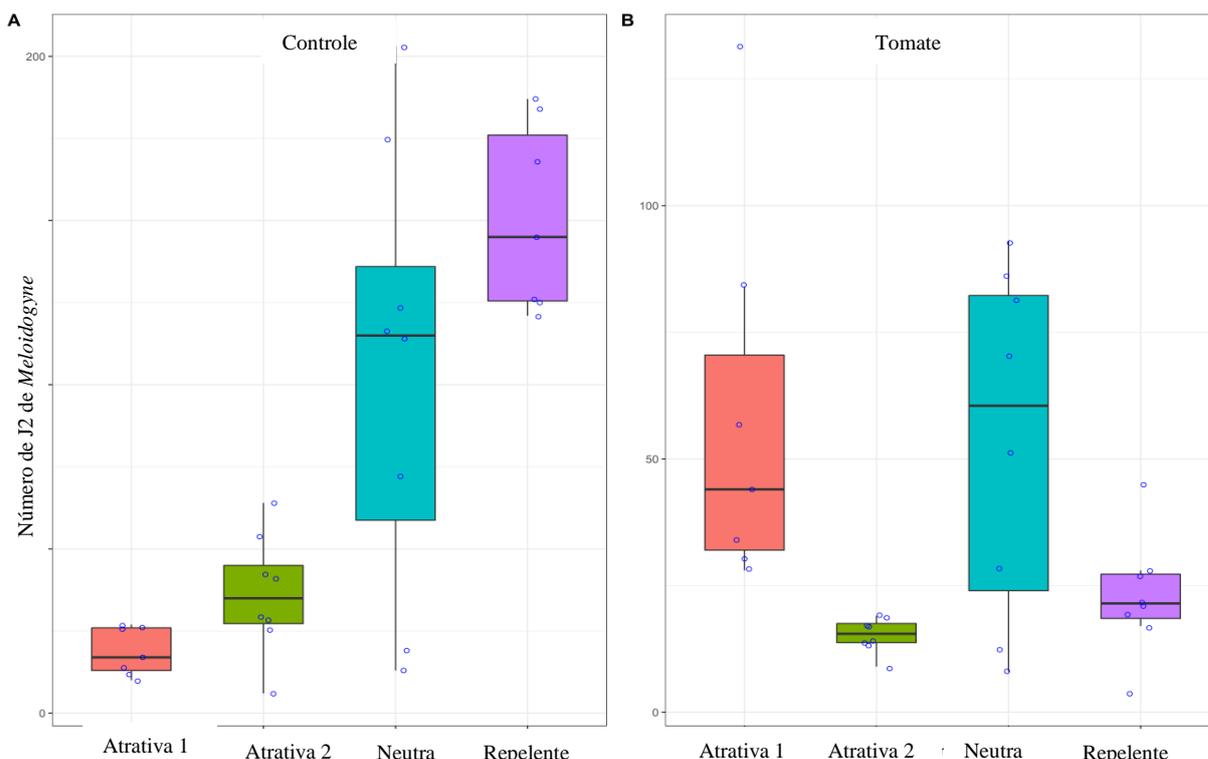


Figura 12. Boxplot do número de nematoides por regiões: *atrativa 1*, *atrativa 2*, *neutra* e *repelente*; em (A) controle e (B) tomate. Cada ponto representa uma repetição dos dados observados. As caixas indicam os percentis 25 e 75, as linhas verticais indicam os percentis 5 e 95. A linha horizontal na caixa representa a mediana.

5.3- Caracterização dos voláteis emitidos por raízes de tomateiro

Foram identificadas por cromatografia gasosa 24 moléculas na emissão volátil das raízes e caules de tomateiro cv. Santa Clara. Os compostos identificados nas raízes e caules foram categorizados em baixa (“v”), mediana (“vv”) e alta (“vvvv”) intensidade. Aqueles com intensidade mediana e alta foram: etanol, 3-methyl-1-butanol, 2-methyl-1-butanol, 3-metil-1-butanoato de etila, 2- etilexanol, pentadecanal e tetradecanal. Todos os demais 18 compostos foram identificados com baixa intensidade (Tabela 4).

Tabela 4. Compostos orgânicos voláteis identificados na raiz e caule de tomateiro cv. Santa Clara pelo cromatógrafo a gás, acoplado a um espectrômetro de massas SPME -GC-MS:

Composto	Grupo	Raiz	Caule
----------	-------	------	-------

(1) etanol	Álcool	Vv	Vv
(2) hexanol	Álcool	V	V
(3) 1-butanol	Álcool	V	V
(4) acetato de etila	Éster	V	V
(5) 1,1-dietoxy-etano	Acetaldeído	V	V
(6) 3-Methyl-1-butanol	Álcool	Vv	
(7) 2- Methyl-1-butanol	Álcool	Vv	Vv
(8) 1-pentanol	Álcool	V	V
(9) 2-metil-butanoato de etila	Éster	V	V
(10) 3-metil-butanoato de etila	Éster	V	Vv
(11) Ethyl tiglate	Éster	V	V
(12) 1-octen-3-ol	Álcool	V	V
(13) hexanoato de etila	Éster	V	V
(14) 2-etilexanol	Álcool	Vv	vv
(15) 5-metilexanoato de etila	Éster	V	
(16) 2-nonen-1-ol	Álcool	V	
(17) 1-nonanol	Álcool	V	
(18) menthol	Álcool	V	
(19) 2-nonenoato de etila	Éster	V	
(20) 1-tetradeceno	Sesquiterpenos	V	V
(21) tetradecano	Acetaldeído	V	V
(22) tridecanal	Aldeído	V	
(23) pentadecanal	Aldeído	Vvv	V
(24) tetradecanal	Aldeído	Vv	V

Compostos orgânicos voláteis (COVs) presentes nas raízes e caules de tomateiro 'Santa Clara' identificados por cromatografia gasosa por grupos químicos, presença e intensidade que ocorreram: v—molécula presente; vv—molécula em intensidade mediana, vvv- maior pico no cromatograma.

