



MARIA CLARA CARLI

**COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS E
EXTRATO DE ALHO NO CONTROLE DE
*Meloidogyne incognita***

LAVRAS – MG

2011

MARIA CLARA CARLI

**COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS E EXTRATO DE ALHO NO
CONTROLE DE *Meloidogyne incognita***

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

Orientador

Dr. Vicente Paulo Campos

LAVRAS – MG

2011

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

Carli, Maria Clara.

Compostos orgânicos voláteis e extrato de alho no controle de
Meloidogyne incognita / Maria Clara Carli. – Lavras : UFLA, 2011.
60 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2011.

Orientador: Vicente Paulo Campos.

Bibliografia.

1. *Allium sativum*. 2. Nematoides das galhas. 3. Manejo de
fitonematoides. 4. Controle alternativo de fitonematoides. I.
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 632.2

MARIA CLARA CARLI

**COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS E EXTRATO DE ALHO NO
CONTROLE DE *Meloidogyne incognita***

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

APROVADA em 23 de fevereiro de 2011.

Dr. Eduardo Alves UFLA

Dra. Luciane Vilela Resende UFLA

Dr. Vicente Paulo Campos
Orientador

**LAVRAS – MG
2011**

Ao meu amor Everton, com muito carinho e gratidão

DEDICO

*À Momis e ao Pops,
com toda minha alegria e amor*

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as bênçãos recebidas e presença constante em minha vida.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Fitopatologia (DFP), pela oportunidade da realização do curso de pós-graduação.

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

Ao professor Vicente Paulo Campos, pelo apoio, orientação, paciência, dedicação e seus valiosos ensinamentos científicos e filosóficos.

Aos professores do DFP, pelos valiosos conhecimentos transmitidos neste período.

A todos os funcionários do DFP, em especial ao grande amigo Tarlei Luiz de Paula por toda força que me deu durante os experimentos.

Às estagiárias, Danielle, Luma, Marina, por todas as ajudas.

Aos amigos do Laboratório de Nematologia: Lilian, Davidson, Eduardo, Willian Rodrigues, Alex, Willian Terra, Júlio, Márcia e Cléber pelos momentos prazerosos e engraçadíssimos e, à Renata, por tudo isso, além das infinitas ajudas nas minhas estatísticas.

Às meninas da república e aos meninos da Hakuna Matata.

A todos os amigos do Departamento de Fitopatologia pelos momentos de alegria e companheirismo, em especial a Buhzinha.

À Cynthia e ao Gabriel por toda força e incentivo em minha trajetória.

À minha família que sempre torceu por mim e aos meus amigos de longos anos que continuam ao meu lado em tudo e para tudo.

OBRIGADA

“A mente que se abre a uma nova ideia, jamais retornará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

*“No sertão da minha terra,
fazenda é o camarada que ao chão se deu
Fez a obrigação com força,
parece até que tudo aquilo ali é seu
Só poder sentar no morro e ver tudo verdinho,
lindo a crescer
Orgulhoso camarada, de viola em vez de enxada”*

