



**Ministério da Educação
Universidade Federal de Lavras
Departamento de Fitopatologia**

JULIO CARLOS PEREIRA DA SILVA

**COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS DE
PLANTAS E O ETANOL NO CONTROLE DE
MELOIDOGYNE INCOGNITA.**

LAVRAS – MG

2016

JULIO CARLOS PEREIRA DA SILVA

**COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS DE PLANTAS E O ETANOL
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

2016

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

Silva, Julio Carlos Pereira da.

Compostos orgânicos voláteis de plantas e o etanol no
controle de *Meloidogyne incognita* / Julio Carlos Pereira da Silva. –
Lavras : UFLA, 2016.

81 p.

Tese(doutorado)–Universidade Federal de Lavras, 2016.

Orientador(a): Vicente Paulo Campos.

Bibliografia.

1. nematoide das galhas. 2. controle biológico. 3. álcool. 4.
nematicida. 5. controle cultural. I. Universidade Federal de Lavras.
II. Título.

JULIO CARLOS PEREIRA DA SILVA

**COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS DE PLANTAS E O ETANOL
NO CONTROLE DE *MELOIDOGYNE INCOGNITA***

***VOLATILE ORGANIC COMPUONDS EMITTED BY PLANTS AND
ETHANOL CONTROLLING 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 02 de setembro de 2016

Dr. Marcio Pozzobon Pedros UFLA

Dr. Eduardo Alves UFLA

Dra. Maria Eloisa Salustiano EPAMIG

Dra. Flavia Mara Vieira Lelis WAGENINGEN UNIVERSITY

Dr. Vicente Paulo Campos
Orientador

**LAVRAS - MG
2016**

*Ao meu pai e minha mãe, por todo esforço e apoio na minha vida
à minha irmã, meu cunhado, meus sobrinhos
e meus tios e primos da casa ao lado.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), por permitir a realização do doutorado e toda minha vida acadêmica.

A CAPES, pela bolsa de estudo.

Ao Prof. Dr. Vicente Paulo Campos, pela orientação, compreensão, força e amizade.

Aos demais professores do Departamento de Fitopatologia - DFP/UFLA, pelos ensinamentos.

Aos amigos de laboratório, Aline Barros, Lívia Pimenta, Luma, Felipe, Liliana, Arinaldo, Eduardo, Lilian, Willian, Fabiola, Jeany, Leticia Cleber e Tarley, por toda dedicação, companheirismo e ajuda nos experimentos.

Aos amigos do DFP/UFLA, Stefanny Araújo e toda equipe do Núcleo de estudo – NEFIT pelo apoio e amizade.

RESUMO

Compostos orgânicos voláteis (COVs) emitidos por plantas podem ter atividades contra fitonematóides. Neste trabalho, COVs emitidos por macerados seco e aquoso de inflorescência de brócolis e semente de girassol foram estudados quanto ao efeito tóxico a *Meloidogyne incognita* em diferentes tempos de exposição. Os COVs emitidos pela semente de girassol e pela inflorescência de brócolis demonstraram atividade nematicida a juvenis de segundo estágio (J₂) de *M. incognita* em curtos períodos de tempo. A infectividade e reprodução diminuíram quando os J₂ foram expostos aos COVs de girassol. A biofumigação solo com material vegetal de brócolis e girassol, em diferentes concentrações, reduziu a infectividade, reprodução e aumentou a toxicidade dos COVs emitidos pelas plantas. A água exposta aos COVs emitidos pelo brócolis causou imobilidade aos J₂ em poucas horas, mas não houve efeito tóxico da água exposta ao macerado de sementes de girassol. A GC-MS dos macerados identificou COVs em 6 e 5 grupos químicos emitidos por sementes de girassol e inflorescência de brócolis, respectivamente. Além disso, 8 moléculas foram caracterizadas na água tóxica exposta à inflorescência de brócolis. O álcool volátil etanol pode ser tóxico a fitopatógenos e não representa perigo para o homem. Diluições aquosas de etanol de 5% até 70 % e seus vapores causaram alta toxicidade *in vitro* em J₂ de *M. incognita*. O vapor e soluções aquosas de etanol, também, causaram, semelhantemente, redução na eclosão de J₂ em ovos do nematoide. O controle de *M. incognita* em alface ocorreu pela alta redução de galhas e de ovos nas raízes, quando o etanol foi aplicado em solo infestado nas concentrações de 40% e 70% e nas doses de 40 ml e 80 ml de cada concentração. A água exposta aos vapores de etanol por curtos períodos de tempo adquiriu toxicidade e causou 100 % de mortalidade nos J₂ com 12 horas de exposição. Os macerados de inflorescência de brócolis e de sementes de girassol demonstraram atividade tóxica diretamente no solo e na emissão de voláteis, mas as moléculas emitidas pela inflorescência de brócolis e retidas na água precisam ser estudadas, individualmente, para melhor entendimento de seus efeitos. Os efeitos do etanol a *M. incognita* em casa de vegetação abrem perspectivas de seu uso no campo no controle de fitonematóides, principalmente, em agricultura orgânica e nas culturas folhosas.

Palavras chave: nematoide das galhas, álcool, controle cultural, controle biológico, nematicida.

ABSTRACT

Volatile organic compounds (VOCs) emitted by plants may have activity against fitonemetoides. In this work, VOCs emitted by dry and aqueous macerates of broccoli inflorescence or sunflower seed were studied by their toxic effect to *Meloidogyne incognita* in different exposition times. VOCs emitted by sunflower seed and the broccoli inflorescence showed nematicidal activity on *M. incognita* second stage juveniles (J₂) even in short periods of exposition. The infectivity and reproduction decreased when the J₂ were exposed to sunflower VOCs. Soil biofumigation with broccoli or sunflower macerates in different concentrations reduced the infectivity, reproduction and increased toxicity of VOCs emitted by plants. The water exposed to VOCs emitted by broccoli caused high immobility to the J₂ in a few hours, but there was no toxic effect of water when exposed to sunflower seed macerate. Macerates GC-MS identified VOCs, in 6 and 5 chemical groups, by sunflower seeds and broccoli inflorescence, respectively. Furthermore, 8 molecules have been characterized on the exposed toxic water broccoli inflorescence. The volatile alcohol ethanol can be toxic to plant pathogens and it is not dangerous to humans. Aqueous dilutions of 5% ethanol to 70% and its vapors caused acute *in vitro* toxicity to *M. incognita* J₂. The vapors and aqueous solutions of ethanol also caused low J₂ hatching in nematode eggs. The higher reduction galls and egg on lettuce roots, happens when ethanol was applied to infested soil concentrations of 40% and 70% and at dosages of 40 ml and 80 ml. The water exposed to ethanol vapors for short periods of time acquired toxicity and caused 100% J₂ mortality with 12 hours of exposition. The inflorescences of broccoli and sunflower seeds macerates showed toxic activity directly in soil and together with volatile emission, but the molecules emitted by broccoli inflorescences that were retained in the water need to be studied individually to better understanding of their effects. The ethanol effects on *M. incognita* in greenhouse open prospects for its use in the field controlling plant parasitic nematodes, especially in organic agriculture and broadleaf crops.

key words: root knot nematode, alcohol, disease management, biological control, nematicidal product.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	9
CAPITULO 1: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	9
1 Importância econômica e controle dos fitonematoides.....	11
2 Plantas antagonistas a fitonematoides.....	12
3 Compostos voláteis produzidos por plantas e tóxicos a nematoides.....	15
4 Cromatografia gasosa na identificação de COVs tóxicos a fitonematoides	17
5 Etanol como alternativa no controle de doenças.....	18
REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO.....	19
CAPITULO 2 - ARTIGOS.....	24
ARTIGO 1: VOLÁTEIS EMITIDOS POR INFLORESCÊNCIA DE BRÓCOLIS E SEMENTES DE GIRASSOL NA BIOFUMIGAÇÃO DE SOLO E PRESENTES NA ÁGUA A ELAS EXPOSTA ATUAM CONTRA <i>Meloidogyne incognita</i>	24
ARTIGO 2: ETHANOL IN AQUEOUS SOLUTION AND ITS VAPORS AS AN ALTERNATIVE TO CONTROL <i>Meloidogyne incognita</i> IN SUBSTRATE OF LETTUCE SEEDLINGS	57

INTRODUÇÃO GERAL

Métodos eficientes no controle de fitonematoides tornam-se carentes pela retirada de moléculas nematicidas do mercado como consequência de seus efeitos residuais encontrados nos alimentos e a toxicidade ao homem. Para suprir essa lacuna, muitos compostos produzidos por plantas vêm sendo isolados e apresentando bons efeitos nematicidas (CHITWOOD, 2002). Também o uso de resíduos vegetais controla doenças disseminadas pelo solo, incluindo as causadas por fitonematoides, além de melhorar a fertilidade e estrutura do solo. Realmente, os resíduos orgânicos podem ser aplicados na agricultura, em sistemas agrícolas sustentáveis (agricultura orgânica) e na agricultura tradicional permitindo que os agricultores possam reduzir o uso de nematicidas (OKA, 2009). Assim, os extratos de plantas, adubação verde ou biofumigação tornam-se importantes táticas no controle de fitonematoides.

Vários estudos mostram substâncias com efeito nematicida encontradas em extratos obtidos de diversas espécies vegetais (COSTA et al., 2001). Além disso, existem compostos naturalmente exudados, principalmente, na região da rizosfera, atraindo ou repelindo fitonematoides (KAPLAN; KEEN, 1980). Tanto as substâncias dos extratos quanto os exudados apresentam os compostos orgânicos voláteis (COVs), que afetam as interações entre microorganismos (COSTA et al., 2001).

A maioria dos estudos que examina a emissão de COVs dos ecossistemas terrestres tem se concentrado na produção de tais substâncias pelas plantas (CAMPOS; PINHO; FRREIRE, 2010; KESSELMEIER; STAUDT, 1999) que, de acordo com Knudsen e Gershenzon (2006), podem produzir mais de 1700 COVs. Voláteis emitidos, a partir de raízes, podem contribuir para a defesa do solo atuando como substâncias antimicrobianas e anti-herbívoras, ou atrair inimigos de organismos parasitas de raízes (DUDAREVA et al., 2006). No entanto, são poucos os estudos de COVs emitidos por plantas, ou de seus resíduos, demonstrando o efeito tóxico a fitonematoides e realizados de forma a assegurar efeito exclusivo desses COVs. Na maioria dos casos, os estudos são realizados em campo envolvendo, principalmente, crucíferas em biofumigação (OKA, 2009). Assim, técnicas que garantam o contato do nematoide, exclusivamente, com o COVs devem ser aplicadas para melhor entendimento e, posteriormente, identificação dessas moléculas.

Nos últimos anos, cresce o número de trabalhos identificando COVs tóxicos a fitonematoides, principalmente, entre os microrganismos antagonistas, em razão das técnicas disponíveis como a cromatografia gasosa e espectrometria em massa. Gu et al. (2007) identificaram nove COVs emitidos por bactérias com efeito nematicida. Freire et al. (2012) constataram 47 COVs emitidos por *Fusarium oxysporum* que causaram alta mortalidade e imobilidade de *M. incognita*. Em plantas COVs tóxicos a *M. incognita* foram identificados em macerados de nim e de mostarda (BARROS et al., 2014b).

Entre os voláteis mais estudados afetando microrganismos, destaca-se o etanol (CAMPBELL, 1989). Além de representar um combustível de alta performance, ele apresenta propriedades antissépticas e é muito utilizado como solvente orgânico em extratos de plantas utilizados como nematicidas (ABASS; TARIQ; ZAKI, 2009). Mas por suas propriedades antissépticas e tóxicas a microrganismos, até mesmo contra nematoides (KOBARA, 2007), melhores

estudos precisam ser realizados para avaliar mais detalhadamente sua ação exclusiva como fumigante de solo.

Desse modo, neste trabalho, foi verificada atividade tóxica a *M. incognita* de COVs emitidos por macerados de plantas, da biofumigação do solo pelos macerados e da água exposta aos COVs dos macerados. Em seguida, foi feita a identificação dos COVs emitidos pelos macerados de plantas e pela água exposta aos COVs. E, também, foi feita a avaliação dos efeitos tóxicos do etanol a *M. incognita in vitro* e *in vivo*.

CAPITULO 1: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 Importância econômica e controle dos fitonematoides

As perdas causadas por fitonematoides podem variar de imperceptíveis até a morte de maioria das plantas, chegando a inviabilizar áreas para o plantio. Estima-se que em todo o mundo haja um prejuízo de cerca de 100 bilhões de dólares anuais, representando cerca de 12% na produção mundial de alimentos. Setenta por cento dos danos causados por fitonematoides são atribuídos aos *Meloidogyne spp.* (SASSER E FRECKMAN, 1987). *Meloidogyne spp.* provocam nas plantas diversos sintomas como a presença de galhas nas raízes, redução e deformação do sistema radicular, decréscimo da eficiência das raízes na absorção e translocação de água e nutrientes, clorose e menor crescimento da parte aérea, culminando com a redução da produção (TIHOHOD, 1993), além de poderem interagir com outras doenças, pela predisposição das plantas à infecção por fungos ou bactérias. Conseqüentemente, o controle desses patógenos é vital para a exploração agrícola comercial, o que pode ser feito com o uso de nematicidas sintéticos, resultantes da indústria petroquímica (CAMPOS, 1997). O grande problema é que tais substâncias podem ser contaminantes de águas e

alimentos, pois são altamente tóxicas. Atualmente, entre os métodos mais utilizados para o manejo de fitonematoides sem a utilização de nematicidas químicos, podem ser citados: o uso de cultivares resistentes e de rotação de culturas. Além desses, o controle biológico tem se mostrado uma alternativa muito eficaz diante as outras táticas de controle. Já foram relatados mais de 200 organismos considerados inimigos naturais dos fitonematoides, como fungos, bactérias, nematoides predadores, tardígrados, colêmbolas e ácaros (KERRY, 1990). Esse componente biológico do ecossistema do solo é particularmente importante em limitar ou estabilizar as populações dos nematoides através de mecanismos de competição, parasitismo e produção de compostos tóxicos (LOPES, 2007).

Alguns métodos de controle visam à aplicação de extratos ou resíduos produzidos por plantas agindo contra os fitonematoides, mostrando mais uma alternativa no manejo de doenças causadas por esses patógenos. Também, algumas espécies de plantas produzem substâncias nematicidas que são exsudadas no solo atuando na redução desses patógenos.

2 Plantas antagonistas a fitonematoides

Muitos compostos nematicidas foram isolados e identificados a partir de plantas (CHITWOOD, 2002), aumentando, assim, as justificativas para o uso de extratos de plantas, adubação verde ou biofumigação no controle de fitonematoides. O uso de resíduos de plantas da família *Asteraceae* no controle desses patógenos tem sido relatado em vários estudos (OKA, 2009). O gênero mais estudado desse grupo é o *Tagetes*, utilizado em rotação de culturas ou incorporados ao solo para controle de nematoides, principalmente em áreas infestadas por *Pratylenchus* e *Meloidogyne* spp. A folhagem de *Tagetes patula* incorporada ao solo infestado com *Meloidogyne incognita* reduziu sua infestação em plantas suscetíveis (PLOEG, 2000). Também, outras plantas da família

Asteraceae já demonstraram efeitos contra fitonematóides. Extratos de *Artemisia* spp., *A. verlotorum* e *A. absinthium*, mostraram atividade nematicida contra *M. incognita* (DIAS et al., 2000). Apesar de vários estudos já terem sido realizados com plantas da família *Asteraceae*, contendo compostos nematicidas, com exceção de *Tagetes* spp, a incorporação ao solo em experimentos de campo para controle de nematóides, não é uma prática popular (OKA, 2009). Plantas de mamona (*Ricinus communis*) também apresentam potencial na rotação de culturas e adubação verde para supressão de *Meloidogyne arenaria* (RITZINGER E MCSORLEY, 1998), além de sua torta apresentar efeito nematicida quando adicionada ao solo (AKHTAR E MAHMOOD, 1996).

Plantas de *Crotalaria* spp. são utilizadas como cobertura bem como em rotação de culturas, seguida de incorporação ao solo, devido ao seu efeito na supressão de nematóides, além da sua capacidade como fixadoras de nitrogênio (WANG et al., 2002). ROCHA & CAMPOS (2004) induziram a formação de callus, através de hormônios em *Crotalaria juncea* e em culturas de tomateiro (*Lycopersicon esculentum*), cafeeiro (*Coffea arabica*), alfafa (*Medicago sativa*), orquídea (*Dendrobium nobile*), mostarda (*Brassica rapa*), batata doce (*Ipomoea batatas*), fumo (*Nicotiana tabacum*) e cenoura (*Daucus carota*), para demonstrar o efeito dos exudados dessas plantas contra nematóides. Ovos ou juvenis de segundo estágio (J₂) de *Meloidogyne incognita* foram incubados nesses exsudatos e então avaliados quanto às percentagens de eclosão, mobilidade e mortalidade dos J₂. Com exceção dos ovos incubados em exsudato de orquídea, todos os demais inibiram a eclosão dos J₂ quando comparados com a incubação em água. Além disso, todos reduziram a mobilidade e aumentaram a mortalidade, com maior intensidade em 24 h de exposição. Os exudatos excretados pelas raízes podem conter substâncias químicas com ação nematicida ou nematostática (GOMMERS, 1981), podendo também conter substâncias que orientem os nematóides na direção das raízes (BIRD, 1959).