5.4- Quimiotaxia *in vitro* de J2 de *Meloidogyne javanica* pelos compostos orgânicos voláteis de raízes e caules de tomateiro

Dos compostos encontrados no volatiloma de raízes de tomateiro e aqui testados, o ethylexanol comportou-se como altamente atraente bem semelhante ao controle positivo (carvacrol). O hexanol e o 1-menthol foram considerados atraentes. No entanto, os compostos tetradeceno e tridecanal apresentaram resultados que variam de um ensaio para o outro (Tabela 5).

Tanto no primeiro ensaio quanto no segundo ensaio houve baixa dispersão nas repetições das moléculas analisadas demonstradas pelo Boxplot (DP) para as moléculas

hexanol, metanol (controle do 1- menthol) e tridecanal (Figura 13). No primeiro ensaio embora houve inconsistência nos dados das moléculas tetradeceno e tridecanal quando comparada entre os ensaios, todas as repetições dos tratamentos avaliados tenderam a se aproximarem da mediana (linha horizontal da caixa) isso devido a presença de maior número de repetições por tratamento, obtendo assim menor dispersão de dados.

Tabela 5. Dados da quimiotaxia dos J2 de *M. javanica* composto por: moléculas testadas (carvacrol, ethylexanol, hexanol, 1-menthol, metanol, tetradeceno, tridecanal), número de repetições por tratamento, índice de quimiotaxia (IQ) e desvio padrão (DP).

Primeiro ensaio				Segundo ensaio			
Molécula	N° Rep	IQ	DP*	Molécula	N° Rep	IQ	DP*
Carvacrol	10	0,5	0,26	Carvacrol	6	0,3	0,11
Controle	5	0	0,02	Controle	6	0	0,06
Ethylexanol	8	0,6	0,32	Ethylexanol	5	0,2	0,06
Hexanol	5	0,4	0,4	Hexanol	5	0,1	0,14
1-menthol	6	0,8	0,23	1-menthol	6	0,1	0,1
Tetradeceno	6	-0,9	0,07	Metanol	5	0	0,14
Tridecanal	6	0,6	0,13	Tetradeceno	6	0,1	0,04
				Tridecanal	5	0	0,09

* DP: Desvio padrão da média

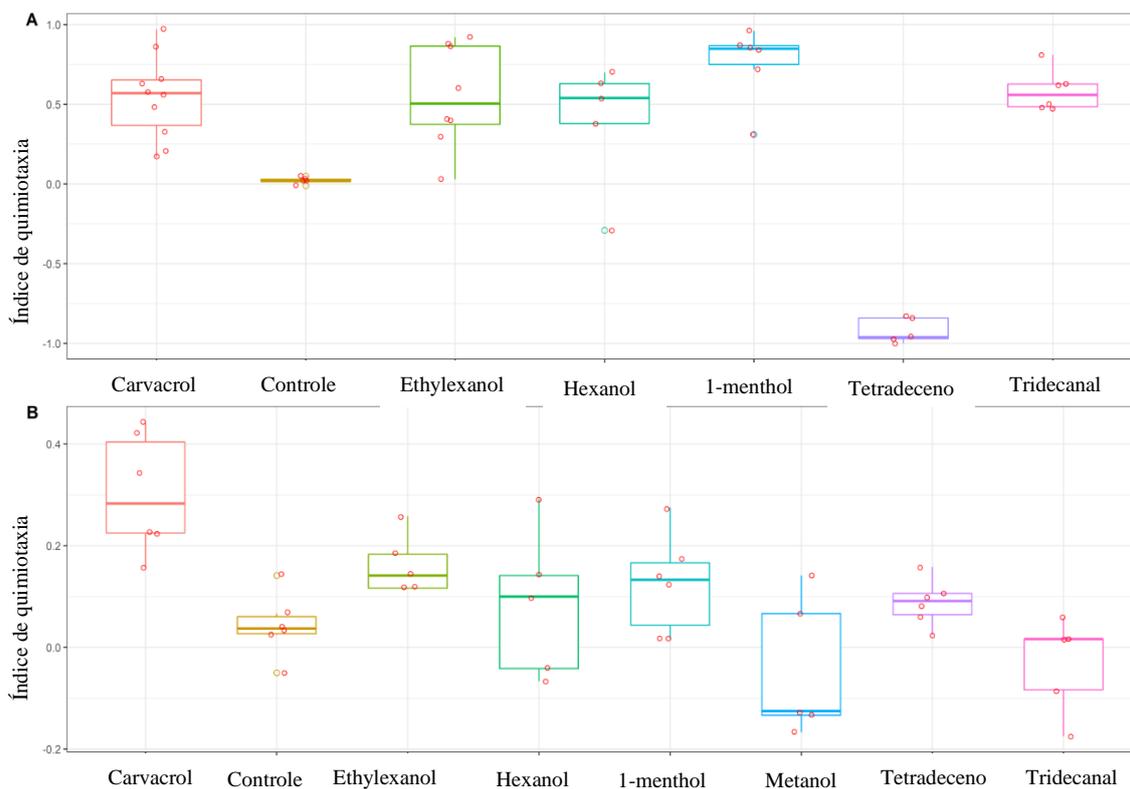


Figura 13. Boxplot do número de nematoides recuperados na *região atrativa 1* em cada molécula testada (carvacrol, ethylexanol, hexanol, 1-menthol, metanol, tetradeceño e tridecanal). (A) ensaio 1 e (B) ensaio 2. Cada ponto representa uma observação. As caixas indicam os percentis 25 e 75, as linhas verticais indicam os percentis 5 e 95. A linha horizontal na caixa representa a mediana.