Milton Nascimento

RESUMO

Os nematoides do gênero *Meloidogyne* Goeldi estão entre os patógenos que possuem alta capacidade de causar prejuízos a diferentes culturas de importância econômica. O uso de extrato de alho, além dos compostos orgânicos voláteis (COVs), pode constituir-se numa alternativa ao controle de diversas doenças de plantas, incluindo aquelas causadas por nematoides. Este trabalho foi realizado com o objetivo de investigar se os COVs e extratos de alho possuem capacidade nematicida à *Meloidogyne incognita*. Em placa de Petri de plástico, foram realizados experimentos em que o extrato de alho, em diferentes concentrações, ficou em contato direto com ovos e juvenis de segundo estágio (J2) de *M. incognita*, avaliando-se então a mortalidade e eclosão de J2. Utilizando-se placa de Petri de plástico bipartida, foi avaliada a imobilidade e mortalidade de J2 por COVs. Os COVs também foram avaliados empregando-se outra técnica em que se usaram tubos SupelcoTM SPME. O extrato aquoso de alho possui compostos que diluídos em água causaram alta imobilidade e mortalidade de J2 de *M. incognita*, além de redução na eclosão de J2. Esses compostos diluídos em água se mantiveram tóxicos aos J2 mesmo quando estocado por 21 dias. Em placas bipartidas, tanto o extrato aquoso como o macerado de alho sem água, liberaram COVs tóxicos a J2 de *M. incognita*, no entanto, na maior dose usada para o extrato aquoso a mortalidade chegou a 17% de J2 enquanto no alho macerado sem água a mortalidade foi de 100% desde a menor dose testada. Em tubos SupelcoTM SPME, a menor dosagem do macerado sem água causou 96% de mortalidade enquanto no extrato aquoso foi de 35% para a mesma dosagem. A mortalidade de J2 permaneceu a mesma com o uso de areia seca e areia úmida. Redução na eclosão de J2 pelos COVs foi semelhante tanto em macerado sem água como em extrato aquoso de alho chegando a 84% de redução da eclosão quando comparado ao controle. O alho pode ser um eficiente agente nematicida tanto pela liberação de COVs quanto por compostos solúveis em água, porém, os COVs são mais tóxicos a J2 no macerado de alho a seco.

Palavras-chave: Controle alternativo de fitonematoides. Manejo de fitonematoides. Nematoides das galhas. *Allium sativum*.

ABSTRACT

The nematodes of the genus *Meloidogyne* Goeldi are among the pathogens that have high potential to cause damage to different crops of economic importance. The use of garlic extract, and volatile organic compounds (VOCs), may become an alternative method for controlling various plant diseases, including those caused by nematodes. The aim of this study was to investigate whether VOCs and garlic extracts have the toxic capacity against *Meloidogyne incognita*. By using plastic Petri dishes, experiments were performed in which garlic extract, in different concentrations, was in direct contact to eggs and second stage juveniles (J2) of *M. incognita* resulting in the evaluation of J2 hatching and mortality. In compartmental Petri dishes the J2 mortality and immobility by VOCs, were evaluated. VOCs were also studied by the technique in which Supelco™ SPME tubes were used. The garlic aqueous extract has water diluted compounds which caused high J2 immobility and mortality as well as reduction in J2 hatching. The water diluted compounds remained toxic to J2 even in storage for 21 days. In compartmental Petri dishes both crushed garlic, aqueously or not, released toxic VOCs to *M. incognita* J2, however, from aqueous, the J2 mortality reached 17% whereas from crushed garlic without water the J2 mortality was 100% since the lower tested dose. When the Supelco™ SPME tubes technique was used, the VOCs from the lowest without-water-garlic-crushed caused 96% J2 mortality whereas from aqueous crushed was 35% for the same dosage. The J2 mortality kept the same when dried or wet sand was employed. J2 hatching reduction by VOCs was alike in garlic crushed aqueously or not reaching to 84% hatching reduction compared to control. Garlic may become an efficient bionematicide due to toxic VOCs and water soluble compounds, however, the VOCs are more toxic to J2 when liberated from crushed garlic without water.

Keywords: Alternative control of nematodes. Management of nematodes. Root-knot nematodes. *Allium sativum*.