Estudos realizados por HENDERSON et al. (2009), mostraram o efeito da incorporação de farinha de sementes de mostarda (*Brassica carinata*), contra *Meloidogyne chitwood* em campos de batata. A farinha de sementes mostrou eficiência na redução de danos e aumento na produção de tubérculos. Salgado & Campos (2003) estudaram a eclosão e a mortalidade de J₂ de *Meloidogyne exigua* em exposição a extratos aquosos de urucum-colorau (*Bixa orellana*), cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*), canela (*Cinnamomum zeylanicum*), pimenta-do-reino (*Piper nigrum*), gengibre (*Zingiber officinale*), salsa (*Petroselinum crispum*), soro de leite, solução nutritiva hidropônica, solução aquosa de cloreto de sódio (NaCl) e açúcar (sacarose), fermento biológico e probiótico. Entre todos os extratos e produtos testados, maior inibição da eclosão ocorreu no soro de leite, probiótico, canela e cravo-da Índia, destacando-se o soro de leite e o extrato de canela, que além de inibirem a eclosão, também foram altamente tóxicos aos J₂.

Várias plantas aromáticas possuem compostos com capacidade antimicrobiana e inseticida (ISMAN, 1999). Assim, plantas condimentares têm sido estudadas quanto aos efeitos nematicidas de seus derivados. Piedra et al. (2007) avaliaram o efeito de derivados de pimenta no controle de *Meloidogyne incognita* em plantas de tomateiro e verificaram redução do número de galhas em experimentos *in vitro*. Em campo, foi avaliado o efeito combinado entre resíduos de pimenta, esterco e brometo de metila, com ou sem cobertura de plástico, mostrando que todos os tratamentos reduziram o número de galhas e aumentaram o rendimento das plantas.

Óleos extraídos de plantas têm apresentados efeitos nematicidas. Oka et al. (2000) estudaram propriedades nematicidas de óleos essenciais de 27 espécies de plantas aromáticas no antagonismo de *Meloidogyne javanica*. Vinte das vinte e sete essências de plantas imobilizaram mais de 80% dos J₂ a uma concentração de 1µl/litro, sugerindo que óleos essenciais apresentam capacidade

para o controle do nematoide. Meyer *et al.* (2008), estudando o efeito do óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) contra *Meloidogyne incognita*, notou a liberação de voláteis com atividade supressiva na eclosão e na viabilidade dos J2. Foi constatada, nesse óleo, alta concentração de eugenol (74.6-78.6%) com atividade nematicida. A combinação do eugenol com outros componentes presentes no óleo essencial melhorou a atividade supressiva a *M. incognita*.

O uso de plantas que contém compostos nematicidas em rotação de cultura e sua incorporação ao solo, pode ser mais eficaz no controle de nematoides do que com plantas não hospedeiras que não possuem compostos nematicidas (HALBRENDT, 1996).

3 Compostos voláteis produzidos por plantas e tóxicos a nematoides

O termo compostos orgânicos voláteis (COVs) inclui gases residuais orgânicos na atmosfera excluindo o dióxido de carbono e monóxido de carbono, tendo como foco os hidrocarbonetos, porém, excluindo o metano. Assim, um grande número de grupos de derivados saturados, insaturados, e oxigenados estão incluídos dentro de COVs, como os isoprenoides (isopreno e monoterpenos), bem como alcanos, alcenos, carbonilas, álcoois, ésteres, éteres e ácidos (KESSELMEIER & STAUDT, 1999). Os COVs são moléculas com até 20 átomos de carbono com alta pressão de vapor, podem atravessar as membranas livremente e são liberados na atmosfera ou no solo, na ausência de uma barreira de difusão. Vários deles estão presentes nas plantas, perfazendo 1% dos metabólitos envolvidos no metabolismo secundário (DUDAREVA *et al.*, 2006).

Vários compostos nematicidas já foram identificados em uma grande variedade de espécies vegetais. Entretanto, os estudos se concentram nas moléculas não voláteis pré existentes nas plantas. Em outros casos, estudos

mostram o efeito de COVs produzidos durante a incorporação no solo, que são oriundos da decomposição do material vegetal. Os compostos liberados na biofumigação de solos são principalmente aldeídos e isotiocianatos, que possuem atividade biocida e foram relacionados ao controle de fitonematoides (GARCÍA ÁLVAREZ et al., 2004). Os isotiocianatos foram amplamente estudados em plantas da família Brassicaceae na biofumigação do solo em várias regiões do mundo (OKA, 2009). Barros et al. (2014a) mostraram compostos sulfurados na emissão de COVs tóxicos em mostarda na biofumigação de solo. Desse modo, é importante reter os COVs na biofumigação, que são produzidos por pelo menos duas semanas, pois seus efeitos muitas vezes são bioestáticos, tornando-se necessário ter um tempo de exposição prolongado dos patógenos aos COVs (GARCÍA ÁLVAREZ et al., 2004). No entanto, são escassos os estudos sobre COVs produzidos em plantas em relação à determinação dos seus efeitos específicos nos nematoides.

Para determinação do efeito de COVs tóxicos a nematoides, estudos *in vitro*, demonstrando a efetividade da planta devem ser realizados em ambientes fechados sob a influência única dos COVs. Barros et. al (2014b), utilizaram tubos SUPELCO para avaliar o efeito tóxico de COVs produzidos a partir de extrato aquoso e extrato seco de espécies vegetais a *M. incognita*. Os J₂ expostos aos COVs de nim e mostarda apresentaram alta imobilidade e baixa infectividade.

A grande variedade de espécies vegetais que produzem moléculas tóxicas a nematoides ou produtoras de COVs como terpenos, alcanos e outros, traz várias possibilidades de estudos ainda não realizados na área de controle de fitonematoides.

4 Cromatografia gasosa na identificação de COVs tóxicos a fitonematoides

A natureza dos COVs e sua bioquímica requer estudos em ambientes fechados em câmaras especiais, resultando em métodos sensíveis de amostragem dessas moléculas. Esses métodos correspondem na extração estática ou dinâmica de voláteis sobre um adsorvente seguido por dessorção térmica ou por solvente e separação por cromatografia e espectrometria de massa. As análises por cromatografia em fase gasosa / espectrometria de massa (GC / MS) são amplamente utilizados hoje em dia para a identificação de COVs de plantas (D'ALESSANDRO e TURLINGS, 2006; THOLL et al., 2006). Dependendo do objetivo do trabalho, COVs poderiam ser recolhidos a partir de toda uma planta intacta ou partes de uma planta intacta ou, alternativamente, de destacada partes da planta fechados em um recipiente hermético (DUDAREVA, 2006). Como os estudos de COVs de plantas ainda são escassos em fitonematoides, a utilização de GC/MS visando moléculas tóxicas a nematoides não são encontrados na literatura. Por outro lado, COVs tóxicos a fungos já foram caracterizados em espécies vegetais. Por exemplo, os aldeídos (acetaldeído, benzaldeído e cinamaldeído) obtidos de espécies vegetais, apresentaram efeitos altamente tóxicos no crescimento de fungos e de bactérias causadoras de doenças de pós-colheita (UTAMA et al, 2002). No caso de microrganismos, estudos com GC/MS são amplamente utilizados na identificação de COVs. Freire et al (2012), através de cromatografia gasosa, constataram entre COVs tóxicos a J₂ de *M. incognita*, emitidos pelo isolado 21 de *Fusarium oxysporum*, a presença de cariofileno, o 4-metil-2,6-di-teritbutilfenol, o 1-(1,1-dimetiletil)-2-metil-1,3-propanedil-2-etil-propanoato e o acoradieno, além de outros COVs em menor quantidade. Terpenos como Sabineno, eucaliptol, limoneno e α -thujeno já foram identificados em na emissão por plantas responsáveis por efeitos tóxicos a fitonematoides (BARROS et al., 2014b)

5 Etanol como alternativa no controle de doenças

Muitos tecidos de plantas são conhecidos como produtores de etanol, quando eles são submetidos a condições de estresse, como o baixo fornecimento de oxigênio ou presença de inibidores respiratórios, ou em condições naturais em vários tecidos como frutos e sementes (COSSINS, 1963). O etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) é um álcool de baixa densidade (789 g / L), cerca de 20% menos do que a da água. É facilmente solúvel em água e é por si só um bom solvente. Uma solução de 70-85% de etanol pode ser utilizada como um desinfetante, matando organismos por desnaturação de suas proteínas e dissolvendo seus lipídeos. Em testes *in vitro* o etanol na fase volátil inibiu completamente o crescimento de *Rhizopus stolonifer*, *Penicillium digitatum*, *Erwinia carotovora* e outros organismos apodrecedores de frutos (UTAMA et al., 2002). Fialho et al. (2012), mostrou o efeito de uma mistura de moléculas voláteis, incluindo o etanol, na fumigação em placas contendo vermiculita. O efeito dos COVs da mistura na mortalidade aos J₂ de *M. javanica* variou de 30 % a 100 % de mortalidade da menor à maior concentração avaliada.

No campo os efeitos tóxicos na germinação de plantas invasoras pelo etanol têm sido testados apenas recentemente. Kobara et al. (2007), estudando o efeito do álcool quando aplicado no solo com cobertura plástica, verificou alta redução na germinação de plantas invasoras após 7 dias da sua aplicação além de verificar efeito fumigante contra certos microrganismos do solo, incluindo fitonematoides.

Devido a sua condição de excelente solvente, o álcool é muito utilizado na preparação de extratos de planta, muitos dos quais foram testados quanto ao efeito tóxico a fitonematoides. Na maioria dos casos os extratos alcoólicos apresentam melhores resultados quando comparados aos extratos aquosos no antagonismo ao nematoide (TARIQ et al., 2007; DAWAR et al., 2007; ABBAS

et al., 2009). Este fato pode ocorrer devido as moléculas tóxicas serem mais solúveis no etanol, ou pelo efeito do próprio etanol residual na amostra. São escassos os trabalhos com extratos alcoólicos utilizando testemunhas somente com etanol. Assim, são necessárias investigações mais profundas dos efeitos tóxicos do etanol aos fitonematoides com potencial para seu uso prático no campo, podendo também constituir-se como molécula útil na fumigação de solo ou substratos. Também a sua volatilidade tóxica a fitonematoides precisa ser avaliada visando melhorar a metodologia empregada na fumigação, isto é, potencializando-a com cobertura plástica caso sua fase volátil seja relevante.

REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

ABBASS., DAWAR, S., TARIQ, M., & ZAKI, M. J. Nematicidal activity of spices against *Meloidogyne javanica* (Treb) Chitwood. **Pakistan Journal of Botany**, v. 41, n. 5, p. 2625-2632, 2009.

AKHTAR, M. AND MAHMOOD, I. Control of plant-parasitic nematodes with organic and inorganic amendments in agricultural soil. **Applied Soil Ecology**. v. 4, p. 243–247. 1996.

BARROS, A. F., CAMPOS, V. P., DA SILVA, J. C. P., PEDROSO, M. P., MEDEIROS, F. H. V., POZZA, E. A., & REALE, A. L. Nematicidal activity of volatile organic compounds emitted by *Brassica juncea*, *Azadirachta indica*, *Canavalia ensiformis*, *Mucuna pruriens* and *Cajanus cajan* against *Meloidogyne incognita*. **Applied Soil Ecology**, v.80, p. 34-43. 2014b.

BARROS, A. F.; CAMPOS, V. P.; SILVA, J. C. P.; LÓPEZ, L. E.; SILVA, A. P.; POZZA, A.; PEDROSO, L. A. Tempo de exposição de juvenis de segundo estágio a voláteis emitidos por macerados de nim e de mostarda e biofumigação contra *Meloidogyne incognita*. **Nematropica** v. 44 p. 190-199. 2014a.

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

CAMPOS, V. P.; PINHO, R. S., FREIRE, E. S. Voláteis produzidos pela interação entre microorganismos potencialmente úteis no controle de fitopatógenos. **Ciência e Agrotecnologia**. v. 34(3), p. 525-535; 2010.

CAMPOS, V.P. Controle de doenças: Doenças causadas por nematóides In: Vale, F.X.R. & Zambolim, L. (Eds.). **Controle de Doenças de Plantas**. v 1, Viçosa,1997.

CARLI, M.C. Compostos orgânicos voláteis e em extrato aquoso de alho no controle de *Meloidogyne incognita*. Universidade Federal de Lavras, 2011.

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

COSSINS, E. A.; BEEVERS, Harry. Ethanol metabolism in plant tissues. **Plant Physiology**, v. 38, n. 4, p. 375, 1963.

COSTA, M.J.N; CAMPOS, V.P; OLIVEIRA, D.F; PFENNING, L.H. Toxicidade de extratos vegetais e de esterco a *Meloidogyne incognita*. **Summa Phytopathologica**, v. 27, p. 245-250, 2001.

D’ALESSANDRO, M., AND TURLINGS, T. C. J. Advances and challenges in the identification of volatiles that mediate interactions among plants and arthropods. **Analyst**. v. 131. p. 24–32. 2006.

DAWAR, SHAHNAZ; YOUNUS, Sumaira M.; ZAKI, M. JAVED. Use of Eucalyptus sp., in the control of *Meloidogyne javanica* root knot nematode. **Pakistan Journal of Botany**, v. 39, n. 6, p. 2209-2214, 2007.

DIAS, C. R.; SCHWAN, A. V.; EZEQUIEL, D. P.; SARMENTO, M. C.; FERRAZ, S. Efeito de extratos aquosos de plantas medicinais na sobrevivência de juvenis de *Meloidogyne incognita*. **Nematologia Brasileira**. v. 24(2), p.203-210, 2000.

DUDAREVA, N.; NEGRE, F.; NAGEGOWDA, D.A.; ORLOVA, I. Plant volatiles: recent advances and future perspectives. **Critical Reviews in Plant Science**, Philadelphia, v.25, p.417-440, 2006.

FIALHO, M.B.; BESSI, R.; INOMOTO, M.M.; PASCHOLATI, S.F. Nematicidal effect of volatile organic compounds (VOCs) on the plant-parasitic nematode *Meloidogyne javanica*. **Summa Phytopathologica**, v.38, n.2, p.152-154, 2012.

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. Volatile substances on the antagonism between fungi, bacteria and *Meloidogyne*

incognita and potentially fungi for nematode control. **Journal of Nematology**, Hanover, 2012.

GARCÍA ÁLVAREZ, A; DíEZ-ROJO, M.A.; LÓPEZ-PÉREZ, J.A.; BELLO, A. Materia orgánica, biofumigación y manejo de organismos del suelo patógenos de vegetales. **Conocimientos, técnicas y productos para la agricultura y la ganadería ecológica**. p. 71–76, 2004.

GERSHENZON, J. AND CROTEAU, R. Regulation of monoterpene biosynthesis in higher plants. **Recent Advances in Phytochemistry**, v. 24, p. 99–160, 1990.

GOMMERS, F.J. Biochemical interactions between nematodes and plants and their relevance to control. **Helminthological Abstracts**. v. 50, p. 9-21, 1981.

GU, Y. Q. et al. Evaluation and identification of potential organic nematicidal volatiles from soil bacteria. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 39, n. 10, p. 2567-2575, Oct. 2007.

HALBRENDT, J.M., Allelopathy in the management of plant–parasitic nematodes. **Journal of Nematology**. 28, 8–14. 1996.

HENDERSON, D. R.; E. RIGA, R. A.; RAMIREZ, J.; WILSON, AND W. E. SNYDER. Mustard biofumigation disrupts biological control by *Steinernema spp.* nematodes in the soil. **Biological Control** 48:316-322. 2009.

ISMAN, M. Pesticides based on plant essential oils. **Pesticide Outlook** 10:68-72, 1999.

KAPLAN, D.T. & KEEN, N.T. Mechanisms conferring plant incompatibility to nematodes. **Revue de Nématologie**. v. 3, p. 123-134, 1980.

KERRY, B. R. An assessment of progress toward microbial control of plant-parasitic nematodes. **Journal of Nematology**, Lakeland, v. 22, n. 4, p. 621-631, 1990.

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

KNUDSEN, J.T. AND GERSHENZON, J. The chemistry diversity of floral scent. In: DUDAREVA, N.; PICHERSKY, E. (Eds.). **Biology of floral scent**. 27-52, 2006.

KOBARA Y.; UEMATSU S.; TANAKA-MIWA C.; SATO R.; SATO M. Possibility of the new soil fumigation technique with ethanol solution. In: **Proceedings of 2007 annual research conference on methyl bromide alternatives and emissions reduction**, pp 74. 2007.

LOPES, E.A.; FERRAZ S.; FERREIRA P.A.; FREITAS, L.G.; DHINGRA O.D.; GARDIANO C.G.; CARVALHO S.L. Potencial de isolados de fungos nematófagos no controle de *Meloidogyne javanica*. **NEMATOLOGIA BRASILEIRA**, v: 31, p: 20-26, 2007.

MEYER S.L.F; LAKSHMAN D.K; ZASADA I.A; VINYARD B.T; CHITWOOD D.J. Dose–response effects of clove oil from *Syzygium aromaticum* on the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. **Pest Management Science**, v. 64, p. 223–229, 2008.

OKA, Y. Mechanisms of nematode suppression by organic amendments. **A. review Applied Soil Ecology**. 44, 101–115. 2009.

OKA, Y., NACAR, S., PUTIEVSKY, E., RAVID, U., YANIV, Z., SPIEGEL, Y. Nematicidal activity of essential oils and their components against the root-knot nematode. **Phytopathology**, v. 90, p. 710 – 715, 2000.

PIEDRA BUENA, A.; GARCÍA ÁLVAREZ, A.; DÍEZ ROJO, M. A.; ROS, C.; FERNÁNDEZ, P.; LACASA, A.; BELLO. Use of pepper crop residues for the control of root knot nematodes. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2846-2851, 2007.

PLOEG, A.T. Effects of amending soil with *Tagetes patula* cv. Single Gold on *Meloidogyne incognita* infestation of tomato. **Nematology** v. 2, p. 489–493. 2000.