A atratividade a partir do local de deposição dos J2 foi maior para os COVS: ethylexanol, carvacrol e hexanol. Foram observados nos ensaios de quimiotaxia *in vivo* a capacidade de atratividade dos compostos: ethylexanol, carvacrol e hexanol próximo a zona onde foram depositados 1 μ l da molécula pura, onde houve uma maior concentração dos J2, ainda moveis (Figura 14), porém no local exato onde a molécula estava aplicada haviam poucos J2 (todos moveis).

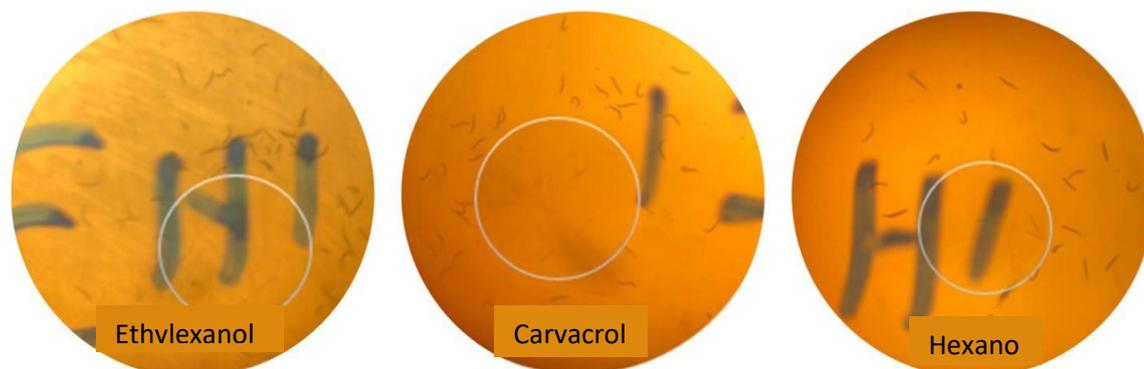


Figura 14. Quimiotaxia *in vitro* da atratividade dos compostos orgânicos voláteis: ethylexanol, carvacrol e hexanol demonstrando sua atratividade local (molécula depositado dentro do círculo branco).

5.5. Quimiotaxia em vasos de J2 de *Meloidogyne javanica* pelos compostos ethylexanol e carvacrol

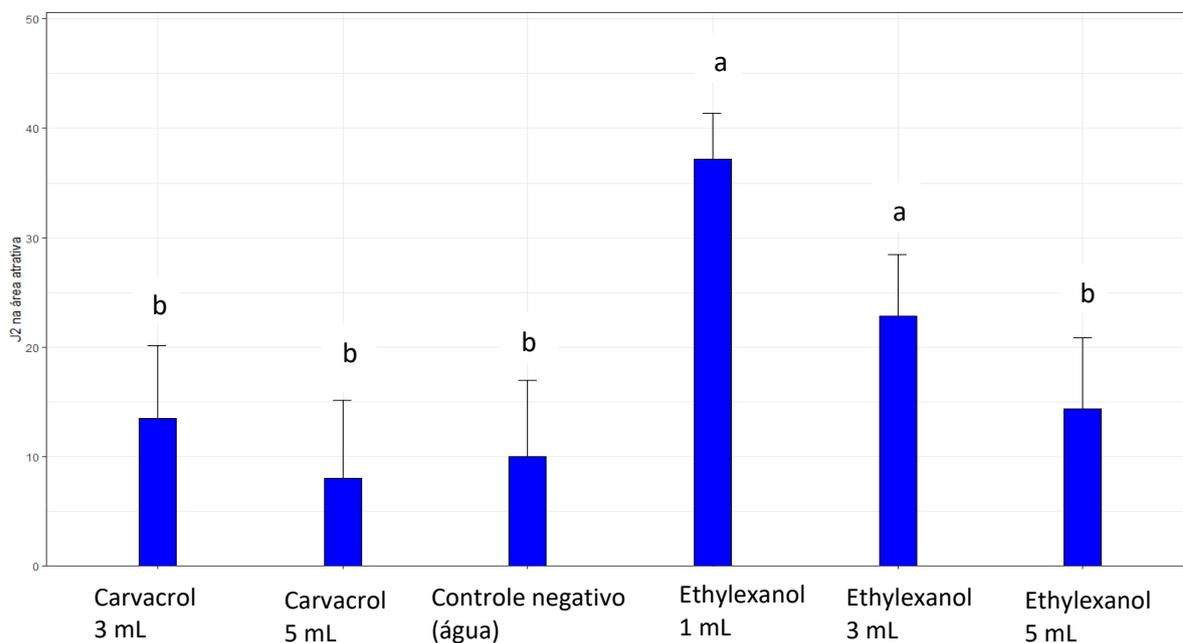


Figura 15. Quimiotaxia *in vivo* de *Meloidogyne javanica* aos compostos orgânicos voláteis em diferentes doses: carvacrol- controle positivo (3 mL e 5 mL) e ethylexanol (1 mL, 3 mL e 5 mL). Controle negativo (água). Médias com a mesma letra não diferem significativamente ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Os J2 de *M. javanica* expostos aos COVs carvacrol (controle positivo) e ethylexanol expressaram diferentes reações quimiotáticas. O ethylexanol nas quantidades de 1mL e 3 mL atraiu significativamente ($P < 0,05$) os J2 *M. javanica* quando comparado com os controles

(positivo e negativo). No entanto o carvacrol nas quantidades 3 e 5 mL e o ethylexanol a 5 mL não diferiram do controle negativo (água) (Figura 15).