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1	11
	INTRODUÇÃO GERAL	11
1	INTRODUÇÃO	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1	Nematoide de galhas <i>Meloidogyne</i> spp.	13
2.2	Biologia do alho	15
2.3	Usos, ação pesticida e química do alho	16
2.4	Compostos orgânicos voláteis do alho e de outras plantas	19
3	CONSIDERAÇÕES GERAIS	22
	REFERÊNCIAS	23
	CAPÍTULO 2 Compostos orgânicos voláteis e extrato de alho no controle de <i>Meloidogyne incognita</i>	29
1	INTRODUÇÃO	31
2	MATERIAL E MÉTODOS	33
2.1	Obtenção de ovos e juvenis do segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne incognita</i>	33
2.2	Obtenção do extrato aquoso de alho	33
2.3	Obtenção do macerado sem água de alho	33
2.4	Compostos diluídos em água a partir de macerado aquoso de alho	34
2.4.1	Imobilidade e mortalidade de juvenis de segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne incognita</i>	34
2.4.2	Eclosão de J2 de <i>M. incognita</i> em extrato aquoso de alho	34
2.4.3	Mortalidade de J2 de <i>M. incognita</i> em extrato aquoso de alho estocado por 21 dias	35
2.5	Compostos orgânicos voláteis (COVs) de alho a <i>Meloidogyne incognita</i>	35
2.5.1	Mortalidade de J2 de <i>M. incognita</i> por COVs liberados por extrato aquoso de alho empregando placas bipartidas	35
2.5.2	Mortalidade de J2 de <i>M. incognita</i> por COVs liberados por alho macerado sem água empregando placas bipartidas	36
2.5.3	Mortalidade e imobilidade de J2 de <i>M. incognita</i> por COVs liberados do alho macerado sem água e do extrato aquoso empregando tubos Supelco™ SPME	36
2.5.4	Mortalidade de J2 de <i>M. incognita</i> por COVs liberados do alho macerado sem água em tubos Supelco™ SPME com areia seca e molhada	37
2.5.5	Mortalidade e imobilidade de J2 de <i>M. incognita</i> por COVs liberados pelo alho macerado sem água e estocado empregando tubos Supelco™ SPME	39

2.5.6	Eclosão de J2 de <i>M. incognita</i> por COVs liberados pelo alho em tubos Supelco™ SPME	39
2.6	Desenvolvimento embrionário dentro dos ovos	40
2.7	Análise dos dados e estatística	40
3	RESULTADOS	41
3.1	Efeito dos compostos do alho diluídos em água a partir de macerado aquoso em <i>Meloidogyne incognita</i>	41
3.2	Efeito dos compostos orgânicos voláteis do alho em <i>Meloidogyne incognita</i>	43
4	DISCUSSÃO	52
5	CONCLUSÕES	55
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	56
	REFERÊNCIAS	57

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO

Os nematoides são animais vermiformes que são encontrados em praticamente todos os ambientes, podendo ser parasitas de humanos, animais e plantas, causando diversos tipos de doenças ou serem organismos de vida livre. Os nematoides parasitas de plantas são denominados fitonematoides. Estes fitonematoides são responsáveis por uma redução aproximada de 11% das produções agrícolas mundiais, o que corresponde a uma redução de milhões de toneladas e um prejuízo de 80 bilhões de dólares anuais (AGRIOS, 2005).

Em uma população de nematoides de um solo sob condição de manejo agrícola, 20 a 40% deles são fitonematoides (BOAG et al., 1998). No seu controle têm sido empregadas diversas táticas de controle individualizadas ou integradas (CAMPOS; SILVA, 2008; SIKORA; BRIDGE; STARR, 2005). Porém, buscam-se métodos alternativos de controle que sejam eficientes e possuam um baixo custo ao produtor além de evitar contaminações ao homem e ao meio ambiente.

As plantas podem ser uma saída na busca pelo controle de fitonematoides, pois, elas possuem em seu metabolismo, compostos orgânicos que são tóxicos a diversos patógenos. Além de liberar esses compostos, as plantas são utilizadas no manejo de doenças e pragas na forma de rotação de culturas, consórcio, incorporação de órgãos triturados ao solo, entre outros.

Compostos constituintes de plantas que são tóxicas a fitonematoides têm sido encontrados como os glucosinolatos, entre outros (POTTER; DAVIES;

RATHJEN, 1998; ZASADA; FERRIS, 2003) e óleos essenciais (BAKKALI et al., 2008; CHOI et al., 2007; OKA et al., 2000; PARK et al., 2005, 2007).