RITZINGER, C.H.S.P. AND MCSORLEY, R. Effect of castor and velvetbean organic amendments on *Meloidogyne arenaria* in greenhouse experiments. **Journal of Nematology**. v. 30, p. 624–631, 1998.

ROCHA, F.S. & CAMPOS, V.P. Efeito de exsudatos de cultura de células de plantas em juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne incognita*. **Fitopatologia Brasileira** v.29, p. 294-299, 2004.

SALGADO, S.M.L. & CAMPOS, V.P. Ecloração e mortalidade de *Meloidogyne exigua* em extratos e em produtos naturais. **Fitopatologia Brasileira**. v. 28, p. 166-170, 2003.

SASSER, J. N.; FRECKMAN, D. W. A world perspective on nematology the role of the society. In: VEECH, J. A.; DICKSON, D. W. (Ed.). **Vistas on nematology**. Maryland: Society of Nematologists, p. 7-14. 1987.

TARIQ, MARIUM et al. Use of *Rhizophora mucronata* in the control of *Meloidogyne javanica* root knot nematode on okra and mash bean. **Pakistan Journal of Botany**, v. 39, n. 1, p. 265, 2007.

THOLL, D.; BOLAND, W.; HANSEL, A.; LORETO, F.; ROSE, U. S. R.; SCHNITZLER, J. P. Practical approaches to plant volatile analysis. **Plant Journal**. v. 45. p. 540–560. 2006.

TIHOHOD, D. **Nematologia Agrícola Aplicada**. Jaboticabal: FUNEP, 372 p. 1993.

UTAMA, I. M. S. et al. In vitro efficacy of plant volatiles for inhibiting the growth of fruit and vegetable decay microorganisms. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 50, n. 22, p. 6371-6377. 2002.

WANG, K.H.; SIPES, B.S.; SCHMITT, D.P. Suppression of *Rotylenchulus reniformis* by *Crotalaria juncea*, *Brassica napus*, and *Tagetes erecta*. **Nematropica** 31, 237–251, 2002.

CAPITULO 2 - ARTIGOS

ARTIGO 1: VOLÁTEIS EMITIDOS POR BRÓCOLIS E GIRASSOL NA BIOFUMIGAÇÃO DE SOLO E RETIDOS EM ÁGUA ATUAM CONTRA *Meloidogyne incognita*.

Julio Carlos Pereira da Silva; Vicente Paulo Campos; Aline Ferreira Barros;

Luma Alais Pedroso; Marcio Pozzobon Pedroso

RESUMO

Compostos orgânicos voláteis (COVs) de plantas incorporadas no solo ainda são pouco estudados no controle de fitonematóides. A emissão de COVs por macerados seco e aquoso de inflorescência de brócolis e semente de girassol foi estudada quanto a atividade nematicida em juvenis do segundo estágio (J₂) de *Meloidogyne incognita* em diferentes tempos de exposição, além do efeito na infectividade e reprodução. Os COVs emitidos pela semente de girassol e pela inflorescência de brócolis demonstraram atividade nematicida a J₂ de *M. incognita* em curtos períodos de tempo. A mortalidade dos J₂ aumentou com o tempo de exposição aos COVs de ambas as espécies vegetais. E a infectividade e reprodução diminuíram quando os J₂ foram expostos aos COVs de girassol. O aumento da concentração do material vegetal no solo reduziu a infectividade e a reprodução pela biofumigação. A água exposta aos COVs emitidos pelo brócolis causou imobilidade aos J₂ em poucas horas, mas a água exposta ao macerado de sementes de girassol não teve efeito contra os J₂. A identificação dos COVs nos macerados por cromatografia gasosa mostrou 6 e 5 grupos químicos emitidos por sementes de girassol e inflorescência de brócolis, respectivamente. Além disso, 8 moléculas foram caracterizadas na água tóxica exposta a inflorescência de brócolis. Os macerados de inflorescência de brócolis e de sementes de girassol demonstraram atividade tóxica diretamente no solo e na emissão de voláteis, mas as moléculas emitidas pela inflorescência de brócolis e retidas na água precisam ser estudadas individualmente para melhor entendimento de seus efeitos.

Palavras chave: Nematóide das galhas. Controle alternativo. Fumigantes. Controle biológico

1 INTRODUÇÃO

O nematoide de galhas, *Meloidogyne incognita*, causa prejuízo a maioria das culturas, tornando-o um dos fitopatogenos mais importantes na agricultura mundial (TRUDGILL E BLOK 2001; ABAD et al., 2008). O seu controle requer alternativas eficientes e mais sustentáveis como a incorporação de órgãos vegetais ao solo (OKA, 2009), e o uso de compostos nematicidas isolados e identificados a partir de plantas (CHITWOOD, 2002). Desta forma, existe interesse para o uso de extratos de plantas, adubação verde ou biofumigação no controle de fitonematoides. O uso da biofumigação com derivados vegetais e até mesmo de animais é uma estratégia sustentável para o controle de patógenos de solo (PLOEG, 2000). A biofumigação do solo geralmente é feita com brássicas devido a presença de glucosinolatos que se transformam em isotiocianatos tóxicos a fitopatogenos (NEVES et al., 2007), como mostrado por Henderson et al. (2009), com a incorporação de farinha de sementes de mostarda controlando *Meloidogyne chitwood* em campos de batata. Algumas brássicas oleaginosas como nabo forrageiro (AL-REHIAYANI et al., 1999) e canola (POTGIETER et al., 2013) têm sido usadas na incorporação e biofumigação para controle de patógenos em geral incluindo os fitonematoides. Várias espécies vegetais oleaginosas também têm apresentadas atividades contra nematoides, principalmente os óleos essenciais extraídos (Oka et al., 2000). Entretanto, as sementes oleaginosas ainda são pouco estudadas na incorporação ao solo quanto ao efeito tóxico a fitopatógenos. Embora proteínas com ação antifúngica tenham sido caracterizadas em flores de girassol (GIUDICI et al., 2000), a ação tóxica das sementes a fitonematoides nunca foi investigada. Além disso, em trabalhos como esses, o efeitos dos compostos orgânicos voláteis (COVs) emitidos pelas plantas não são separados de outras moléculas deixando dúvida sobre o efeito apenas de COVs emitidos por elas.

Milhares de moléculas voláteis produzidas por plantas já foram identificadas, representando cerca de 1 % dos metabólitos secundários por elas produzidos (DUDAREVA et al., 2006). Os COVs são emitidos por plantas e por micro-organismos e têm vários modos de ação na natureza. Órgãos de plantas podem emitir COVs tóxicos a diversos componentes do ecossistema, como os herbívoros (DICKE E VAN LOON 2000) e os fitopatógenos (GU et al., 2007; ZOU et al., 2007; HUANG et al., 2010). Folhas de mostarda e de nim, incorporado ao solo pode emitir COVs tóxicos a *M. incognita* auxiliando no seu controle (BARROS et. al., 2014b). Moléculas voláteis em conjunto com não voláteis controlam fitonematoides pela biofumigação do solo com brócolis (NEVES et al. 2007). Além disso, a água exposta a COVs pode reter essas moléculas emitidas pelas plantas. Os COVs emitidos tanto pelas plantas como por microrganismos retidos na água, podem torná-la tóxica a *M. incognita* (GRIMME et al., 2007; BARROS et al. 2014a). Dessa maneira, além do potencial efeito de COVs emitidos por plantas como brócolis e girassol na biofumigação, a água pode contribuir para uma melhor distribuição de COVs, nela retidos, pelos poros do solo.

Novas técnicas para o estudo do efeito exclusivo dos COVs emitidos por órgãos de plantas (BARROS et. al., 2014a), geralmente são realizadas *in vitro*, avaliando apenas a mobilidade e mortalidade após exposição aos COVs (GU et. al., 2007; CABONI et. al., 2012; LI et. al., 2012). Desta forma, são escassos os estudos *in vivo* avaliando a infectividade e reprodução dos nematoides no hospedeiro após exposição a COVs (HUANG et. al., 2010; FREIRE et. al., 2012; BARROS et. al., 2014a). Neste trabalho, foi estudado o efeito dos COVs emitidos pela inflorescência de brócolis e pela semente de girassol em J₂ de *M. incognita* em diferentes tempos de exposição, além da biofumigação do solo com essas plantas. Foi ainda investigada a possibilidade da água, exposta aos COVs das plantas, tornar-se tóxica aos J₂ de *M. incognita* bem como o tempo de

exposição necessário para tornar a água tóxica. Foram caracterizados também os COVs retidos na água exposta aos vapores de macerados de inflorescência de brócolis e sementes de girassol.

2 MATERIAL E METODOS

2.1 Obtenção do material vegetal e de ovos e juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne incognita*

Foram coletadas inflorescência de brócolis (*Brassica oleracea*) e sementes de girassol (*Helianthus annuus*) nos setores de Olericultura e de Plantas Oleaginosas do Departamento de Agricultura (DAG) - UFLA.

A espécie do nematoide foi caracterizada pela técnica padrão do Laboratório de Nematologia do Departamento de Fitopatologia (DFP) – UFLA, através da técnica de eletroforese das fêmeas de *M. incognita* (CARNEIRO E ALMEIDA, 2001) e pela configuração perineal. Os juvenis de segundo estágio (J₂) utilizados nos experimentos foram obtidos de populações puras de *Meloidogyne incognita* multiplicadas em plantas de tomateiro mantidas em casa de vegetação do Laboratório de Nematologia - UFLA. A suspensão de ovos de *M. incognita* foi obtida conforme a técnica de Hussey e Barker (1973) modificada por Boneti e Ferraz (1981). Para isso, raízes de tomateiro foram lavadas cuidadosamente em água corrente para retirar partículas de solo aderidas, picadas em pedaços de aproximadamente 1 a 2 cm e trituradas em liquidificador com solução de NaClO 0,5% por, aproximadamente, 20 segundos. A suspensão de ovos e raízes foi vertida em uma peneira de 0,074 mm de abertura (200 “mesh”), acoplada à outra de 0,025 mm (500 “mesh”), ficando os ovos retidos nesta última. Os ovos obtidos foram incubados em câmara de eclosão a 28 °C. Apenas os J₂ eclodidos após 48 horas da montagem da câmara serão utilizados nos experimentos,.

2.2 Mortalidade e infectividade de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne incognita* em tomateiros após exposição por diferentes tempos aos voláteis emitidos pela inflorescência de brócolis e sementes de girassol.

Para esse ensaio foram utilizadas como produtoras de COVs as sementes de girassol e inflorescência de brócolis, nas concentrações de 15 g.100 ml⁻¹ de água (macerado aquoso) ou em 1,5 g sem água (macerado seco). Empregou-se a técnica desenvolvida por Barros et al., (2014a). Para isso, após o preparo dos tubos SUPELCO com areia e a introdução de um microtubo de 1,5 ml na areia foi feita adição do extrato vegetal entre as paredes do tubo SUPELCO e do microtubo. Os frascos foram vedados e incubados a 25°C no escuro por 3 dias, para estocagem dos COVs. Em seguida, 1 ml de uma suspensão de 100 J₂ de *M. incognita* foi depositado com uma seringa no interior do microtubo e incubado a 25° C (± 2° C) por 3, 6, 12, 24, 48 ou 72 horas. As testemunhas constaram da deposição de 2 ml de água pura na areia e foram preparadas para cada tempo de exposição dos J₂. Ao final de cada tempo de exposição dos J₂ aos COVs, os frascos foram abertos e a suspensão de J₂ contida nos microtubos foi transferida para placa ELISA e contado o número de J₂ móveis e imóveis. A mortalidade dos J₂ foi avaliada após 24 horas, considerando os J₂ ainda imóveis como mortos.

Em outro ensaio avaliou-se a infectividade dos J₂, após cada tempo de exposição aos COVs emitidos por sementes de girassol nos macerados seco e aquoso, seguindo a mesma técnica descrita anteriormente. No entanto, no microtubo foi aplicado com seringa uma suspensão contendo 600 J₂ em substituição aos 100 J₂ do teste de mortalidade. Na testemunha utilizou-se água destilada e esterilizada em substituição ao material vegetal. Após a avaliação da mortalidade em alíquota de 0,2 ml, a suspensão remanescente de J₂ (aproximadamente 500 J₂), exposta por 3, 6, 12, 24, 48 ou 72 horas, foi dispersa

em 4 ml de água e inoculada em muda de tomateiro com 20 dias de idade, plantada em sementeira com células de 75 cm³ contendo substrato Plantmax®. Após a inoculação, as mudas foram mantidas em casa de vegetação. O número de galhas e ovos por sistema radicular foi avaliado 30 dias após a inoculação.

2.3 Mortalidade e infectividade de juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne incognita* após exposição em diversas concentrações de macerados de semente de girassol e de inflorescência de brócolis.

Sementes de girassol e inflorescência de brócolis foram esterilizadas superficialmente pela embebição em hipoclorito de sódio a 2,0 % por 1 minuto, seguido de lavagem em água destilada. Após a secagem superficial em câmara de fluxo laminar, o material foi usado na preparação dos extratos que representaram 0 %, 1 %, 2 %, 4 % e 8 % do volume do solo. Para isso, 0, 1,2, 2,4, 4,8 ou 9,6 g do material colhido e esterilizado, foi colocado em cadinho de porcelana e macerado manualmente sem adição de água (macerado seco). O controle foi a aplicação de 20 ml de água destilada sem o material vegetal, representando a concentração de 0 g. Após a preparação, os macerados foram colocados em copos com capacidade de 300 ml contendo substrato estéril. Em cada copo a umidade do solo foi ajustada para 60 % da capacidade de campo. Em seguida, foram dispersos 5 ml de uma suspensão contendo 5000 ovos de *M. incognita* em cada copo. O substrato com os ovos e o material vegetal ou a água foi revolvido visando à homogeneização da mistura. Na superfície da mistura foi enterrado até a metade, um microtubo de 1,5 mL. Todo este conjunto foi envolto em filme plástico, para vedação do copo. Após 3 dias foi injetado com seringa 1 mL de uma suspensão contendo 100 J₂ no interior do microtubo. O local perfurado foi vedado com fita adesiva evitando perdas de voláteis. Os J₂ contidos no microtubo foram expostos por 48 horas aos COVs produzidos pelo extrato aquoso. A seguir, o filme plástico foi removido e os J₂ nos microtubos foram

transferidos para placa de ELISA e estimado o número de J₂ móveis, imóveis e mortos. Os J₂ ainda imóveis após 24 horas da primeira contagem foram considerados mortos.

Após a retirada do filme plástico e dos microtubos uma muda de tomateiro contendo 4 pares de folhas foi transplantada em cada copo contendo a mistura e os ovos de *M. incognita*. Aos 45 dias após o transplante foi avaliado o número de galhas e ovos por sistema radicular.

2.4 Exposição da água aos voláteis emitidos pela inflorescência de brócolis e semente de girassol e toxicidade em juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne incognita*

Na avaliação da água exposta aos voláteis emitidos por sementes de girassol e inflorescência de brócolis usou-se o macerado seco e as placas bipartidas (FERNANDO et al., 2005; BARROS et al., 2014a). Em um dos compartimentos da placa bipartida foram colocadas 5 g do macerado seco de sementes de girassol ou 5 g de macerado seco de inflorescência de brócolis. No compartimento contíguo foi colocado 1 ml de água destilada e esterilizada. Logo em seguida, as placas foram fechadas e vedadas com filme plástico e mantidas a 25 °C por 3 dias. Como controle usou-se o isolado 21 de *Fusarium oxysporum*, que produziu COVs e tornou a água tóxica pela imobilização de 100% dos J₂ de *Meloidogyne incognita* em trabalho anterior (dados não incluídos). Nesse controle com *F. oxysporum* fez-se uma perfuração na tampa para expor a água aos COVs fúngicos 5 dias após a repicagem. No compartimento com meio de cultura YES (Yeast extract sucrose agar - extrato de levedura 20 g, sacarose 150 g, MgSO₄.7H₂O 0.5 g e ágar 20 g) foi colocado um disco de 5 mm de diâmetro do isolado de *F. oxysporum*, transferido das bordas da sua colônia, crescido em meio MA (Malte-ágar - malte 20 g e ágar 20 g). Cinco dias após o crescimento

fúngico, 1 ml de água foi colocado no compartimento contíguo através do furo na tampa, e lá permaneceu exposta aos COVs do fungo por 3 dias. Também constituíram controles, a água destilada e esterilizada e os ingredientes do meio YES, onde o fungo foi cultivado, em substituição ao extrato da planta. A seguir, a água exposta aos voláteis do material vegetal, do isolado fúngico ou dos demais controles foi recolhida das placas e colocada em um microtubo de 2 ml e nele pipetado uma suspensão de 0,5 ml com 100 J₂. Os tubos foram armazenados a 25 °C (± 2 °C) por 48 horas, quando, então, foram abertos e avaliados o número de J₂ móveis, imóveis e mortos.

Em outro ensaio foi estudado diferentes tempos de exposição da água aos voláteis de brócolis. Para isso, em um dos compartimentos da placa bipartida foram colocados 5 g de macerado a seco de inflorescência de brócolis. No compartimento contíguo foi colocado 1 ml de água destilada e esterilizada. Logo em seguida, as placas foram vedadas com filme plástico e mantida a 25° C por 6, 12, 24, 48 e 72 horas. Ao final de cada período, a água das placas com material vegetal foi recolhida e colocada em um tubo epperdorff, e nele pipetados uma suspensão de 0,5 ml com 100 J₂. Os tubos foram armazenados a 25° C por 48 horas. A seguir os tubos foram abertos e avaliado o número de J₂ móveis e imóveis.

Como testemunhas foram utilizadas placas contendo somente água em um dos compartimentos e a suspensão de J₂ no compartimento contíguo sem exposição aos extratos, pelos mesmos períodos de tempo.