6. DISCUSSÃO

Nos últimos anos diversas pesquisas enfocando COVs atrativos e repelentes (KIHKA et al., 2017; KIHKA et al., 2020; MURUNGI et al., 2018; DELORY et al., 2016) vem sendo realizadas com o intuito de desvendar como os fitonematoides se comportam na presença de voláteis presentes no solo e na rizosfera. Muitas técnicas foram desenvolvidas para estes estudos, principalmente técnicas *in vitro* utilizando-se placas de Petri (WARNOCK et al., 2017; SHIVAKUMARA et al., 2018) e *in vivo* empregando vasos plásticos com materiais acoplados ou olfatômetro (PACHECO et al., 2021; KIHKA et al., 2020). Embora existam várias técnicas para o estudo da quimiotaxia de fitonematoides, muitas delas apresentam limitações como: custo de equipamentos e técnicas que não relatam a realidade de campo. No entanto, a técnica aqui desenvolvida e descrita pela primeira vez, possui várias vantagens como: baixo custo de implementação e representa a realidade da interação dos fitonematoides com os COVs presentes no solo e rizosfera com a estratificação da área do vaso em regiões. Desta forma os dados aqui obtidos permitem a geração de dados mais próximos das pesquisas de campo.

Nos vasos com tomateiro foi possível visualizar que houve motilidade dos J2 de *M. javanica* da *região neutra* (região de infestação) em direção a *região atrativa 1*, local de liberação de gradiente dos semioquímicos emitidos pelas raízes de tomate, no entanto, no controle (vasos sem planta) os J2 ficaram mais concentrados nas regiões: *neutra* e *repelente*, pois estas duas regiões ficam próximas. Assim, no presente estudo, as raízes de tomate cv. Santa Clara liberaram semioquímicos que atraíram os J2 de *M. javanica*, para a *região atrativa 1* uma vez que nela foi encontrada 40% (58 J2) do total de J2 recuperados nos vasos. Contudo nos vasos sem planta foram extraídos apenas 6% (23 J2) nesta mesma região. Estudos recentes, utilizando outras cultivares de tomate, também constataram essa tendência de quimiotaxia positiva de J2 de *Meloidogyne* spp. em direção ao sistema radicular de tomateiro (SHIVAKUMARA et al., 2019; WANG et al., 2019; PACHECO et al., 2021).

Outras metodologias foram desenvolvidas como a de Reynolds et al., (2011) com um equipamento em forma de Y para teste de dupla escolha. Para ensaios de dupla escolha, é possível utilizar o olfatômetro, que é adquirido em lojas especializadas, contendo um custo por essa tecnologia (KIHKA et al., 2017), ou com algumas adaptações para torná-lo mais viável (PACHECO et al., 2021). Mas nenhum destes equipamentos se aproximam da realidade da

interação que os microrganismos têm com as substâncias presentes no solo, pois a maioria das técnicas para estudo de quimiotaxia não contém espaço suficiente para que os J2 expressem suas taxias, a maioria dos experimentos não utilizam solo como ambiente para o desenvolvimento de estudos de quimiotaxia, os J2 não são submetidos a interferência de luz e escuro, e o ambiente não é irrigado.

Diversos compostos, de diferentes classes, foram encontrados nas emissões do sistema radicular e caule do tomateiro totalizando 24 compostos (Tabela 4). No entanto nenhum dos COVs identificados no presente estudo coincidiu com os que foram identificados na pesquisa de Murungi et al., (2018): (2-isopropil-3-metoxipirazina e 2-(metoxi)-3-(1-metilpropil)-pirazina, sabineno, salicilato de metila e tridecano); acredita-se que o fato de não serem os mesmos compostos se dá a diferença de metodologia adotada para a extração dos voláteis, uma vez que na pesquisa de Murungi et al., (2018) as raízes de tomateiro foram trituradas utilizando nitrogênio líquido com o propósito de aumentar a sensibilidade de detecção de compostos na cromatografia gasosa; além de que a cultivar de tomateiro utilizada na pesquisa era a Cal J, já no presente estudo utilizou-se a cultivar Santa Clara. A maceração das raízes mesmo que em nitrogênio líquido pode alterar a composição dos voláteis.

Kihica et al., (2020) identificaram COVs liberados pelas raízes de tomate que influenciaram na quimiotaxia de *M. javanica*, atraindo mais de 90% dos juvenis quando comparado ao controle (areia úmida). Wang et al., (2021) observaram alguns COVs liberados pelo tomate que também estão presentes em outras culturas suscetíveis como: rabanete, alface, pepino, repolho e pimenta. É importante ressaltar que no presente estudo os J2 foram expostos não só aos COVs, mas também a compostos não voláteis como os semioquímicos liberados pelas raízes de tomateiro, uma vez que a técnica aqui descrita não permite separar estes compostos no solo.

Os semioquímicos presentes nas raízes de tomate têm se mostrado altamente atraentes aos J2 de *M. incognita* (MURUNGI, et al.,2018). Kirwa et al (2018) identificaram cinco semioquímicos liberados pelas raízes de tomateiro que influenciam na taxia positiva ou negativa de *M. incognita*; esta quimiotaxia depende da concentração em que os compostos estão, quando entram em contato com os J2. Segundo MWAMBA, (2016) quando o tomateiro é submetido a testes de dupla escolha com plantas da família Asteraceae ou com o controle (areia), há uma maior concentração dos J2 em direção aos semioquímicos atrativos do tomate.