Em extrato aquoso de alho, foi verificado que existem compostos tóxicos a *Meloidogyne incognita* (AMARAL et al., 2002; GUPTA; SHARMA, 1991). Compostos orgânicos voláteis (COVs) de extrato aquoso de alho reduzem a germinação de microconídio e o crescimento de hifas de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (TARIQ; MAGEE, 1990). Na atualidade, a maioria dos estudos sobre a produção de COVs tem se concentrado na produção de tais substâncias pelas plantas (KESSELMEIER; STAUDT, 1999). Entretanto, os COVs de alho, ainda, não foram testados contra fitonematoides em nenhuma técnica em que os COVs de alho são separados e só podem entrar em contato com o nematoide pelo ar. Objetivou-se então, testar se os COVs e extrato do alho possuem atividade nematicida a *Meloidogyne incognita*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Nematóide de galhas *Meloidogyne* spp.

Nematóides são pequenos vermes filiformes pertencentes ao Filo Nematoda, Reino Animal, abundantes no solo, na água e nas plantas. Em uma população de nematóides de um solo sob condição de manejo agrícola, 20 a 40% deles são fitonematóides (BOAG et al., 1998). No filo Nematoda são encontradas 4105 espécies de nematóides parasitas de plantas (HUGOT; BAUJARD; MORAND, 2001). São diversos os órgãos das plantas atacados por nematóides. Os nematóides formadores de galhas radiculares do gênero *Meloidogyne* Goeldi estão entre os patógenos mais importantes da agricultura mundial, pois, possuem a capacidade de causar prejuízos a diversas culturas de importância econômica e possuem uma ampla disseminação pelo mundo em decorrência de sua facilidade de adaptação a diversos tipos de ambientes (SASSER, 1980). No Brasil, a espécie *M. incognita* é uma das mais disseminadas. Os danos causados às culturas são consequências do parasitismo do nematóide na planta causando um efeito direto tanto na absorção de nutrientes como na absorção de água por estas. Fatores como a idade da planta, população do nematóide, tipo de solo e condições climáticas se relacionam diretamente com as perdas causadas pelo fitonematóide (QUÉNÉHERVÉ, 1988). Os juvenis de segundo estágio (J2) penetram na ponta da raiz e pela injeção de substâncias, modificam algumas células localizadas próximas à região dos vasos dando origem às chamadas células gigantes ou nutridoras, que aumentam de tamanho e passam a fornecer alimento ao nematóide que se torna sedentário. Outras células menores, formadas próximas às células gigantes, são produzidas para assimilação e transferência do alimento (FERRAZ; MONTEIRO, 1995). Desse processo resultam raízes engrossadas na região em

que o parasitismo ocorre. Essas raízes diferenciadas são de fácil visualização a olho nu e constituem as chamadas galhas que apresentam tamanho, forma e localização preferencial no sistema radicular, variáveis em função da espécie de *Meloidogyne* considerada, da planta hospedeira envolvida e do nível de infecção observado (FERRAZ, 2001).

Na cultura do café, os fitonematoides podem causar perdas em até 30% (LORDELLO et al., 1990), e 17 espécies são relatadas associadas ao cafeeiro no mundo, sendo o *M. exigua*, uma das principais espécies para esta cultura, porém, *M. incognita* e *M. paranaensis* são as espécies mais prejudiciais ao cafeeiro por sua agressividade e dificuldade de controle (CAMPOS; VILLAIN, 2005; ROBERTS, 1995). *Meloidogyne paranaensis* é agressivo ao cafeeiro, possui alta persistência no solo, ampla gama de hospedeiros e ausência de fonte de resistência em *Coffea arabica* (SILVA; OLIVEIRA; ZAMBOLIM, 2009). Em todo o mundo foram descritas mais de 100 espécies de *Meloidogyne* e 17 dessas espécies estão associadas ao cafeeiro (CAMPOS; VILLAIN, 2005).