2.5 Caracterização dos compostos orgânicos voláteis

Para a extração dos COVs foi empregada a microextração em fase sólida (SPME) no modo *headspace* (ARTHUR; PAWLISZYN, 1990) e foram adotados os seguintes parâmetros: fibra DVB/CAR/PDMS (Divinilbenzeno, Carboxen, Polidimetilsiloxano); temperatura de extração de 55 °C e agitação da

amostra a 250 rpm, tempo de extração de 35 minutos e tempo de dessorção no injetor do GC de 2 minutos. Para a separação e identificação dos COVs foi usado 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% fenil-95% dimetilsiloxano) de dimensões 30 m × 0,25 mm × 0,25 µm. A temperatura do injetor foi de 250 °C, da interface de 240 °C e 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 usado 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 MS foi operado no modo de varredura na faixa de 40-350 v.µa. 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) v. 2.63. 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 - DC, USA) e por comparação entre os índices de retenção obtidos experimentalmente (RI Exp.) com os índices de retenção da literatura (RI Lit.) (Adams 2007; NIST 2013; Rohloff and Bones 2005). Para a comparação entre os espectros de massas foram considerados somente picos em que a similaridade entre os espectros foi maior que 80%. Os índices de retenção experimentais foram obtidos através da injeção de uma série homóloga de alcanos. A extração dos COVs foi realizada nos macerados seco (1,5 g), aquoso (15 g.100 ml⁻¹) e a água exposta aos COVs de inflorescência de brócolis e de sementes de girassol das placas bipartidas deixadas por 72 horas de exposição.

2.6 Análises estatísticas

Todos os ensaios realizados foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizados com 6 repetições. No experimento sobre exposição dos J_2 de *M. incognita* por diferentes períodos de tempo aos voláteis emitidos por brócolis e girassol empregou-se a análise de variância (Three-way ANOVA) e usou-se esquema fatorial, com 3 macerados vegetais (seco, aquoso e testemunha) x 6 períodos de tempo, constituindo-se 18 tratamentos para cada planta (2 espécies) para avaliação da mortalidade e infectividade. No ensaio sobre a biofumigação de substrato e dos voláteis emitidos por brócolis e girassol em diferentes concentrações foi feita a análise de variância Two-way ANOVA utilizando esquema fatorial com 2 plantas (brócolis e girassol) x 5 concentrações, com o total de 10 tratamentos. Nos experimento para avaliação do efeito da água exposta aos COVs de girassol, brócolis e o fungo foi feita análise de variância One-way ANOVA para diferenciar as plantas e o fungo. A seguir, foram verificados os diferentes tempos de exposição e a avaliação da água exposta aos COVs de brócolis por diferentes tempos, com o total de 6 tratamentos. Os resultados foram previamente submetidos a testes de normalidade (Shapiro- Wilk) e homogeneidade de variância dos erros (Bartlett). A seguir, aplicou-se o teste F, por meio da análise de variância. Quando o teste F foi significativo ($P < 0,05$), as médias referentes aos diferentes tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Por sua vez, o efeito do tempo de exposição e as concentrações dos macerados ou da água exposta foi avaliado por meio de modelos de regressão lineares e não lineares

3 RESULTADOS

3.1 Mortalidade e infectividade de juvenis de segundo estágio em tomateiros após exposição em diferentes tempos aos voláteis.

Houve interação significativa entre plantas e os macerados ($P < 0,01$). Os COVs emitidos pelo macerado de semente de girassol causaram maior mortalidade aos J₂ de *M. incognita* do que àqueles emitidos pela inflorescência de brócolis, tanto no extrato seco como no aquoso. Apenas os COVs emitidos pelo macerado seco de inflorescência de brócolis causaram maior mortalidade em relação ao controle ($P < 0,01$). Entretanto, ambos os COVs emitidos pelos macerados seco e aquoso emitidos pelas sementes de girassol causaram mortalidade significativamente maior em relação ao controle ($P < 0,01$) (Tabela 1).

Tabela 1: Mortalidade de juvenis do segundo estágio expostos aos voláteis de inflorescência de brócolis e de sementes de girassol em macerado seco (1,5g) e aquoso (15 g.100 ml⁻¹).

Tratamentos	Mortalidade (%)	
	Brócolis	Girassol
Testemunha (água)	6,36 bA	11,50 bA
Aquoso	6,29 bB	51,37 aA
Seco	16,61 aB	50,66 aA

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, letras minúsculas na coluna e letras maiúsculas na linha, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

A exposição dos J₂ aos COVs por diferentes tempos refletiram o progresso da ação tóxica desses voláteis (Figuras 1,2). O aumento do tempo de exposição dos J₂ aos COVs emitidos por sementes de girassol tanto no macerado seco ($P < 0,01$) quanto no aquoso ($P < 0,01$), aumentou significativamente a

mortalidade dos J₂, chegando a 93% e 98% de mortalidade com 48 e 72 horas de exposição respectivamente (Figura 1a). Nesses períodos de exposição, dos J₂ aos COVs emitidos pela inflorescência de brócolis, a mortalidade aumentou significativamente em relação a testemunha, mas não alcançou altos valores como na exposição aos COVs do girassol tanto no macerado seco ($P < 0,01$) quanto no aquoso ($P < 0,01$) chegando a 43% e 15% de mortalidade dos J₂ expostos a eles, respectivamente (Figura 1b).

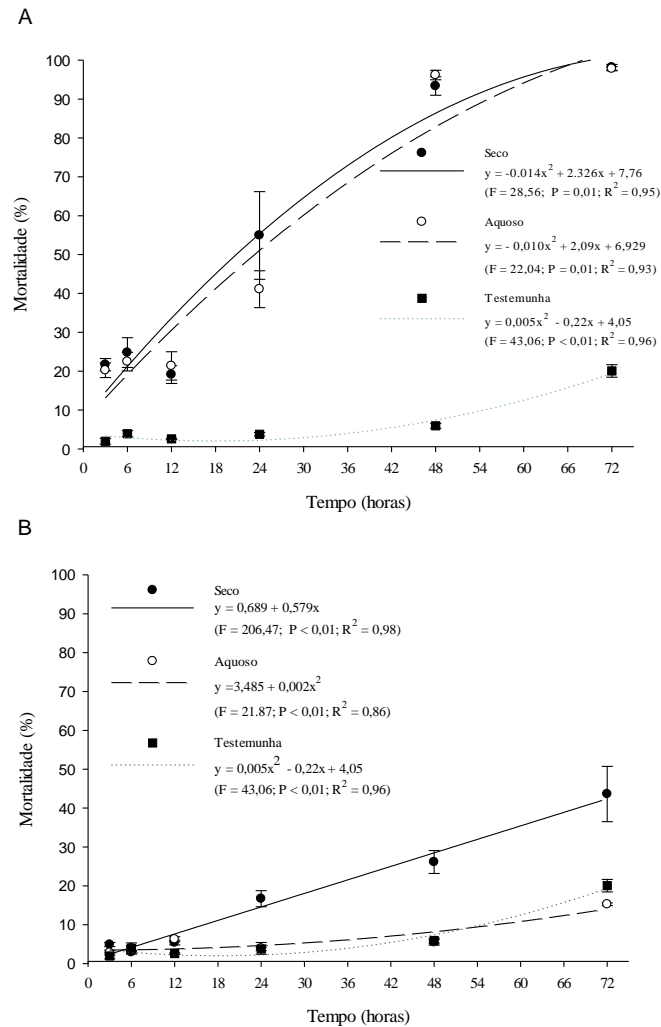


Figura 1: Mortalidade de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne incognita* em diferentes tempos de exposição aos Compostos orgânicos voláteis de: A) Sementes de girassol; B) inflorescência de brócolis. Barras representam o erro padrão da média.

A infectividade dos J_2 de *M. incognita* avaliada pelo número de galhas e a reprodução pelo número de ovos em raízes de tomateiro após exposição aos COVs emitidos pelos macerados seco e aquoso de sementes de girassol

decreceram com o aumento do tempo de exposição dos J₂ e diferiram significativamente do controle a partir de 24 horas ($P < 0,01$) de exposição aos COVs de ambos os macerados (Figura 2).

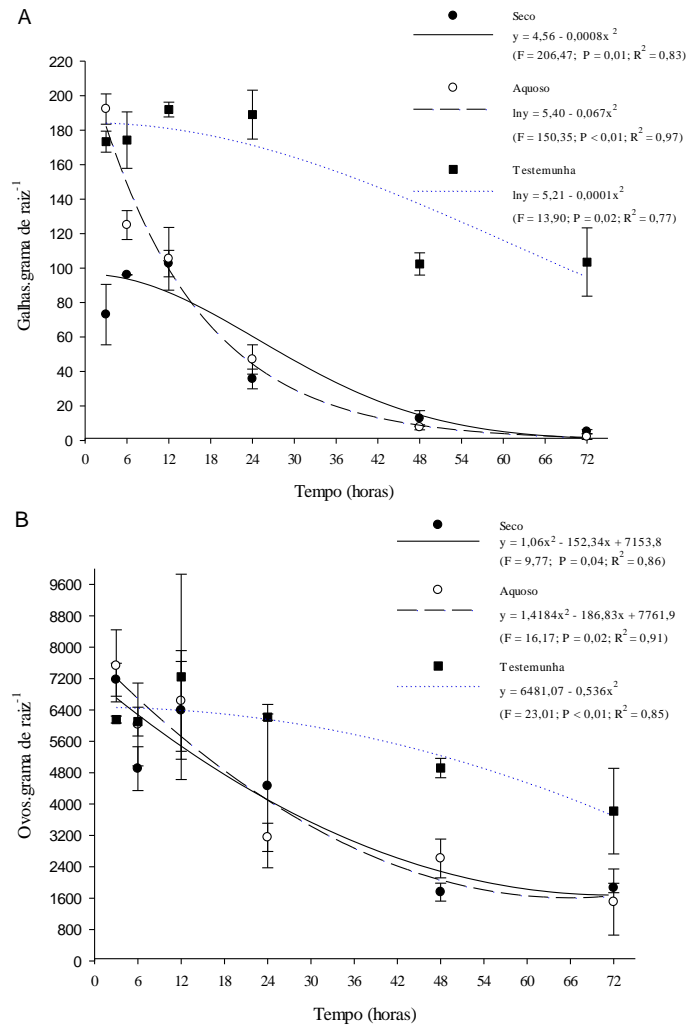


Figura 2: Infectividade de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne incognita* em diferentes tempos de exposição aos voláteis de extratos de girassol. A) número de galhas.grama de raiz⁻¹; B) número de ovos.grama de raiz⁻¹. Barras representam o erro padrão da média.

3.2 Imobilidade, mortalidade, infectividade e reprodução de juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne incognita* em diversas concentrações dos macerados de girassol e de brócolis incorporados ao substrato.

A imobilidade dos J2 expostos aos COVs emitidos pelo substrato misturado macerado sementes de girassol foram sempre superiores aos macerados de inflorescência de brócolis até a concentração de 4 % de macerado ($P < 0,01$). Os COVs emitidos pelo substrato misturados a semente de girassol causaram imobilidade próxima a 100 % na concentração de 2 % de macerado, enquanto os COVs de macerado de brócolis somente apresentaram esse efeito na concentração de 4 % (Figura 3a). A mortalidade causada pelos voláteis emitidos pela mistura de substrato e macerados de sementes de girassol foi superior a mortalidade causada pelos voláteis de brócolis. Na concentração de 8 % os COVs emitidos pelos macerados de girassol e de brócolis causaram 64 % e 46 % de mortalidade, respectivamente (Figura 3b).

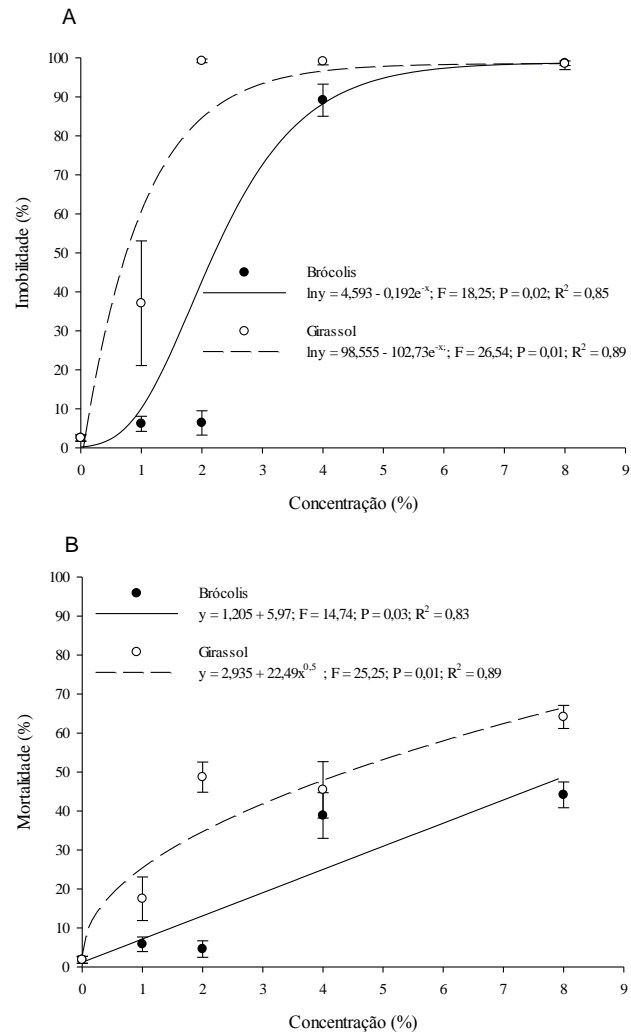


Figura 3: Juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne incognita* expostos aos compostos orgânicos voláteis de macerados seco de inflorescência de brócolis e sementes de girassol em diferentes concentrações. A) Imobilidade; B) Mortalidade. Barras representam o erro padrão da média.

Na infectividade e reprodução não houve interação significativa entre as plantas com o aumento da concentração do macerado de inflorescência de brócolis e sementes de girassol no substrato na redução do número de galhas (P

= 0,28) e no número de ovos ($P = 0,98$). O aumento da concentração dos macerados de ambas as plantas no solo reduziu significativamente a infectividade ($P < 0,01$) e a reprodução ($P < 0,01$) do *M. incognita* em raízes de tomateiro, desde a incorporação de 1 %. Na concentração de 8 % do macerado de ambas as espécies vegetais incorporado ao substrato, o número de galhas e de ovos por grama de raiz foi reduzido em 89 % e 95 % respectivamente, em relação a testemunha (concentração 0)(Figura 4).

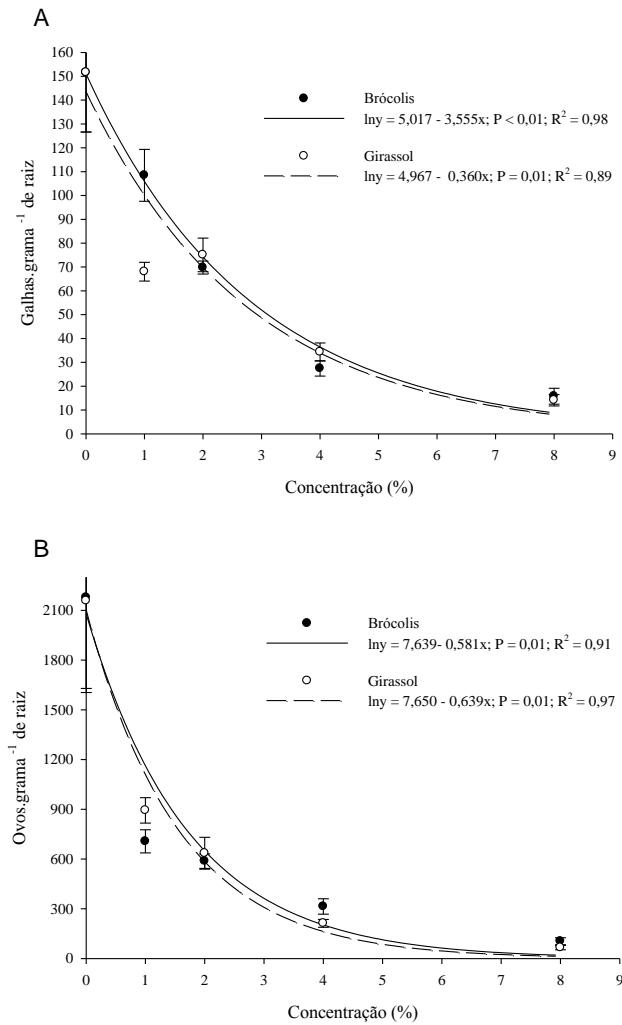


Figura 4: Infectividade de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne incognita* expostos aos compostos orgânicos voláteis de macerados de inflorescência de brócolis e sementes de girassol em diferentes concentrações. A) Galhas.grama⁻¹; B) Ovos.grama⁻¹. Barras representam o erro padrão da média.

3.3 Exposição da água aos voláteis emitidos pelo brócolis e girassol e a toxicidade aos juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne incognita*:

A água, quando exposta aos COVs produzidos pela inflorescência de brócolis e pelo isolado 21 de *Fusarium oxysporum* por 3 dias, tornou-se significativamente tóxica aos J₂ de *M. incognita* causando 97% de imobilidade ($P < 0,01$). Por outro lado, a água exposta aos COVs de sementes de girassol causou baixa imobilidade, sendo igual aos controles com água e com meio de cultura. A mortalidade dos J₂ expostos aos COVs emitidos por ambas as plantas e pelo isolado do fungo foi baixa e semelhante aos controles ($P = 0,05$) (Figura 5). Desta forma, definiu-se a curva de progresso da toxicidade da água exposta ao macerado de brócolis realizada em outro ensaio.