Das distintas classes de compostos identificados nas raízes e caules de tomateiro cv. Santa Clara, como: álcoois, ésteres, aldeídos, acetaldeídos e sesquiterpenos, foram selecionadas

cinco moléculas puras para teste de quimiotaxia *in vitro*. As moléculas: ethylexanol que estava presente em alta intensidade tanto na raiz quanto no caule; 1-menthol e tridecanal presente apenas na raiz; hexanol e tetradeceno presente na raiz e caule e o carvacrol foi incluído no teste de quimiotaxia como controle positivo já que ele vem sendo classificado como atraente a *M. javanica* Oka, (2020).

No primeiro ensaio de quimiotaxia *in vitro* os compostos ethylexanol (IQ = 0,6), carvacrol (IQ = 0,5) e hexanol (IQ = 0,4) se comportaram como altamente atraentes onde o índice de quimiotaxia foi $\geq 0,2$ altamente atraentes. Entretanto, no segundo ensaio somente o carvacrol (IQ = 0,3) e o ethylexanol (IQ = 0,2) se mantiveram altamente atraente, ficando o hexanol (IQ = 0,1) classificados como levemente atraentes $0,1 \leq IQ < 0,2$,

Outras moléculas com estrutura química semelhante ao carvacrol foram testadas por Oka, (2020), para avaliar se teriam o mesmo efeito sobre o J2 de *M. javanica*. com isso apenas 11 dos 60 semioquímicos avaliados, se comportaram como altamente atraente aos J2: ácido trans- cinâmico, ácido salicílico, 4'-hidroxi-3'-metoxiacetofenona, o- vanilina, carvacrol, álcool 3-metoxibenzílico, 2-metoxicinamaldeído, trans-p-metoxicinamaldeído, 4-metoxi-3-metilbenzalde, 2-metoxi-4-propenilfenol e timol

As moléculas 1-menthol e tridecanal foram definidas como altamente atraentes aos J2 de *M. javanica* no primeiro ensaio. Os juvenis ficaram amplamente distribuídos na área atrativa, porém no segundo ensaio apenas o 1- menthol se manteve atrativo, já o tridecanal não apresentou reação aos J2 (resposta aleatória) não se diferenciando do controle. O 1-menthol foi o COV que apresentou maior pico de atratividade no primeiro ensaio. Este é o primeiro relatado da atratividade destes dois compostos.

O tetradeceno foi o único COV aqui testado classificado como altamente repelente (IQ $\leq -0,2$), no entanto essa reação de repulsão dos J2 de *M. javanica* foi observada apenas no primeiro ensaio já no segundo ensaio o tetradeceno foi levemente atraente ($0,1 \leq IQ < 0,2$) aos J2. Este acontecimento pode ser devido a diversos fatores, como: infestação dos J2 em distância mais próxima ou distante da área teste e má homogeneização do inoculo podendo aumentar ou reduzir a densidade populacional dos J2 depositados na *região neutra*.

Todos os COVs avaliados na atração ou repelência dos juvenis de *M. javanica* foram de estudo inédito com relação a sua influência na taxa de fitonematoides. E por isso foram selecionados o ethylexanol e o carvacrol para teste de quimiotaxia em vaso utilizando a técnica de tela excludora de raízes.

Para o ensaio de quimiotaxia em vasos contendo 1 Kg de substrato, o composto carvacrol foi avaliado com 3 mL e 5 mL, já o ethylexanol foi a 1 mL, 3 mL e 5 mL. Estes COVs foram selecionados e apresentaram comportamentos distintos. O carvacrol e o ethylexanol na concentração de 5 mL não diferiram do controle. Entretanto o ethylexanol a 1 e 3 mL foi atraente.

Estima-se que o efeito nematicida ou repelente do carvacrol seja efetivo quando os J2 de *M. javanica* estejam expostos a este COVs em longo prazo, como este presente experimento foi avaliado com apenas cinco dias após a inoculação (DAI) não foi possível identificar comportamento atrativo ou repelente.

O ethylexanol foi analisado tanto *in vitro* quanto em quimiotaxia em vaso pela primeira vez, e em ambos os ensaios apresentou comportamento atrativo aos J2 de *M. javanica*, com quantidade de 1 mL houve o maior pico de atratividade dos J2, sua atratividade foi reduzindo à medida que a dosagem do COV aumentava gradualmente, a 3 mL ainda se diferiu do controle se mostrando atrativa, no entanto a 5 mL ele foi similar ao controle. Presume-se que o efeito do ethylexanol a 5 mL seja repelente, nematicida ou que não tem nenhum efeito sob os J2 de *M. javanica*, assim necessário mais estudos de quimiotaxia utilizando esta dose e avaliando as demais regiões: *atrativa 2*, *neutra* e *repelente*, para observar a dispersão dos juvenis e a sua viabilidade.

Com o propósito de obter dados com maior precisão da quimiotaxia de microrganismos, Laloum et al., (2020) desenvolveram um sistema de análise em 3D com diferentes regiões tanto para a molécula ou substância teste quanto para o microrganismo; esta metodologia foi eficiente, e pode até substituir os testes realizados em placa de Petri para experimentos com o objetivo de obter maior precisão da taxa de fitonematoides.

Além da precisão e confiabilidade que a técnica aqui desenvolvida permite, seu uso pode ser destinado desde as instituições de ensino e pesquisa até nas análises em empresas que visam um maior custo-benefício de materiais utilizados e tempo gasto, uma vez que só se utilizam vasos plásticos, telas de 0,025 mm e 2 mm e os respectivos moldes (cilindros) em chapas galvanizadas (gasto único). Com relação ao tempo, como visto nos experimentos realizados apenas 5 DAI já se obtêm dados conclusivos.

7. CONCLUSÕES

- 1) A nova técnica permitiu pela primeira vez separar as regiões do substrato no vaso a partir da rizosfera do tomateiro em *atrativas 1 e 2, neutra e repelente* usando telas que permitem o livre movimento dos juvenis de segundo estágio (J2) de *M. javanica*.
- 2) A rizosfera do tomateiro na *região atrativa 1* alterou o perfil de distribuição dos juvenis de segundo estágio (J2) de *M. javanica* comparando com o controle sem planta.
- 3) A rizosfera do tomateiro causou quimiotaxia positiva atraindo a maioria dos J2 para a *região atrativa 1* contrastando com o controle em que ocorreu menor incidência.
- 4) Foram encontrados 24 compostos orgânicos voláteis (COVs) nas emissões das raízes do tomateiro.
- 5) Pela primeira vez constatou-se que os componentes do volátiloma das raízes do tomateiro. Ethylexanol foi considerado como altamente atrativo e os COVs hexanol e 1-menthol como atrativos a J2 de *M. javanica*.
- 6) Com o uso da nova técnica contestaram-se também pela primeira vez, que as quantidades de 1 mL e 3 mL de ethylexanol atraíram significativamente os J2.

8. REFERÊNCIAS

ABAD, P.; CASTAGNONE-SERENO, P.; ROSSO, M. N.; ENGLER, J. A.; FAVERY, B. **Invasion, feeding and development**. In: Perry R, Moens M, Starr JL, eds. Root-knot Nematodes. Cambridge, MA, USA, CABI International, p. 163-181, 2009.

AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 5^a edição. Burlington, Elsevier Academic Press, 2005.

BAERMANN, G. E. Einfache method zur auffindung von ankvlostomum (Nematoden) larven in erdproben. **Nederlands-Indie**, 57: 131-137, 1917.

BIRD, D. M. Signalling between nematodes and plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 7, n. 4, p. 372-376, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2004.05.005>

BYRD, D.W. J.; KIRKPATRICK, J.; BARKER, K. R. An improved technique for clearing and staining plant tissues for detection of nematodes. **Journal of Nematology**, v.15, n.1, 142-143, 1983.

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

CARVALHO, P. H. **Controle biológico e alternativo de *Meloidogyne incognita* e *M. javanica* em tomateiro**. 2017. 82f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia). Universidade de Brasília. Brasília. Brasil.

CARVALHO, C. R. F.; PONCIANO, N. J.; SOUZA, P. M. D.; SOUZA, C. L. M. D.; SOUSA, E. F. D. Viabilidade econômica e de risco da produção de tomate no município de Cambuci/RJ, Brasil. **Ciência Rural**, v. 44, p.2293-2299, 2014. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20131570>

ČEPULYTĖ, R.; DANQUAH, W. B.; BRUENING, G.; Williamson, V. M. Potent Attractant for Root-Knot Nematodes in Exudates from Seedling Root Tips of Two Host Species. **Scientific Reports**, v.8, p.10847, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29165-4>.

CHITWOOD, D. J. Phytochemical based strategies for nematode control. *Annual Review of Phytopathology*, v.40, n.1, p.221–249, 2002. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.40.032602.130045>

CHITWOOD, B. G. Root-knot nematodes. Part I. A revision of the genus *Meloidogyne* Goeldi, 1887. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, v.16, p.90-104, 1949.

CURTIS, R. H. C. Plant-nematode interactions: environmental signals detected by the nematode's chemosensory organs control changes in the surface cuticle and behaviour. *Nematology*, v. 9, p.155-160, 2007. <https://doi.org/10.1051/parasite/2008153310>

CURTIS, R. H. C. Plant-nematode interactions: environmental signals detected by the nematode's chemosensory organs control changes in the surface cuticle and behaviour. *Parasite*, v.15, n.3, p.310-316, 2008. <https://doi.org/10.1051/parasite/2008153310>

DELORY, B. M.; DELAPLACE, P.; FAUCONNIER, M. L.; DU JARDIN, P. Root-emitted volatile organic compounds: they can mediate belowground plant-plant interactions? *Plant Soil*, v.402, p.1-26, 2016. <https://doi.org/10.1007/s11104-016-2823-3>

DUARTE, A.; MALEITA, C.; ABRANTES, I.; CURTIS, R. Tomato root exudates induce transcriptional changes of *Meloidogyne hispanica* genes. *Phytopathologia Mediterranea*, v.54, n.1, p.104–108, 2015. https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-14595

FERRAZ, L. C. C. B.; & BROWN, D. J. F. Nematologia de plantas: fundamentos e importância. Manaus:Norma editora, 251p, 2016.

Food and Agricultural Organization - FAO. FAO Statistical Yearbook. New York, 2019. Disponível em: www.fao.com. Acesso em: 10 jan. 2021.

GAL, T. Z.; AUSSENBERGH, E. R.; BURDMAN, S.; KAPULNIK, Y.; KOLTAI, H. Expression of a plant expanding involved in the establishment of root knot nematode parasitism in tomato. *Planta*, v.224, n.1, p.155-162, 2006. <https://doi.org/10.1007/s00425-005-0204-x>

GIL, A.; GHERSA, C. M.; PERELMAN, S. Root thiophenes in *Tagetes minuta* L. accessions from Argentina: Genetic and environmental contribution to changes in concentration and composition. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.30, n.1, p.1–13, 2002. [http://dx.doi.org/10.1016/S0305-1978\(01\)00058-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0305-1978(01)00058-8)

GONZALEZ-MAS, M. C.; RAMBLA, J. L.; ALAMAR, M. C.; GUTIE´RREZ, A.; GRANELL, A. Comparative analysis of the volatile fraction of fruit juice from different citrus species. **PloS One**, v.6, n.7, 2011. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022016>

HOLOPAINEN, J. K.; & BLANDE, J. D. **Molecular plant volatile communication**. In *Sensing in Nature*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2012; p. 17–31.