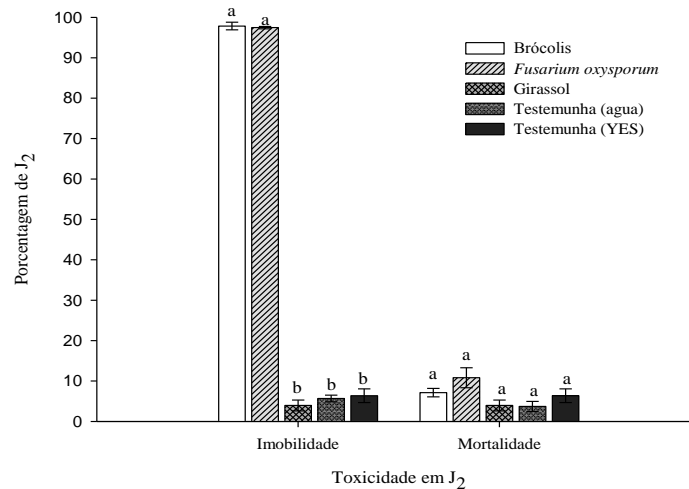


Figura 5: Imobilidade e mortalidade dos juvenis do segundo estágio (J₂) de *Meloidogyne incognita* expostos aos compostos orgânicos voláteis de extrato seco de inflorescência de brócolis e sementes de girassol e de isolado 21 de *Fusarium oxysporum*. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si no mesmo grupo pelo teste de Tukey no nível de 5% de probabilidade. Barras representam o erro padrão da média.

O aumento do tempo de exposição aos COVs emitidos pelo macerado inflorescência de brócolis tornou a água significativamente mais tóxica ($P < 0,01$) até 3 dias de exposição. Mesmo em períodos curtos de tempo de exposição a imobilidade foi alta nos J_2 de *M. incognita*. A partir de 6 horas de exposição aos COVs, a água causou imobilidade significativa nos J_2 em relação a testemunha. A partir de 24 horas de exposição a imobilidade foi aproximadamente em 100 % dos J_2 (Figura 6).

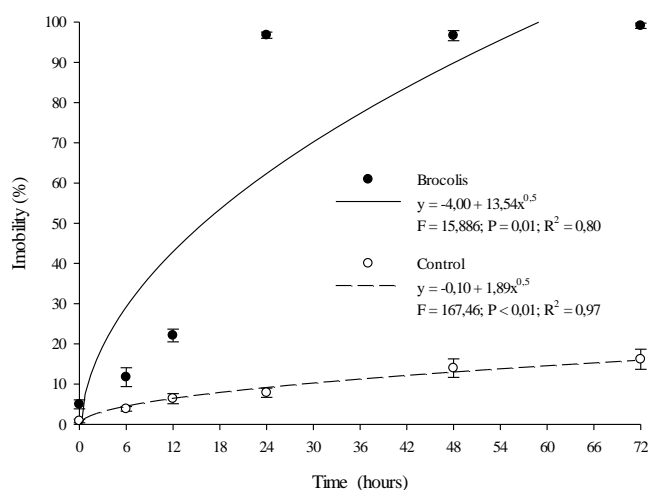


Figura 6: Imobilidade de juvenis de segundo estágio (J_2) de *Meloidogyne incognita* em água exposta aos compostos orgânicos voláteis de macerados de inflorescência de brócolis por diferentes tempos de exposição. Barras representam o erro padrão da média.

3.4 Identificação por GC-MS dos voláteis emitidos pelos macerados de brócolis e girassol e pela água exposta aos macerados.

O número de moléculas encontradas pela GC-MS foi diferente nas emissões voláteis dos macerados seco e aquoso da inflorescência de brócolis e

de semente de girassol. Maior número de moléculas foi encontrado no macerado seco de brócolis (20 moléculas) e em menor número na água exposta (8 moléculas). Já em sementes de girassol maior número de moléculas foi encontrado na emissão do macerado aquoso (25 moléculas) e também um menor número na água exposta aos voláteis (13 moléculas). Todas as moléculas presentes na emissão do macerado aquoso de inflorescência de brócolis e na água exposta estavam presentes também na emissão do macerado seco, além de sete moléculas presentes somente na emissão do macerado seco (hexanol, fenietil álcool, tetrassulfeto de dimetila, pentanoato de trans-3-hexenila, pentanoato de cis-3-hexenila heptanol, 2-nonanal). Na água exposta aos COVs de inflorescência de brócolis apenas ocorreram moléculas dos grupos de alcoóis e sulfurados (Tabelas 2 e 3).

Os compostos identificados nos macerados foram categorizados em ausente (não detectadas), presente ("v") ou presente em maior intensidade ("vv"). No macerado seco de inflorescência de brócolis ocorreu um maior número de moléculas em maior concentração do que no macerado aquoso e na água exposta. Quase a metade das moléculas encontradas na água exposta aos COVs não estavam presentes no macerado seco de sementes de girassol (6 moléculas ausentes), mas encontravam-se presentes no macerado aquoso. A diversidade de moléculas encontradas na água exposta aos COVs de macerados de sementes de girassol inclui representantes nos grupos álcool, cetona e terpenos. Já na água exposta ao macerado de brócolis incluíram apenas alcoóis e sulfurados. A emissão nos macerados de girassol apresentou maior diversidade de moléculas tanto no seco quanto no aquoso, comparada com a emissão dos macerados de brócolis. Os COVs emitidos pela semente de girassol dos grupos cetona, ésteres e fenol foram encontrados somente no macerado aquoso, enquanto os aldeídos foram identificados somente no macerado seco. Porém, álcool e terpenos foram encontrados em ambos os macerados.

Tabela 2: Compostos orgânicos voláteis identificados em inflorescência de brócolis pela SPME -GC-MS:

Composto	RI Exp.	RI Lit. ^a	Similar. (%)	Macerado seco	Macerado aquoso	Água exposta
Alcool						
1 Etanol	-	-	96	v		v
2 3-pentanol	693	685	88	v	v	v
3 3-metil-butanol	730	734	92	v		v
4 trans-3-hexenol	849	851	95	vv		v
5 cis-3-hexenol	855	857	92	vv		v
6 hexanol	869	869	91	vv		
7 feniletíl álcool	1110	1116	88	v		
Sulfurado						
1 metanotiol	-	-	91	v	v	
2 dimetilsulfeto	-	-	92	v	v	v
3 tiocianato de metila	709	711	91	v	v	v
4 dissulfeto de dimetila	738	744	97	vv	vv	v
5 trissulfeto de dimetila	968	955	92	vv	v	
6 tetrassulfeto de dimetila	1211	1222	93	v		
Ester						
1 pentanoato de trans-3-hexenila	1225	-	91	v		
2 pentanoato de cis-3-hexenila	1230	1235	91	v		
Aldeido						
1 2-heptenal	957	964	82	vv		
2 nonanal	1098	1102	91	v		
Cetona						
1 2-nonanona	1086	1091	91	v	v	
Outros						
1 4-metiltio-butanonitrila	1079	1051	88	v	v	
2 5-metiltio-pentanitrila	1192	1174	88	vv	vv	

v—molécula presente; vv—molécula em maior concentração.

^a Índice de retenção teórico de acordo com a literatura (R.P. Adams, Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, 4th Ed., Allured

Publishing Corp., Carol Stream, 2007.) (<http://webbook.nist.gov/chemistry/>)(Jens Rohloff, Atle M. Bones; *Phytochemistry* 66 (2005) 1941–1955).

^b moléculas com fragmentação padrão similares ao isothiocyanate.dSpectrum: m/z [151]⁺(65%), [133] (100%), [135] (26%), [134] (9%), [68] (8%), [77] (4%), [75] (2%)

Tabela 3: Compostos orgânicos voláteis identificados em sementes de girassol pela SPME -GC-MS:

	Composto	RI Exp.	RI Lit. ^a	Similar. (%)	Macerado seco	Macerado aquoso	Água exposta
Álcool							
1	Etanol	-	-	98	vv		v
2	3-metil-butanol	732	734	96	v	vv	v
3	2-metil-butanol	736	738	92	v		v
4	2,3-butanodiol	819	-	96	v	vv	
5	1-hexanol	869	869	92	v	v	v
6	2-heptanol	904	905	94		vv	
7	2-etil-hexanol	1030	1029	88		v	v
8	2-nonanol	1097	1097	88		vv	
9	2-undecanol	1297	1301	88		v	
Terpenos							
1	a-thujeno	924	924	92	v		
2	a-pineno	932	932	94	vv	v	
3	thuja- 2,4(10)diene	952	953	80		v	vv
4	Sabineno	972	969	81	v		
5	b-pineno	977	974	86	v		
6	a-terpineno	1016	1014	88	v		
7	o-cimeno	1023	1022	93	v		
8	limoneno	1027	1024	92	v		
9	eucaliptol	1030	1026	91	v		
10	g-terpineno	1054	1054	88	v		
11	trans- pinocarveol	1135	1135	91		v	
12	cis-verbenol	1141	1137	88		v	v
13	terpienol	1175	1177	92	v	v	vv
14	Mirtenol	1192	1193	90		v	v
15	verbenone	1203	1204	86	v		v

Continuação							
Composto	RI Exp.	RI Lit. ^a	Similar. (%)	Macerado seco	Macerado aquoso	Água exposta	
Ester							
1	s-metil- tiopropanoato	797	-	81		v	
2	s-metil tiooctanoato	1291	1293	91		v	
Aldeido							
1	3-metil-butanal	649	654	89	v		
2	2-metil-butanal	658	664	92	v		
Cetona							
1	2-pentanona	684	685	94		v	v
2	2,3-heptadiona	832	-	95		v	
3	2-heptanone	888	889	91		vv	v
4	3-octanona	987	988	85		vv	
5	2-nonanona	1086	1091	92		v	
6	2-undecanona	1287	1293	90		vv	
Fenol							
1	p-vinil guaiacol	1307	1309	92		v	
2	Fenol	993	992	95		vv	
Outros							
1	ácido acético	702	-	97	v		v
2	não identificado ^b	943	-	-		vv	
3	não identificado ^b	1270	-	-		vv	

v—molécula presente; vv—molécula em maior concentração.^a Índice de retenção teórico de acordo com a literatura (R.P. Adams, Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, 4th Ed., Allured Publishing Corp., Carol Stream, 2007.) (<http://webbook.nist.gov/chemistry/>)(Jens Rohloff, Atle M. Bones; Phytochemistry 66 (2005) 1941–1955).

^b moléculas com fragmentação padrão similares ao isothiocyanate. dSpectrum: m/z [151]⁺(65%), [133] (100%), [135] (26%), [134] (9%), [68] (8%), [77] (4%), [75] (2%).

4 DISCUSSÃO

Os macerados de brócolis e de sementes de girassol emitiram COVs com alta atividade nematicida a *M. incognita* em ambos os macerados. Em outras plantas, como *Brassica juncea*, *Azadirachta indica*, *Canavalia ensiformis*, *Mucuna pruriens* e *Cajanus cajan*, os COVs causaram imobilidade a *M. incognita* em macerados seco e aquoso (Barros et al., 2014a). Tanto em brócolis quanto em girassol, neste trabalho, observou-se que o aumento das atividades contra os nematoides com aumento do tempo de exposição aos COVs. Esse aumento nos efeitos tóxicos foi observado por Barros et al., (2014b), quando submeteram J₂ de *M. incognita* a diversos períodos de exposição aos COVs de nim e mostarda.

A alta redução da infectividade e da reprodução dos J₂ expostos aos COVs emitidos por sementes de girassol e brócolis (Figura 4) parece ter explicação pela alta imobilidade dos J₂ e não pela mortalidade (Figura 3). Ao que tudo indica esses COVs devem atuar no sistema nervoso dos nematoides reduzindo a capacidade dos J₂ de encontrar o hospedeiro ou de formar o sitio de alimentação. Os J₂ expostos a alguns nematicidas apresentam bloqueio na atividade da enzima acetil colinesterase resultando em menor atração para o local de penetração no hospedeiro (BAILLIE AND WRIGHT, 1985). COVs emitidos por plantas causaram baixa mortalidade e alta imobilidade reduzindo a infectividade de J₂ de *M. incognita* em tomateiro (BARROS et al., 2014 a,b). A redução na infectividade de J₂ mantidos em água, sem exposição aos COVs de sementes de girassol, ocorre pela perda na energia corporal (lipídios) (FREIRE et al, 2007), porém a redução é acelerada na presença dos COVs tóxicos (FREIRE et al, 2012), como aconteceu com os J₂ expostos aos COVs de brócolis e sementes de girassol neste trabalho.

O efeito dos COVs emitidos pelos macerados de sementes de girassol e de brócolis incorporados no substrato na imobilidade e mortalidade dos J₂, juntamente com a redução da infectividade e da reprodução da mistura em tomateiro, demonstram a combinação de efeitos de moléculas voláteis e não voláteis na toxicidade a *M. incognita*. O efeito conjunto dessas moléculas já tem demonstrado sua eficácia na redução populacional de fitonematoides pelo uso de plantas na biofumigação do solo (NEVES et al. 2007, ROUBTSOVA et al. 2007, WANG et al., 2009). Além disso, sementes de girassol contém moléculas não voláteis como fenóis e terpenos com funções importantes de defesa contra insetos, herbívoros e fungos no solo (KUPIDLOWSKA et al., 2006), mostrando o potencial para uso na incorporação do solo no controle de patógenos. Folhas de nim e mostarda mostraram toxicidade a *M. incognita* quando incorporadas ao solo potencializando o conjunto dos COVs e moléculas não voláteis (BARROS et al., 2014b). De fato, a retenção de COVs no ambiente pela biofumigação pode aumentar a eficiência no controle de fitonematoides. O controle de *Globodera pallida* com cobertura plástica após incorporação de brássicas apresenta maior sucesso e pode ser correlacionada com a presença de COVs como isotiocianatos (LORD et al., 2011). No uso de nematicidas com isotiocianato de metila como princípio ativo, recomenda-se a cobertura plástica após sua aplicação para maior retenção do volátil. Entretanto, a toxicidade de plantas a fitonematoides na biofumigação envolve outras moléculas além dos isotiocianatos (VERVOORT et al., 2013). Desse modo, outros COVs emitidos por plantas podem também ser responsáveis pelo efeito tóxico na biofumigação do solo.

A toxicidade causada aos J₂ de *M. incognita* pela água exposta aos COVs emitidos pela inflorescência de brócolis demonstra que essas moléculas foram dissolvidas no meio aquoso onde estavam os nematoides. Toxicidade também foi observada em J₂ de *M. incognita* pela água exposta aos COVs emitidos por *Muscodor albus*, após exposição da água por cinco dias (GRIMME

et al., 2007), assim como pela água exposta aos COVs emitidos por folhas de nim após exposição por 3 dias (BARROS et al. 2014a). Os COVs emitidos pelo brócolis tornaram a água tóxica em menos de 24 horas de exposição. Isso indica que retenção dos COVs tóxicos ocorre em curtos períodos de tempo. Dessa maneira, a incorporação do material vegetal no solo com seus efeitos tóxicos tanto de moléculas voláteis como não voláteis somados a possível retenção dos COVs na água, mostra o potencial dos estudos com biofumigação para o controle de fitonematoides no campo.

A toxicidade dos COVs de inflorescência de brócolis diluídos em água pode explicar o efeito tóxico à distância dos COVs aos fitonematoides postulado por Wheatley (2002), em que a água contida nos poros do solo formaria uma solução com os COVs emitidos por extratos de plantas, culturas fungicas, bacteriana, etc. Os nematoides presentes nesta água com COVs diluídos seriam imobilizados ou mortos.

Os COVs emitidos pelas sementes de girassol que sempre demonstraram alta toxicidade a J₂ de *M. incognita* tiveram retenção nula em água. Isso pode ser indicar a água agindo como uma substancia retentora ou não dos voláteis tóxicos a nematoides, podendo ser usada para verificação das possíveis moléculas tóxicas. Desse modo, moléculas retidas tanto na água tóxica quanto na emissão dos macerados tóxicos provavelmente seriam as responsáveis pelas atividade contra o nematoide, enquanto na água exposta que não se tornou tóxica excluiria as moléculas presentes nela e nos macerados tóxicos como sendo as responsáveis pela atividade contra o nematoide.

A presença de compostos sulfurosos em macerado de inflorescência de brócolis e a ausência na água exposta aos COVs de macerados de sementes de girassol, podem talvez explicar a toxicidade da água exposta ao brócolis e a não toxicidade da água exposta a sementes de girassol (Figura 5). O disulfeto de dimetila (DMDS) foi identificado na água tóxica e em ambos os macerados de

inflorescência de brócolis. O DMDS é uma molécula utilizada no controle de fitonematoides (ZASADA et al., 2010). No entanto, sulfurados tiocianato de metila e tiosulfeto de dimetila, também encontrados na água tóxica, devem ser verificados quanto a atividade contra nematoides. Alcoóis voláteis encontrados tanto na água exposta aos COVs de brócolis e girassol já foram identificados na emissão por fungos (FIALHO et al. 2010) ou plantas (BARROS et al., 2014a) tóxicos a fitopatogenos. Muitas moléculas identificadas na emissão dos macerados tóxicos de girassol não foram encontradas na água exposta sem efeito contra o nematoide e podem, portanto, serem as responsáveis pela toxicidade a *M. incognita* como os terpenos sabineno, eucaliptol, limoneno e α -thujeno já identificados na em plantas responsáveis por atividades tóxicas a fitonematoides (BARROS et al., 2014a; GONÇALVES et al., 2016).

Os macerados de inflorescência de brócolis e de sementes de girassol mostraram emissão de voláteis com atividades contra nematoides *in vitro* e em casa de vegetação, mas as moléculas de inflorescência de brócolis que tornam a água exposta tóxica, precisam ser estudadas individualmente para melhor entender seus efeitos e utilização da água como ferramenta na separação de voláteis tóxicos.