HUSSEY, R. S.; & JANSSEN, G. J. W. Root-knot nematodes: *Meloidogyne* species. In: Starr, J.L.; Cook R.; Bridge, J. *Plant Resistance to Parasitic Nematodes*. Wallingford, **CAB International**, p. 43-70, 2002.

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

JONES, J. Nematode Sense Organs: **The biology of nematodes**, 353p., 2002.

JENKINS, W. R. A rapid centrifugal – flotation technique for separating nematodes from soil. **Plant Disease Report**, v. 48, 692p., 1964.

KIHIKA, R.; MURUNGI, L. K.; COYNE, D.; NG'ANG'A, M.; HASSANALI, A.; TEAL, P. E. A.; TORTO, B. Parasitic nematode *Meloidogyne incognita* interactions with different *Capsicum annum* cultivars reveal the chemical constituents modulating root herbivory. **Scientific Reports**, v.7, n.1, 2017. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02379-8>

KIHIKA, R. M.; TCHOUASSI, D. P.; NG'ANG'A, M. M.; HALL, D.; BECK, J. J.; TORTO, B. Compounds Associated with Infection by the Root-Knot Nematode, *Meloidogyne javanica*,

Influence the Ability of Infective Juveniles to Recognize Host Plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.68, n.34, p.9100–9109, 2020. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c03386>

KIHIKA, R.; TCHOUASSI, DP; NG'ANG'A, MM; HALL, DR; BECK, JJ; TORTO, B. Compounds Associated with Infection of the Root-knot Nematode, *Meloidogyne javanica*, influence an ability of infective juveniles to recognize them as host plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.68, p.9100–9109, 2020. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c03386>

KIRWA, H. K.; MURUNGI, L. K.; BECK, J. J.; TORTO, B. Elicitation of Differential Responses in the Root-Knot Nematode *Meloidogyne incognita* to Tomato Root Exudate Cytokinin, Flavonoids, and Alkaloids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.66, p.11291–11300, 2018. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b05101>

KOFOID C. A.; & WHITE A. W. A new nematode infection of man. **Journal of the American medical Association**, v.72, p.567–569, 1919. <https://doi.org/10.1001/jama.1919.02610080033010>

LALOUM, Y.; NGALA, B.; IANSZEN, M.; BOULOGNE, I.; PLASSON, C.; FOURNET, S.; VICRÉ, M. A Novel In Vitro Tool to Study Cyst Nematode Chemotaxis. **Frontiers in Plant Science**, v.11, 1024p., 2020. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01024>

MOENS, M.; PERRY, R. N.; STARR, J. L. ***Meloidogyne* Species – a diverse group of novel and important plant parasites**. In: Perry RN, Moens M, Starr JL, eds. Root-knot Nematodes. Cambridge, MA, USA, CABI North America Office, p. 1-17, 2009.

MURUNGI, L. K.; KIRWA, H.; COYNE, D.; TEAL, P. E. A.; BECK, J. J.; TORTO, B. Identification of Key Root Volatiles Signaling Preference of Tomato over Spinach by the Root Knot Nematode *Meloidogyne incognita*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.66, n.28, p.7328–7336, 2018. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b03257>

MWAMBA, S. **Root knot nematodes (*Meloidogyne incognita*) interaction with selected Asteraceae plants and their potential use for nematode management**. 2016. 87 f. Dissertation (Science in Research methods) Jomo Kenyatta university of Agriculture and Technology.

NICOL, J. M.; TURNER, S. J.; COYNE, D. L.; NIJS, L. D.; HOCKLAND, S.; MAAFI, Z. T. **Current Nematode Threats to World Agriculture**, em Genomics and Molecular Genetics of Plant-Nematode Interactions. Eds. John, J., Godelieve, G., Carmen, F. (Dordrecht: Springer), p.21-43, 2011.

NIST. **Chemistry Webook – National Institute of Standards and Technology**, 2013. <http://webbook.nist.gov/chemistry/>. Acesso: 20 jan. 2021.

OKA, Y. Screening of chemical attractants for second-stage juveniles of *Meloidogyne* species on agar plates. **Plant Pathology**, v.70, n.4, p.912-921, 2020. <https://doi.org/10.1111/ppa.13336>

OKA, Y.; & MIZUKUBO, T. Tomato culture filtrate stimulates hatching and activity of *Meloidogyne incognita* juveniles. **Nematology**, v.11, n.1, p. 51–61, 2009. <http://dx.doi.org/10.1163/156854108X398417>

PACHECO, P. V. M.; CAMPOS, V. P.; TERRA, W. C.; PEDROSO, M. P.; DE PAULA, L. L.; DA SILVA, M. S. G; DE FREITAS, L. G. Attraction and toxicity: Ways volatile organic compounds released by *Pochonia chlamydosporia* affect *Meloidogyne incognita*. **Microbiological Research**, v.255, 126925p., 2022. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126925>

RAMYA, M.; JANG, S.; AN, H. R.; LEE, S. Y.; PARK, P. M.; PARK, P. H. Volatile Organic Compounds from Orchids: From Synthesis and Function to Gene Regulation. **International Journal of Molecular Sciences**, v.21, n.3, 1160p., 2020. <https://doi.org/10.3390/ijms21031160>

RASMANN, S.; HILTPOLD, I.; ALI, J. The Role of Root-Produced Volatile Secondary Metabolites in Mediating Soil Interactions. **Advances in Selected Plant Physiology Aspect**, p.269-292, 2012. <https://doi.org/10.5772/34304>

REYNOLDS, A. M.; DUTTA, T. K.; CURTIS, R. H. C.; POWERS, S. J.; GAUR, H. S.; KERRY, B. R. Chemotaxis can take plant-parasitic nematodes to the source of a chemoattractant via the shortest possible routes. **Journal of the Royal Society**, v. 8, n.57, p.568-577, 2011. <https://dx.doi.org/10.1098%2Frsif.2010.0417>.