5 CONCLUSÕES

Os COVs emitidos pela semente de girassol e pela inflorescência de brócolis são tóxicos a J₂ de *M. incognita* em curtos períodos de tempos com maior redução nos COVs emitidos por girassol. A mortalidade dos J₂ de *M. incognita* aumentou com o tempo de exposição aos COVs em ambas as espécies vegetais e a infectividade e reprodução diminuíram com os J₂ expostos aos COVs de girassol. O aumento da concentração do material vegetal no solo aumentou os efeitos tóxicos na infectividade, reprodução e na toxicidade dos COVs emitidos pelas plantas. A água exposta aos COVs de brócolis tornou-se

tóxica aos J₂ em poucas horas. Foram identificados COVs em 6 e 5 grupos químicos emitidos por sementes de girassol e inflorescência de brócolis, respectivamente e 8 moléculas na água tóxica exposta a inflorescência de brócolis.

REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

ABAD, P. et al. Genome sequence of the metazoan plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. **Nature biotechnology**, v. 26, n. 8, p. 909-915, 2008

ADAMS, R.P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry**, fourth ed. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, Illinois USA. 2007. 840p.

AKHTAR, M.; MAHMOOD, I. Control of plant-parasitic nematodes with organic and inorganic amendments in agricultural soil. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 4, n. 3, p. 243-247, Nov. 1996.

AL-REHIAYANI, S. et al. Investigation-Research: Effects of *Pratylenchus neglectus*, *Bacillus megaterium*, and Oil Radish or Rapeseed Green Manure on Reproductive Potential of *Meloidogyne chitwoodi* on Potato. **Nematropica**, v. 29, n. 1, p. 37-49, 1999.

ARTHUR, C.L.; PAWLISZYN, J. Solid-phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. **Analytical Chemistry**, USA. v. 62, p.2145–2148, 1990.

BAILLIE A. C.; WRIGHT K. Biochemical pharmacology. In **Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology** Kerkut G. A.ç Gilbert L. I (Ed), Pergamon Press, Oxford. 1985, v 2, p. 323-356.

BANSAL, R. K.; BAJAJ, A. Effect of volatile fatty acids on embryogenesis and hatching of *Meloidogyne incognita* eggs. **Nematologia Mediterranea**, Florida, v. 31, n. 2, 2003

BARROS, A. F., et al. Nematicidal activity of volatile organic compounds emitted by *Brassica juncea*, *Azadirachta indica*, *Canavalia ensiformis*, *Mucuna pruriens* and *Cajanus cajan* against *Meloidogyne incognita*. **Applied Soil Ecology**, v.80, p. 34-43. 2014a.

BARROS, A. F. et al. Tempo de exposição de juvenis de segundo estágio a voláteis emitidos por macerados de nim e de mostarda e biofumigação contra *Meloidogyne incognita*. **Nematropica** v. 44 p. 190-199. 2014b.

BONETI, J.I.S.; FERRAZ, S. Modificação do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de raízes de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira** 6:553, 1981.

CABONI, P., NTALLI, N. G., AISSANI, N., CAVOSKI, I., AND ANGIONI, A. Nematicidal activity of (E, E)-2,4-decadienal and (E)-2-decenal from *Ailanthus altissima* against *Meloidogyne javanica*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** v. 60, p. 1146–1151, 2012.

CARNEIRO, R. M. D. G.; RANDIG, O.; ALMEIDA, M. R. A.; GONÇALVES, W. Identificação e Caracterização de *Meloidogyne* spp. em cafeeiro nos Estados de São Paulo e Minas Gerais através do fenótipos das esterases e Scar-PCR-Multiplex. **Nematologia Brasileira**, vol. 29, n. 2, p. 233-241, 2005.

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

DICKE, M; JOOP J.A.L. Multitrophic effects of herbivore- induced plant volatiles in an evolutionary context. **Entomologia experimentalis et applicata**. v 97, n. 3, p. 237-249, 2000.

DUDAREVA, N.; NEGRE, F.; NAGEGOWDA, D.A.; ORLOVA, I. Plant volatiles: recent advances and future perspectives. **Critical Reviews in Plant Science**, Philadelphia, v.25, p.417-440, 2006.

DUDAREVA, N.; PICHERSKY, E.; Gershenzon J. Biochemistry of Plant Volatile. **Plant Physiology**. v. 135, p. 1893–1902, 2004.

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

FIALHO, M.B.; BESSI, R.; INOMOTO, M.M.; PASCHOLATI, S.F. Nematicidal effect of volatile organic compounds (VOCs) on the plant-parasitic nematode *Meloidogyne javanica*. **Summa Phytopathologica**, v.38, n.2, p.152-154, 2012.

FREIRE, E. S., CAMPOS, V. P., PINHO, R. S. C., OLIVEIRA, D. F., FARIA, M. R., POHLIT, A M., NOBERTO, N. P., REZENDE, E. L., PFENNING, L.

H., AND SILVA, J. R. C. Volatile Substances Produced by *Fusarium oxysporum* from Coffee Rhizosphere and Other Microbes affect *Meloidogyne incognita* and *Arthrobotrys conoides*. **Journal of nematology** v. 44, p. 321–328. 2012.

FREIRE, E. S.; CAMPOS, V. P.; DUTRA, M. R.; ROCHA, F. S.; SILVA, J. R. C.; POZZA, E. A. Infectividade de juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne incognita* em tomateiro após privação alimentar em solo e água em diferentes condições. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 33, n. 3, p. 270-274, July 2007.

GIUDICI, A. M.; REGENTE, M. C.; DE LA CANAL, L. A potent antifungal protein from *Helianthus annuus* flowers is a trypsin inhibitor. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 38, n. 11, p 881-888, 2000.

GONÇALVES, F.J.T., et al. Atividade antagonista do óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae) sobre *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n. 1, 149-156, 2016.

GRIMME, E.; et al. Comparison of *Muscodor albus* Volatiles with a Biorational Mixture for Control of Seedling Diseases of Sugar Beet and Root-Knot Nematode on Tomato. **Plant Disease**, v. 91 n. 2, p.220-225, 2007.

GU, Y. Q. et al. Evaluation and identification of potential organic nematicidal volatiles from soil bacteria. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 39, n. 10, p. 2567-2575, Oct. 2007.

HENDERSON, D. R. et al. Mustard biofumigation disrupts biological control by *Steinernema* spp. nematodes in the soil. **Biological Control** 48 (3):316-322. Mar. 2009.

HUANG, Y., XU, C., MA, L., ZHANG, K., DUAN, C., AND MO, M. Characterisation of volatiles produced from *Bacillus megaterium* YFM3.25 and their nematicidal activity against *Meloidogyne incognita*. **European Journal of Plant Pathology** v. 126, p. 417–422. 2010.

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.

ISODOROV, V.; JDANOVA, M. Volatile organic compounds from leaves litter. **Chemosphere**, Davis, v.48 n. 9, p.975-979, 2002.

JANSEN, R. M. C. et al. Detection of diseased plants by analysis of volatile organic compound emission. **The Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 49, p. 157-174, 2011.

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

KUPIDLOWSKA, E. et al. Impact of sunflower (*Helianthus annuus* L.) extracts upon reserve mobilization and energy metabolism in germinating mustard (*Sinapis alba* L.) seeds. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 32, n. 12, p. 2569-2583, Dec. 2006.

LI, M., et al. A strategy to discover potential nematicidal fumigants based on toxic volatiles from nematicidal bacteria. **African Journal of Microbiology Research**. v. 6, p. 6106–6113, 2012.

LORD, J. S. et al. Biofumigation for control of pale potato cyst nematodes: activity of brassica leaf extracts and green manures on *Globodera pallida* in vitro and in soil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 59, p. 7882-7890, 2011.

NEVES, W. S. et al Biofumigação do solo com espécies de brássicas para o controle de *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira** v. 31, p. 195-201. 2007.

NEVES, W.S., et al.Biofumigação do solo com espécies de brássicas para o controle de *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**. v. 31, n. 3, p.195-201. 2007.

NIST, 2013. NIST Chemistry Webook-National Institute of Standards and Technology. <http://webbook.nist.gov/chemistry/>. Accessed 30 June 2016

OKA, Y. Mechanisms of nematode suppression by organic amendments. **A. Review Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 44, n. 2, p. 101-115, Feb. 2009.

OKA, Y. Nematicidal activity of essential oils and their components against the root-knot nematode. **Phytopathology**, v. 90 n. 7, p. 710 – 715, Jul. 2000.

PLOEG, A.T. Effects of amending soil with *Tagetes patula* cv. Single Gold on *Meloidogyne incognita* infestation of tomato. **Nematology** v. 2, p. 489–493. 2000.

ROHLOFF, J.; BONES, A.M. Volatile profiling of *Arabidopsis thaliana*—putative olfactory compounds in plant communication. **Phytochemistry** v. 66, p. 1941–1955, 2005.

ROUBTSOVA, T. Effect of broccoli (*Brassica oleracea*) tissue, incorporated at different depths in a soil column, on *Meloidogyne incognita*. **Journal of Nematology**. v. 39, p. 111-117. 2007.

POTGIETER, C.; DE BEER, M.; CLAASSENS S. The effect of canola (*Brassica napus*) as a biofumigant on soil microbial communities and plant vitality: a pot study **South African Journal of Plant and Soil**. v. 30, n. 4, p. 191-201, 2013.

TIHOHOD, D. **Nematologia Agrícola Aplicada**. Jaboticabal: FUNEP, 372 p. 1993.

TRUDGILL, D. L., AND BLOK, V. C. Apomictic, polyphagous root-knot nematodes: exceptionally successful and damaging biotrophic root pathogens. **Annual review of phytopathology**. v. 39, p. 53–77, 2001.

VERVOORT, M. T. et al. Release of isothiocyanates does not explain the effects of biofumigation with Indian mustard cultivars on nematode assemblages. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 68, p. 200-207, 2014.

WANG, D.; ROSEN, C.; KINKEL L.; CAO, A.; THARAYIL, N.; GERIK, J. Production of methyl sulfide and dimethyl disulfide from soil-incorporated plant materials and implications for controlling soilborne pathogens. **Plant and Soil**. v. 324:185-197. 2009.

WHEATHEY, R. E. The consequences of volatile organic compound mediate bacterial and fungal interactions. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 81, n. 1/4, p. 357-364, Aug. 2002.

ZASADA, I.A., Managing nematodes without methyl bromide. **Annual review of phytopathology**, v. 48, p. 311-328, 2010

ZOU, C. S., MO, M. H., GU, Y. Q., ZHOU, J. P., AND ZHANG, K. Q. Possible contributions of volatile-producing bacteria to soil fungistasis. **Soil Biology and Biochemistry**. v. 39, p. 2371–2379. 2007.

ARTIGO 2: ETHANOL IN AQUEOUS SOLUTION AND ITS VAPORS AS AN ALTERNATIVE TO CONTROL *Meloidogyne incognita* IN SUBSTRATE OF LETTUCE SEEDLINGS

Julio CP Silva, Vicente P Campos, Eduardo S Freire, Willian C Terra, Liliana E Lopez.

(Submetido ao periódico Journal of Agricultural and Food Chemistry)

ABSTRACT

Ethanol (EtOH) is not harmful to humans, but can damages plant pathogens. Thus, this study evaluated activity and efficacy of EtOH in controlling *Meloidogyne incognita in vitro* and in lettuce plants at greenhouse conditions. EtOH aqueous solutions 5 vol% to 70 vol% and its vapors caused acute nematicidal effect *in vitro* in second-stage juveniles (J₂) of *M. incognita*, expressed as mortality. EtOH aqueous solutions and vapors also reduced J₂ hatching in nematode eggs. Controlling *M. incognita* in lettuce was due to high reduction of galls and eggs in the root system, when EtOH was applied on infested soil at concentrations of 40 vol% and 70 vol%, and at dosages of 40 ml and 80 ml of both concentrations. Water exposed to EtOH vapors for short periods such as 1 hour became toxic, and in 12-hour exposure caused 100 % J₂ mortality. Plastic cover did not increase the efficiency of EtOH aqueous solution in controlling *M. incognita* in lettuce plants. EtOH nematicidal effect to *M. incognita* opens prospects for its use in controlling plant nematodes, especially in greenhouse and organic agriculture with leaf vegetables.

Keywords: Nematodes, soil pathogens, root-knot, alternative control, alcohol, vegetables.

1 INTRODUCTION

Plant parasitic nematodes cause losses in agriculture ranging from the unnoticeable to the death of a large numbers of plants, also making crop areas unviable. The root-knot nematode (*Meloidogyne spp.*) is responsible for seventy percent of damage by plant parasitic nematodes.¹ *Meloidogyne incognita* is the most worldwide spread specie from genus *Meloidogyne*, found in almost all countries. It is probably the nematode that causes more damages to crops², and it is able to parasitize on more than 2000 plant species³, which includes the majority of agricultural and ornamental crops.

Lettuce (*Lactuca sativa*) is the most cultivated and consumed leaf vegetable in Brazil. Its cultivation has been expanded inside the country with the expansion of fast-food eateries and a growing consumer demand, especially in the summer when the preference for green salads increases⁴. *M. incognita* and *M. javanica* are among the main species of nematodes found in lettuce growing areas⁵. Transplantation of sseedlings from the greenhouse to the field is the main system used in lettuce production.

Various methods are recommended in controlling root-knot nematodes.⁶⁻
⁸ However, producers have preferred chemical control and resistant cultivars. When available to the producer, resistant cultivars not always enjoy consumer acceptance. Crinkly lettuce has *Meloidogyne*-resistant cultivars, but fast-food chains prefer plain leaf lettuce, which only recently has had resistance genes incorporated in commercial cultivars.^{9,10} In addition, farmers should not use the chemical method to control nematodes in leafy vegetables, as the widely sold chemicals are highly toxic to animals, including humans.

Many nematicidal fumigants have been forbidden to use in past few years as they are harmful to human health, leaving a lack of molecules

controlling soil borne pathogens and for substrate sterilization in greenhouses. This increase the interest of new studies with less toxic molecules and alternative methods, mainly for substrates and leaf vegetables in organic agriculture.⁷ Changes in the environment where nematodes live and the use of organic material with nematicidal activities have helped reduce pathogen population, especially in lettuce.^{11,12} Hatching induction by irrigation in lettuce growing fields submitted to fallow in the dry and hot periods reduced the population of second stage juveniles (J₂) of *M. incognita* more than 65 % at 14 days after treatment with irrigation and soil tillage, and increased productivity by 2,15 times compared to no-tillage areas.¹³

An alternative, not yet studied, in controlling plant nematodes is the application of ethanol (EtOH), CH₃CH₂OH, which is non-harmful to animals and especially to humans. As EtOH evaporates quickly after application, it has been used as disinfectant or biocide in a concentration of 70 vol% (g.L⁻¹) in aqueous solutions.¹⁴ Furthermore, EtOH has been successfully applied for post-harvest fungi reduction in fruit treatment.¹⁵

As EtOH is soluble in water and has low residual power in the soil, it can be used in irrigation water. An exploratory experiment reported that applying EtOH in the soil reduced the population of fungi, bacteria, and nematodes.¹⁶ Volatility is another aspect involving the use of EtOH in agriculture. Alcohol in volatile phase showed fungitoxic effects in post-harvest.¹⁷⁻¹⁹ Although EtOH mixed with other volatile organic compounds have shown nematicidal activities to *Meloidogyne sp.*²⁰, the isolated toxicity of EtOH vapors has not yet been studied in plant parasitic nematodes.

EtOH interferes with the nervous system of nematode *Caenorhabditis elegans*, but the molecular action sites are still unknown.²¹ Thus, the nematostatic or nematicidal effect of EtOH in vapor or diluted in water in

controlling plant parasitic nematodes is almost unknown. This study evaluates: the nematicidal activities of different concentrations of EtOH vapor or in aqueous solution in J₂ and eggs of *M. incognita*; the effect of aqueous solutions at different concentrations of EtOH and different doses of solution at 40 vol% concentration to control *M. incognita* in lettuce in infested soil; the effect of water exposed to EtOH vapors to J₂; the use of plastic cover on improving control efficiency in lettuce planted in soil infested with *M. incognita*.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Obtaining eggs and second stage juveniles (J₂) of *Meloidogyne incognita*

The J₂ were obtained from pure populations of *M. incognita* multiplied on tomato plants grown in greenhouse. Egg suspension was obtained following the Hussey and Barker technique²² modified by Boneti and Ferraz.²³ Tomato roots were washed thoroughly in tap water to remove adhering soil particles, chopped into pieces at approximately 1 to 2 cm, and ground in a blender with 0.5 g.L⁻¹ bleach (NaOCl) solution for approximately 30 seconds. The suspension of eggs and roots was poured onto a 0,074 sieve (200 mesh) coupled to a 0,025 mm sieve (500 mesh), and the eggs were retained in the latter. Eggs were counted in a Peters' chamber calibrated using light microscope, then incubated in a hatching chamber at 25°C. Only J₂ that hatched at 48 and 72 hours after the chamber assembly were used in the experiments.

2.2 Ethanol vapors and aqueous solution in mobility and mortality of second-stage juveniles of *Meloidogyne incognita*

J₂ of *M. incognita* were immersed in aqueous solutions of EtOH and exposed to the vapors, using the technique of bi-compartmented plates.²⁴ EtOH aqueous solutions were prepared at concentrations 5 vol%, 10 vol%, 20 vol%, 40 vol%, and 70 vol% [volume percent = ml of ethanol/ 100 ml of water

(alcohol by volume)] and placed in one compartment of the bipartite polystyrene plate. An aqueous suspension containing 100 J₂ in 1 ml was mixed in 2 ml of each EtOH solution, thus J₂ were put in direct contact with EtOH. Due to application of 2 ml solution in 1 ml water, the final concentration of EtOH in the solutions was reduced by 1,5 times. Only a suspension containing 100 J₂ was placed in the adjoining compartment of the same plate to check the EtOH vapors effects. As control, the suspension of 100 J₂ was put in pure water instead EtOH solution (concentration of 0 vol%). The plates were hermetically sealed with plastic film and set in a growth chamber at 25°C for 24 hours. Then, the Petri dishes were opened and the J₂ transferred to ELISA plate for counting. Mobility and immobility percentages of J₂ were evaluated using a microscope with inverted lenses. Then, the J₂ were transferred to pure water and left in growth chamber without airtight seal at 25°C for 24 hours. The J₂ that remained still immobile were considered dead.

2.3 Ethanol vapors and aqueous solution in hatching of second stage juveniles of *Meloidogyne incognita* eggs

Alcoholic solutions were prepared in the same concentrations as in the previous assay, also using bi-compartmented plates.²⁴ An aqueous suspension containing 400 eggs of *M. incognita* in 1 ml was mixed with 2 ml alcoholic solution of each concentration, thus J₂ were put in direct contact with EtOH. Due to the application of 2 ml solution in 1 ml of aqueous suspension, the final concentration of EtOH in the solutions was reduced by 1,5 times. Only an 1 ml aqueous suspension of 400 eggs was placed in the adjoining compartment of the same plate. Thus, only the vapors emitted by the alcoholic solution were put in contact with the eggs in the adjoining compartment. As control, the suspension was set in pure water instead EtOH (concentration of 0 vol%). The plates were hermetically sealed with plastic film and set in a growth chamber at 28°C for 3

days. Thereafter, the plates were opened and the hatched J₂ and eggs were put in pure water in a chamber containing a 500-mesh sieve. Every 24 hours until finish 10 days after put the eggs, water was changed and the number of hatched J₂ was estimated. Finally, all the values were summed to find the total number of hatched J₂ after 10 days.

2.4 Ethanol in aqueous solution at different concentrations in reducing inoculum of *Meloidogyne incognita* in lettuce at greenhouse

The test was conducted in pots in a greenhouse using soil previously infested with *M. incognita* as inoculum source obtained as follows. Two-liter pots were filled with substrate formed by mixing autoclaved clay soil and sand in the ratio 2:1. Humidity was adjusted to 60 percent of field capacity. Next, one seedling of plain leaf lettuce cultivar Regina was transplanted to each pot 20 days after emergence. Five days after transplanting, it was inoculated with 10.000 eggs of *M. incognita* in aqueous suspension of 10 ml per pot. Four holes 3 cm deep were made in the substrate around the seedlings, and all the inoculum suspension (10.000 eggs) was distributed equally. The holes were filled with the same substrate. Forty pots were prepared for inoculum (infested substrate). The inoculated seedlings were set in the greenhouse and received irrigation and fertilization according to technical recommendations. Sixty days after inoculation, shoots were cut and discarded. The entire substrate and root system were mixed and sieved, discarding the roots. We collected the sieved substrate and removed a portion to refill the pots. Humidity was adjusted to 60 percent of field capacity again.

Twenty ml (1 percent of pot volume) of aqueous EtOH were poured on the surface of each infested pot, at concentrations 5 vol%, 10 vol%, 20 vol%, 40 vol%, and 70 vol% [volume percent = ml of ethanol/ 100 ml of water (alcohol by volume)]. As control, 20 ml of pure water (concentration 0 vol%) were

poured. Three days after application of the alcoholic solution, one seedling of plain leaf lettuce cultivar Regina was transplanted in each pot. The 3-day interval was determined previously as the period sufficient to avoid significant toxic effects of alcohol on lettuce (data not shown). Then, the pots were set in the greenhouse and received irrigation and fertilization according to the recommendations. Forty-five days after transplanting, shoots were cut and the entire content of pots was put in buckets with water. Then, roots were separated carefully from soil, washed, and was evaluated the number of galls per gram of root system. Next, roots were cut for extracting eggs.^{22,23} Finally, the number of eggs per gram of root system was assessed with a light microscope.

2.5 Water exposure to ethanol vapors and its toxicity to second stage juveniles of *Meloidogyne incognita*

Toxicity of water exposed to vapor of aqueous alcohol solution at 40 vol% concentration to J₂ of *M. incognita* was assessed using the bi-compartmented plate technique.²⁴ Two ml of EtOH aqueous solution at 40 vol% were placed in one compartment and 2 ml of sterile distilled water were placed in the contiguous compartment. Plates were hermetically sealed with plastic film and set in incubator at 25°C for periods of 30 min, 1h, 2h, 3h, 6h, 12h, and 24h.

After each period of exposure to EtOH 40 vol% vapors, water was collected and poured in 2 ml microtubes. Then, a suspension with 100 J₂ in 0,5 ml of pure water was pipetted together with the exposed water. Microtubes were hermetically sealed with screw lids and set in growth chamber at 25°C for 24 hours. After this period, the microtubes were opened and it was counted the percentage of mobile, immobile and dead J₂.

2.6 Doses of aqueous ethanol solution in reducing *Meloidogyne incognita* inoculum in lettuce at greenhouse

The trial was conducted in pots in the greenhouse. Substrate previously infested by *M. incognita* was used as inoculum and placed it in 2 dm³ (liter) pots. EtOH solution was prepared in sterile distilled water at 40 vol% concentration, which was the most economical concentration thinking on effectiveness in reducing infectivity of *M. incognita*, previously found in another test. Each pot received doses of 5 ml, 10 ml, 20 ml, 40 ml, or 80 ml, which formed the treatments of 40 vol% EtOH. Each dose was put on the surface of infested substrate in the pots. As control, 20 ml of pure water (0 ml dose) were poured on the substrate surface.

Three days after application of 40 vol% EtOH solution, one seedling of lettuce cultivar Regina with 20 days after germination age were transplanted in each pot. Pots were set in the greenhouse and received irrigation and fertilization according to technical recommendations. Forty-five days after transplanting, shoots were cut and the entire content of pots was placed in buckets with water. Then, roots were carefully separated from soil and washed, and the number of galls per gram was evaluated for each root system. Next, roots were cut for extracting eggs^{22,23} and the number of eggs per gram of root system was evaluated with a microscope.

2.7 Plastic cover of substrates treated with alcohol 40 vol% and the increment in reduction of *Meloidogyne incognita* inoculum

The trial was set up in pots in a greenhouse to evaluate the need for plastic cover on the infested substrate for increasing efficiency of EtOH against *M. incognita*. A substrate previously infested with *M. incognita* was used as inoculum, and infested soil was put in 2 dm³ pots. The dose was 40 ml EtOH

solution in water at 40 vol%, determined as the most economic and effective concentration in earlier experiment. As control, 40 ml of pure water were poured in each pot. After application of alcoholic solution or water, the pots were immediately sealed with plastic film or remained open, then were set in a greenhouse. Three days later, the plastic cover was removed. One seedling of lettuce cultivar Regina was transplanted in both covered and uncovered pots. Pots were set in the greenhouse receiving irrigation and fertilization according to technical recommendations. Forty-five days after transplanting, shoots were cut and the entire content of the pot was put in buckets with water. Roots were carefully separated from soil and washed in water. The number of galls per gram was evaluated in each root system, and roots were cut for extracting eggs and the number of eggs per gram of root system was evaluated with light microscope.

2.8 Statistical analysis

All trials had six repetitions of treatments. In the experiments on bi-compartmented plates was used a completely randomized design, and to the greenhouse experiments a randomized block design. Two-way analysis of variance (ANOVA) was performed in all bi-compartmented plates for assessing EtOH solution or EtOH vapors, with a 2 Contacts x 6 Concentrations factorial scheme. One-way analysis (ANOVA) was performed in the green-house experiments and water exposed to EtOH vapors experiment. Data were previously submitted to Shapiro-Wilk test of normality and Bartlett's test of uniformity. The average of each treatment were grouped by Tukey test at 5 % significance level. Quantitative variables were subjected to regression analysis and the best models were fit. The entire assays were repeated twice.

3 RESULTS

3.1 Ethanol vapors and aqueous solution in mobility and mortality of second stage juveniles of *Meloidogyne incognita*

EtOH diluted in water at 5 vol% (3,3 vol% after the suspension application) and its vapors caused 95 % mortality in J₂ of *M. incognita*. From this concentration mortality was 100 %, with no significant interaction (P = 0,08) between increasing the concentration and contact with aqueous solution directly or through EtOH vapors (Figure 1). Immobility was 100 % at all concentrations except the control at 0 vol%.

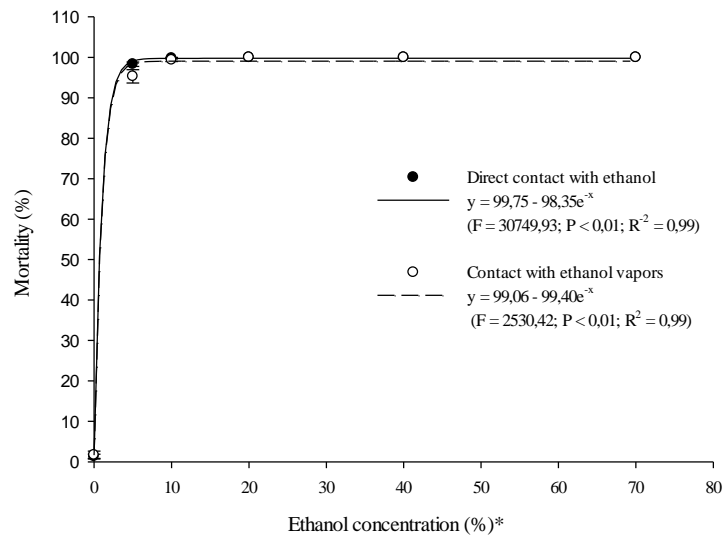


Figure 1: Mortality of *Meloidogyne incognita* second stage juveniles in direct contact with ethanol solution or with ethanol vapors at different volume by volume concentrations. The bars indicate the mean standard errors. * Concentration of ethanol in aqueous solution before mixture with the nematode aqueous suspension (1,5 time higher).

3.2 Ethanol vapors and aqueous solution in hatching of second stage juveniles of *Meloidogyne incognita* eggs

There was a significant interaction between increased concentration and contact of eggs with both direct contact with EtOH solution and its vapors ($P < 0,01$). The number of J_2 hatched after 10 days significantly decreased with increasing concentration of alcohol in eggs in direct contact with aqueous solution and those exposed to EtOH vapors. At 10 vol% and 20 vol% concentrations, eggs in direct contact with alcoholic solution had fewer hatched J_2 than eggs exposed to EtOH vapors. From 40 vol%, the effects on hatching were similar on eggs in direct contact with EtOH solution and those exposed to vapors. In the range between 40 and 70 vol%, reduction in hatching of J_2 was approximately 100 % (Figure 2).

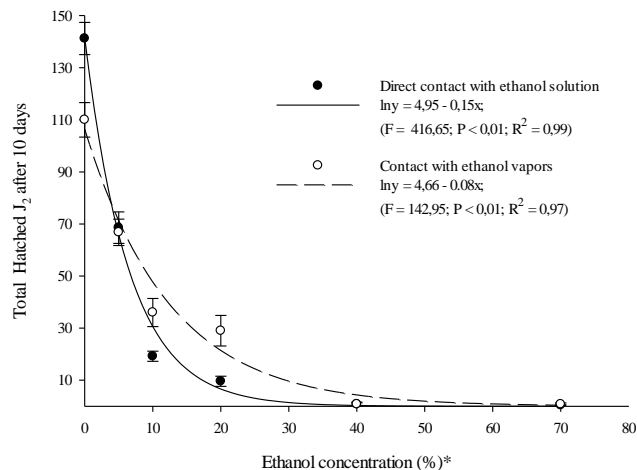


Figure 2: Number of *Meloidogyne incognita* second stage juveniles (J_2) hatched after ten days of direct contact with ethanol solution or with ethanol vapors. The bars indicate the mean standard errors. * Concentration of ethanol in aqueous solution before mixture with the nematode aqueous suspension (1,5 time higher).

3.3 Ethanol in aqueous solution at different concentrations reducing inoculum of *Meloidogyne incognita* in greenhouse.

The number of galls and eggs.g⁻¹ in tomato root in soil infested by *M. incognita* was significantly reduced ($P < 0,01$) with increasing EtOH concentration in aqueous solution. The galls number was reduced by 76 % in relation to the control when 40 vol% EtOH solution was used. This reduction did not differ from the treatment with 70 vol% EtOH solution (Figure 3a). Similarly, the number of eggs was reduced by 87 % compared to control when 40 vol% concentration was used. This reduction did not differ from the treatment with 70 vol% (Figure 3b).

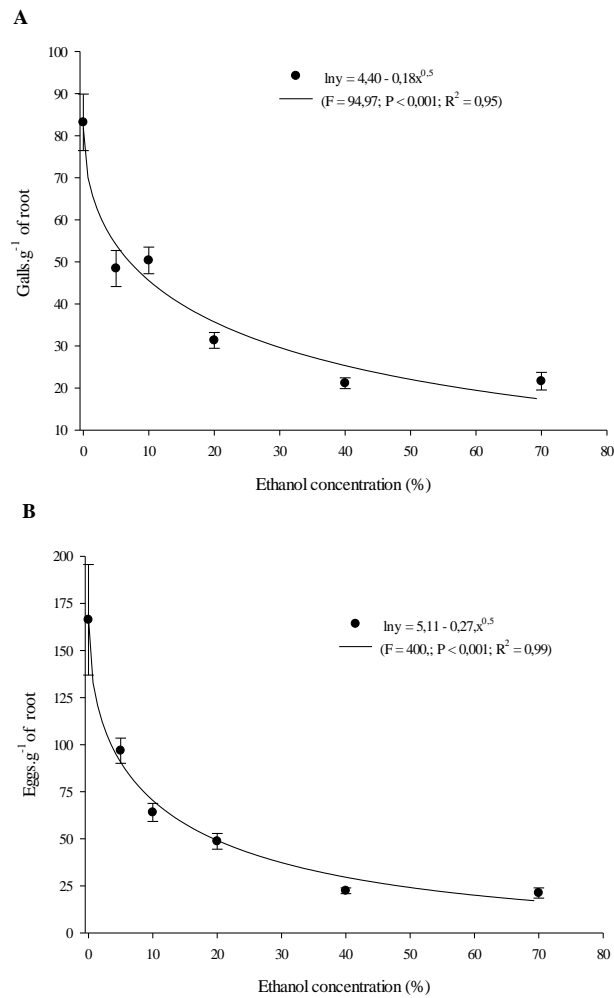


Figure 3: Concentration increases of ethanol solution applied on soil infested with *Meloidogyne incognita*. A: Number of galls.g⁻¹ of root; B: Number of eggs.g⁻¹ of root. The bars indicate the mean standard errors.

3.4 Water exposure to ethanol vapors in different periods and its toxicity to second stage juveniles of *Meloidogyne incognita*.

Immobility and mortality of J₂, mixed with water exposed to EtOH vapors, increased significantly ($P < 0,01$) with increasing time of exposure. Short periods were enough to cause high immobility of J₂. One-hour exposure to vapors of 40 vol% alcoholic solution caused EtOH retention in water, which could significantly increase immobility and death of J₂. Immobility was higher than 97 %, reaching 100 % from 2 hours exposure. However, mortality only reached 98 % with 6 hours of water exposure to EtOH vapors, reaching 100 % in 12 hours exposure (Figure 4).

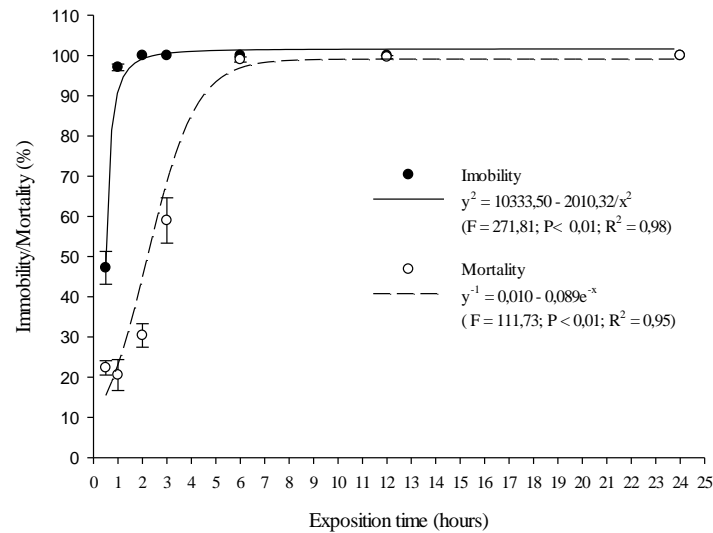


Figure 4: Immobility and mortality of *Meloidogyne incognita* second stage juveniles in water exposed to ethanol vapors for different exposition time. The bars indicate the mean standard errors.

3.5 Doses of aqueous ethanol 40 vol% solution for reducing inoculum of *Meloidogyne incognita* in greenhouse.

The number of galls and eggs in soil infested by *M. incognita* was significantly reduced ($P < 0,01$) with increasing doses of aqueous solution of 40 vol% EtOH. Reduction of galls was 89 % in relation to the control when 40 ml dose was used, and did not differ from 80 ml dose (Figure 5a). Similarly, reduction in number of eggs was 94 % in relation to the control when 40 ml dose was used, not differing from 80 ml dose (Figure 5b).