ROCHA, F. S.; CAMPOS, V. P.; SILVA, E. H.; ROCHA, S. P.; CARLI, M. C.; COSTA, L. S. A. S. Migração de *Meloidogyne incognita* para as raízes de soja in vitro. **Nematologia Brasileira**, v.32, p.294-302, 2008.

ROHLOFF, J., BONES, A. M. Volatile profiling of *Arabidopsis thaliana*—putative olfactory compounds in plant communication. **Phytochemistry**, v.66, p.1941–1955, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.06.021>

SAEKI, S.; YAMAMOTO, M.; IINO, Y. Plasticity of chemotaxis revealed by paired presentation of a chemoattractant and starvation in the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Journal of Experimental Biology**, v. 204, p.1757–1764, 2001.

SHIVAKUMARA, T. N.; DUTTA, T. K.; CHAUDHARY, S.; REUSS, S. H. V.; WILLIAMSON, V. M.; RAO, U. Homologs of *Caenorhabditis elegans* chemosensory genes have roles in behavior and chemotaxis in the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.32, p.876–887, 2019. <https://doi.org/10.1094/mpmi-08-18-0226-r>

SHIVAKUMARA, T. N.; DUTTA, T. K. E.; RAO, U. A novel in vitro chemotaxis bioassay to assess the response of *Meloidogyne incognita* towards various test compounds. **Journal of nematology**, v.50, n.4, 487p., 2018. <https://doi.org/10.21307/jofnem-2018-047>

SILVA, J. C. P.; CAMPOS, V. P.; BARROS, A. F.; PEDROSO, L. A.; SILVA, M. F.; SOUZA, J. T.; PEDROSO, M. P.; MEDEIROS, F. H. V. Performance of volatiles emitted from different plant species against juveniles and eggs of *Meloidogyne incognita*. **Crop Protection**, v.116, p.196–203, 2019. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2018.11.006>

SILVA, J. O. *Meloidogyne incognita* na cultura do tomate: levantamento e manejo com produtos biológicos. 2015.77 f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade). Universidade Federal de Goiás. Goiânia. Brasil.

TEILLET, A.; DYBAL, K.; KERRY, B. R.; MILLER, A. J.; CURTIS, R. H. C.; HEDDEN, P. Transcriptional changes of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* in response to *Arabidopsis thaliana* root signals. **PloS One**, v.8, n.4, e61259, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061259>

TEIXEIRA, J. P. F. **Comunicação entre plantas como estratégia de defesa. Instituto Agrônomo, Centro de Recursos Genéticos Vegetais**, Campinas, 2016. Disponível em: http://www.iac.sp.gov.br/imagem_informacoestecnologicas/100.pdf. Acesso em: 10 janeiro 2020.

TERRA, W. C.; CAMPOS, V. P.; MARTINS, S. J.; COSTA, L. S. A. S.; SILVA, J. C. P.; BARROS, A. F.; LOPEZ, L. E.; SANTOS, T. C. N.; SMANT, G.; OLIVEIRA, D. F. Volatile organic molecules from *Fusarium oxysporum* strain 21 with nematocidal activity against *Meloidogyne incognita*. **Crop Protection**, v.106, p.125–131, 2018. <https://doi.org/10.1016/J.CROPRO.2017.12.022>

TORRES, C, A, R. **Seleção de estirpes de *Bacillus* spp. e produtos comerciais para o biocontrole de *Meloidogyne incognita***. 2019. 59 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília, Brasília, DF.

TYC, O.; SONG, C. X.; DICKSCHAT, J. S.; VOS, M. E.; GARBEVA, P. The Ecological Role of Volatile and Soluble Secondary Metabolites Produced by Soil Bacteria. **Trends in Microbiology**, v. 25, p.280-292, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.12.002>

WANG, J.; DING, Z.; BIAN, J.; BO, T.; LIU, Y. Chemotaxis response of *Meloidogyne incognita* to volatiles and organic acids from root exudates. **Rhizosphere**, v. 17 100320p., 2021. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2021.100320>

WANG, P., SUN, Y., YANG, L., HU, Y., LI, J., WANG, J., ZHANG, F., LIU, Y. Chemotactic responses of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* to *Streptomyces plicatus*. **FEMS Microbiology Letters**, v.366, p.1–7, 2019. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnz234>

WARNOCK, N. D.; WILSON, L.; PATTEN, C.; FLEMING, C. C.; MAULE, A. G.; DALZELL, J. J. Nematode neuropeptides as transgenic nematocides. **Plos Pathogens**, v.13, e 1006237, 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006237>

WESTHOFF, S.; VAN WEZEL, G. P.; ROZEN, D. E. Distance-dependent danger responses in bacteria. **Current Opinion in Microbiology**, v.36, p.95-101, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.02.002>

WICHITTRAKARN, P.; TEERARAK, M.; CHAROENYING, P.; LAOSINWATTANA, C. Effects of natural herbicide from *Tagetes erecta* on *Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv. **Allelopathy Journal**, v.43 n.1, p.17-30, 2018. <http://doi.org/10.26651/allelo.j/2018-43-1-1126>

WILLADINO, L.; CÂMARA, T. J.; GALINDO, R. M.; GUEDES, R. M.; MICHEREFF, S. J. **Sistema vascular e exsudatos radiculares**. Michereff SJ, Andrade GT, Menezes M. Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais. Recife: Imprensa Universitária, p.19-40, 2005.