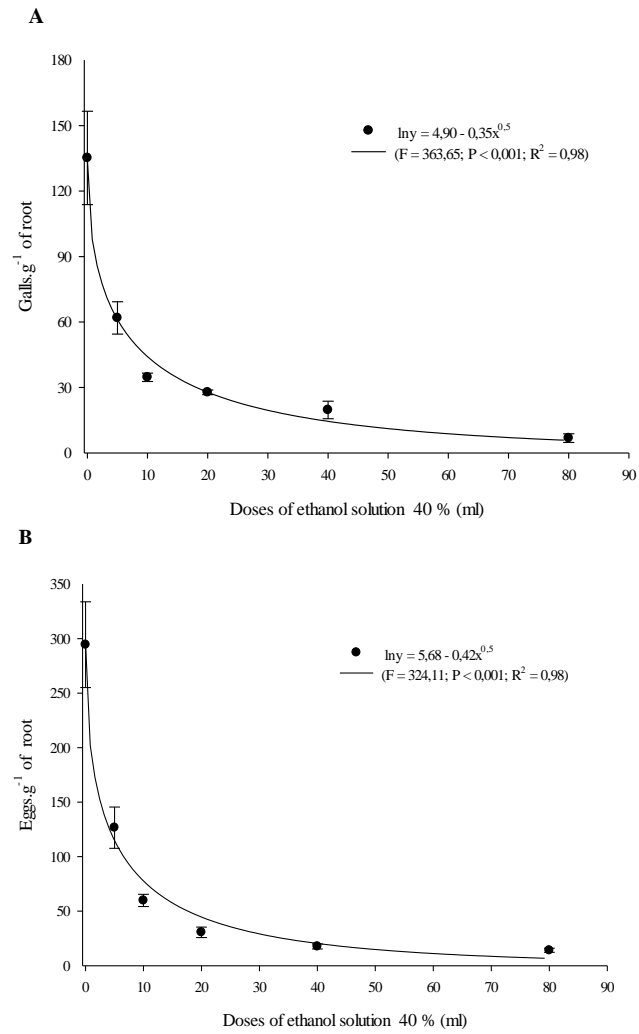


Figure 5: Doses increases of aqueous solution of 40 vol% ethanol applied on soil infested with *Meloidogyne incognita*. A: Number of galls.g⁻¹ of root; B: Number of eggs.g⁻¹ of root. The bars indicate the mean standard errors.

3.6 Plastic cover on substrates treated with 40 vol% alcohol and increase in reduction of *M. incognita* inoculum

No significant difference ($P = 0,63$) occurred among treatments with or without plastic cover when we applied alcohol to substrate infested with *M. incognita* and assessed the numbers of galls and eggs per root system. Then plastic cover did not increase the effectiveness of EtOH application compared with uncovered treatments. However, EtOH significantly decreased ($P < 0,01$) number of galls and eggs compared with the control treated only with water. The number of galls was reduced by 96 % and number of eggs was reduced by 82 % in relation to the control with water only (Figure 6).

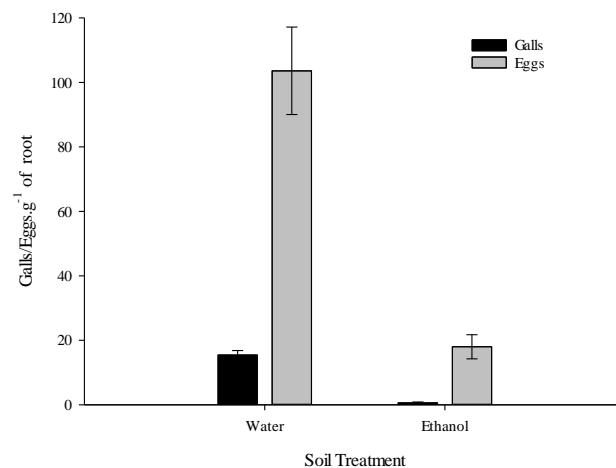


Figure 6: Number of galls and eggs per gram of roots pots with substrate infested with *Meloidogyne incognita* after application of 40 ml ethanol solution (40 vol%) or water (control). Means followed by a common letter do not differ significantly at Tukey test ($P < 0,05$). The bars indicate the mean standard errors.

4 DISCUSSION

The immobility and mortality of *M. incognita* J₂ caused by even low concentrations of alcohol diluted in water was also found in assays with the nematode *Caenorhabditis elegans*, the model nematode specie for genetic studies.²⁵ The toxic effect can be due to high permeability of *M. incognita* cuticle as well as deformation, immobility and reduced reproduction, as already described for *C. elegans* in EtOH solutions at 0,6 and 2,4 vol%.²⁶⁻²⁸ These concentrations are too lower than the ones used in this present study with *M. incognita*. EtOH solutions in concentrations of 1 and 6 vol% reduced the fungal biomass of *Pyrenophora avenae* by 20 % and 95 % respectively.²⁹

Contact with EtOH vapors produced similar effects as the direct contact with EtOH diluted in water in J₂ of *M. incognita* in this study. In eggs of *C. elegans*, EtOH vapors decreased the viability of hatched juveniles.³⁰ Mixture of volatile molecules including EtOH caused mortality of J₂ of *M. javanica* by 30 % to 100 % according to the mixture concentration, without evaluation of the isolated effect of EtOH.²⁰ EtOH vapors completely inhibited growth of *Rhizopus stolonifer*, *Penicillium digitatum*, *Pectobacterium carotovora* and other fruit rot organisms.¹⁸ EtOH vapors also controlled fungal growth in post-harvest oranges.¹⁷

The effect of EtOH vapors or diluted in water reducing J₂ hatching demonstrates that this molecule passes through the protective lipid membrane of inner cells and embryos, causing death or severe damage to the membrane and leaving embryos unprotected. The toxic effect of EtOH on plant nematodes has not been intensively studied as to the site of action, although it has been found that its main mode of action in phytopathogenic fungi is causing damage to the cell membrane.³¹

EtOH is an excellent organic solvent fully miscible in water. Thus, it has been used in the preparation of plant extracts against nematodes with higher

extraction capacity than water.³²⁻³⁴ However, the exclusive toxic effect of EtOH on plant parasitic nematodes compared with plant aqueous extracts has not yet been estimated.

In addition, to demonstrate the toxic effects on plant parasitic nematodes and the concentration of EtOH in water which can significantly control nematodes, this study seeks the practical means for its use in both field and substrate disinfestation for transplanting and seeding. With the high nematicidal effects of 40 vol% EtOH solution, its economic use is promising in substrate disinfestation and perhaps in the field. However, studies with different EtOH concentrations and their efficiency in the field are still non-existent. Significant reduction in number of galls and eggs of *M. incognita* with application of low doses of 40 vol% EtOH in greenhouse brings expectations of a good cost/benefit in its practical use in substitution of fumigants to substrate sterilization. EtOH could also be applied in irrigation water, probably infiltrating deeper and more uniformly into the soil than other products commonly used for disinfestations.³⁵ Using doses of any concentration of EtOH in water in controlling plant nematodes has not yet been studied in field.

High mortality and immobility in J₂ caused by water exposed to EtOH vapors in short periods such as 1 hour indicates that EtOH is easily diluted and retained in the water exposed to it. This is because the miscibility of EtOH in water is 100 %. This is the first study showing the toxicity of water exposed to EtOH vapors in nematodes. However, it has been found that volatiles from other sources dissolve in water exposed to them, making this water toxic to plant parasitic nematodes.^{36,37} Retention of EtOH in water exposed to vapors in this study suggests the possibility of using irrigation after application of alcohol in the soil to dilute and retain longer the alcohol in the nematode's environment. Suppression of *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* and increase on

population of anaerobic bacteria in soil were found after application of EtOH solution followed by irrigation.³⁵

The plastic cover of 2 dm³ pots treated with 40 ml of EtOH in aqueous solution at 40 vol% concentration did not provide increased efficiency in controlling *M. incognita*, indicating that the direct effect of EtOH in aqueous solution is already high and fast, thus the retention of its vapors for long time is unnecessary. Effective reduction of fungi, bacteria, and nematodes in the soil has been shown when EtOH was applied under plastic cover.¹⁶ However, this effect was not compared with treatments with alcohol application without coverage.

Greater use of EtOH in the control of plant nematodes is encouraging, but it is necessary to intensify research on this alcohol, especially in the field. EtOH causes immobility, mortality, and reduced hatching of *M. incognita* J₂ even at low concentrations, both in direct contact with aqueous solutions and in exposure to its vapors. From few hours of exposure to EtOH vapors, the water causes 100 % of mortality on J₂. The best cost-benefit dose of aqueous EtOH solution at 40 vol% to reduce infectivity and reproduction of *M. incognita* was 40 ml in a 2 dm³ pot. It is unnecessary to use plastic cover on substrates treated with EtOH at 40 vol% concentration.

AKNOWLEDGEMENTS

We gratefully acknowledge the Brazilian financial support provided by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) (Project CEX-APQ-04331-10), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

REFERNCES

- (01) Sasser, J.N. and Freckman, D.W. A world perspective on nematology the role of the society, In *Vistas on nematology*; Veech J.A., Dickson D.W., Eds: Society of Nematologists: Maryland, **1987**; pp 7-14.
- (02) Trudgill, D.L. and Blok, V.C. Apomictic, polyphagous root-knot nematodes: exceptionally successful and damaging biotrophic root pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* **2001**, 39, 53-77.
- (03) Sasser, J.N. Root-knot nematodes *Meloidogyne*: a global menace to crop production [Includes activities and principal research findings of the International *Meloidogyne* Project (IMP)]. *Plant Dis.* **1980**, 64, 36-41.
- (04) Sala, F.C. and Costa, C.P. 'Gloriosa': cultivar de alface americana tropicalizada. *Hortic. Bras.* **2008**, 26, 409-410.
- (05) Rosa, J.M; Westerich, J.N.; Wilcken, S.R.S. *Meloidogyne javanica* reproduction on vegetable crops and plants used as green manure. *Tropical Plant Pathology.* **2013**, 38,133-141.
- (06) Collange, B.; Navarrete, M.; Peyre, G.; Mateille, T.; Tchamitchian, M. Root-knot nematode *Meloidogyne* management in vegetable crop production: The challenge of an agronomic system analysis. *Crop Protection.* **2011**, 30, 1251-1262.
- (07) Yates, S.R.; Ashworth, D.A.; Yates, M.D.; Luo, L.F. Active solarization as a nonchemical alternative to soil fumigation for controlling pests. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **2011**, **75**, 9–16.
- (08) Huang, X.; Zhang, K.; Yu, Z.; Li, G. Microbial Control of phytopathogenic Nematodes. in *Principles of Plant-Microbe Interactions*;

Lugtenberg, Ben. Eds: Springer International Publishing, Switzerland, **2015**, pp. 155-164.

(09) Ferreira, S.; Vieira, V.L.F.; Gomes, L.A.A.; Maluf, W.R.; De Carvalho Filho, J.L.S. Identificação de linhagens avançadas de alface quanto à resistência a *Meloidogyne javanica*. *Cienc. Agrotecnol.* **2011**, 35, 270-277.

(10) Gomes, L.A.; Carvalho Filho, J.L.; Westerich, J.; Maluf, W.; Campos, V.P.; Caracterização de famílias F4 de alface de folhas lisas quanto à homozigose para resistência à *Meloidogyne incognita*. *Current Agricultural Science and Technology.* **2012**, 13, 331-336.

(11) Ribeiro, R.C.F.; Mizobutsi, E.M.; Silva, D.G.; Pereira, J.C.R.; Zambolim, L. Control of 13 *Meloidogyne javanica* on lettuce with organic amendments. *Fitopatol. Bras.* **1998**, 23, 42 – 44.

(12) Renčo, M. Organic amendments of soil as useful tools of plant parasitic nematodes control. *Helminthologia.* **2013**, 50, 3-14.

(13) Dutra, M.R.; Campos, V.P.; Toyota, M. Manejo do solo e da irrigação para o controle de *Meloidogyne javanica* em alface. *Soc. Bras. Nematol., Publ.* **2003**, **27**, 29-34.

(14) Mishra, P. Tolerance of fungi to ethanol, in: *Stress tolerance of Fungi*, vol. 10; Jennings, D.H. Eds: Marcel Dekker, New York, **1993** pp. 189–208.

(15) Romanazzi, G.; Lichter, A.; Gabler, F.M.; Smilanick, J.L. Recent advances on the use of natural and safe alternatives to conventional methods to control postharvest gray mold of table grapes. *Postharvest Biol. Technol.* **2012**, 63, 141-147.

- (16) Kobara, Y.; Uematsu, S.; Tanaka-Miwa, C.; Sato, R.; Sato, M. Possibility of the new soil fumigation technique with ethanol solution. in *Proceedings of 2007 Annual research conference on methyl bromide alternatives and emissions reduction* San Diego, USA, Oct 29 - Nov 1, **2007** p. 74
- (17) Yuen, C.M.C.; Paton, J.E.; Hanawati, R.; Shen, L.O. Effect of ethanol, acetaldehyde and ethyl formate on the growth of *Penicillium italicum* and *P. digitatum* on oranges. *Journal of Horticulture Science*. **1995**, 70, 81–84.
- (18) Utama, I.M.; Wills, R.B.; Ben-Yehoshua, S.; Kuek, C. In vitro efficacy of plant volatiles for inhibiting the growth of fruit and vegetable decay microorganisms. *J. Agric. Food Chem*. **2002**, 50, 6371-6377.
- (19) Lichter, A.; Zutkhy, Y.; Sonogo, L.; Dvir, O.; Kaplunov, T.; Sarig, P.; Ben-Arie, R.; Ethanol controls postharvest decay of table grapes. *Postharvest Biol. Technol*. **2002**, 24, 301-308.
- (20) Fialho, M.B.; Bessi, R.; Inomoto, M.M.; Pascholati, S.F. Nematicidal effect of volatile organic compounds (VOCs) on the plant-parasitic nematode *Meloidogyne javanica*. *Summa Phytopathol*. **2012**, 38,152-154.
- (21) Morgan, P.G. and Sedensky, M.M. Mutations affecting sensitivity to ethanol in the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Alcohol.: Clin. Exp. Res*. **1995**, 19, 1423-1429.
- (22) Hussey, R.S. and Barker, K.R. A comparison of methods for collecting inocula of *Meloidogyne spp.* including a new technique. *Plant Dis. Rep*. **1973**, 57,1025-1028.

- (23) Boneti, J.I.S. and Ferraz, S. Modificação do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de raízes de cafeeiro. *Fitopatol. Bras.* **1981**, 06, 553.
- (24) Fernando, W.D.; Ramarathnam, R.; Krishnamoorthy, A.S.; Savchuk, S.C. Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol. *Soil Biol. Biochem.* **2005**, 37, 955-964.
- (25) Patananan, A.N.; Budenholler, L.M.; Eskin, A. Torres, E.R.; Clarke, S.G. Ethanol-induced differential gene expression and acetyl-CoA metabolism in a longevity model of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Exp. Gerontol.* **2015**, 61, 20-30.
- (26) Dhawan, R.; Dusenbery, D.B.; Williams, P.L. Comparison of lethality, reproduction, and behavior as toxicological endpoints in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J. Toxicol. Environ. Health.* **1999**, 58, 451-462.
- (27) Mitchell, P.H.; Bull, K.; Glautier, S.; Hopper, N.A.; Holden-Dye, L.; O'connor, V. The concentration-dependent effects of ethanol on *Caenorhabditis elegans* behaviour. *Pharmacogenomics J.* **2007**, 07, 411-417.
- (28) Davis JR, Li Y, Rankin CH, Effects of developmental exposure to ethanol on *Caenorhabditis elegans*. *Alcohol.: Clin. Exp. Res.* **32(5)**: 853-867 (2008).
- (29) Walters, D.R.; Mcpherson, A.; Cowley, T. Ethanol perturbs polyamine metabolism in the phytopathogenic fungus *Pyrenophora avenae*, *FEMS Microbiol. Lett.* **1998**, 163, 99-103.
- (30) Yu, X.; Zhao, W.; MA, J.; Fu, X.; Zhao, Z.J.; Beneficial and harmful effects of alcohol exposure on *Caenorhabditis elegans* worms. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2011**, 412, 757-762.

- (31) Dao, T. and Dantigny, P. Control of food spoilage fungi by ethanol. *Food control*, **2011**, 22, 360-368.
- (32) Tariq, M.; Shahnaz, D.; Mehdi, F.M.; Zaki, M.J. Use of *Rhizophora mucronata* in the control of *Meloidogyne javanica* root knot nematode on okra and mash bean. *Pak. J. Bot.* **2007**, 39, 265.
- (33) Dawar, S.; Younus, S.M.; Zaki, M.J. Use of *Eucalyptus sp.*, in the control of *Meloidogyne javanica* root knot nematode. *Pak. J. Bot.* **2007**, 39, 2209-2214.
- (34) Abbass; Dawar, S.; Tariq, M.; Zaki, M.J. Nematicidal activity of spices against *Meloidogyne javanica* (Treub.) Chitwood. *Pak. J. Bot.* **2009**, 41, 2625-2632.
- (35) Momma, N.; Momma, M.; Kobara, Y. Biological soil disinfestation using ethanol: effect on *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* and soil microorganisms. *J. Gen. Plant Pathol.* **2010**, 76, 336-344.
- (36) Grimme, E.; Zidack, N.K.; Sikora, R.A.; Strobel, G.A.; Jacobsen, B.J. Comparison of *Muscodor albus* volatiles with a biorational mixture for control of seedling diseases of sugar beet and root-knot nematode on tomato. *Plant Dis.* **2007**, 91, 220-225.
- (37) Barros, A.F.; Campos, V.P.; Silva, J.C.P.; Pedroso, M.P.; Medeiros, F.H.V.; Pozza, E.A.; Reale, A.L. Nematicidal activity of volatile organic compounds emitted by *Brassica juncea*, *Azadirachta indica*, *Canavalia ensiformis*, *Mucuna pruriens* and *Cajanus cajan* against *Meloidogyne incognita*. *Applied Soil Ecology.* **2014**, 80, 34-43.