Em algodão, as estimativas de perdas no Brasil, causadas por *Meloidogyne* spp. chega a 17% (SASSER; FRECKMAN, 1987), mas apenas as raças 3 e 4 de *M. incognita* é que parasitam o algodoeiro. Na cultura da soja, os prejuízos econômicos chegam a bilhões de dólares no cenário internacional com perdas anuais de US\$ 2,7 bilhões causadas por *Meloidogyne* sp (TIHOHOD, 2000). No Brasil, *M. javanica* e *M. incognita* são as espécies que mais limitam a produção de soja. *M. javanica* ocorre de forma generalizada, enquanto *M. incognita* predomina em áreas cultivadas, anteriormente, com café ou algodão (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA, 2006). Além dessas, existem outras espécies que causam grandes prejuízos econômicos, como *M. arenaria* e *Heterodera glycines*.

2.2 Biologia do alho

O alho (*Allium sativum* L.) pertence à família *Liliaceae*, que inclui, também, a cebola e cebolinha, constitui uma das 600 espécies dentro do gênero *Allium* (BLOCK et al., 1993). É uma planta herbácea, com média de 50 cm de altura ou mais. O pseudocaulé é formado pelas bainhas das folhas as quais se implantam em caule pequeno e achatado. As gemas do caule, quando em condições climáticas favoráveis, desenvolvem-se formando cada uma um bulbilho que, em seu conjunto, formam o bulbo. Os bulbilhos são formados pela folha de proteção, pela folha de reserva e pela folha de brotação. Os bulbilhos estão ligados ao caule pela base, recoberto por várias folhas que, em conjunto, constituem a capa, que pode ser de coloração branca, arroxeadada ou amarronzada (SILVA; SILVA, 2009). Normalmente, no mesmo pé, são produzidos de 6 a 15 bulbilhos, os quais são empregados como condimento culinário e medicamento há centenas de anos em todo o mundo.

É uma cultura que exige baixa temperatura para que ocorra a bulbificação e é muito tolerante a geadas. Tanto a temperatura quanto o fotoperíodo são fatores limitantes à produção e os valores são diferentes para cada cultivar. O fotoperíodo deve ser maior que o valor crítico da cultivar utilizada, sendo que para algumas cultivares esse valor é inferior a 9 horas, porém, as cultivares tardias, denominadas cultivares nobres, exigem um fotoperíodo mínimo de 13 horas para bulbificar e clima frio. As temperaturas exigidas pela cultura variam conforme as fases de desenvolvimento da planta, variando de 10 a 25°C (MACÊDO; SILVA; SILVA, 2009).

Para possibilitar o plantio de cultivares nobres em regiões onde as condições termo-fotoperiódicas não são favoráveis às exigências da planta, é utilizada a prática da vernalização. Esta técnica se baseia em armazenar o alho-semente durante um período de 40 a 60 dias em câmara, com temperatura de 3 a

5°C e umidade de 70 a 80%. A retirada dos bulbos da câmara só deverá ser feita na véspera do plantio.

O plantio é realizado entre fevereiro e julho e depende da cultivar a ser plantada. O teor de água no solo nunca deve ser inferior a 60%, porém, se o solo tiver um teor muito maior que este, poderá ocorrer superbrotamento.

O alho é uma planta de cultura anual, porém, pode ser plantada bienalmente. A China é o maior produtor mundial de alho, onde foi responsável por cerca de 76% da produção no ano de 2005. Outros países como a Índia, Coreia do Sul, Rússia, Espanha, Tailândia e Ucrânia destacam-se entre os maiores produtores mundiais. Na América do Sul, a Argentina é o maior produtor, seguido pelo Brasil (RESENDE; PEREIRA, 2009).

Apesar de o Brasil ser o segundo maior produtor de alho na América do Sul, ele é um importador de alho. Existe a exportação, porém, é esporádica e em baixa quantidade. Os maiores fornecedores de alho para o Brasil são Argentina e China, sendo a China o maior exportador (MARQUES, 2011). No Brasil, Minas Gerais se destaca pela maior produção de alho, seguida por Rio Grande do Sul, Goiás e Santa Catarina (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2011).

2.3 Usos, ação pesticida e química do alho

Existem relatos sobre o alho desde 2600 a 2100 A.C.. Sua origem é da Ásia Central e fazia parte da dieta de civilizações gregas e babilônicas. Hipócrates (o pai da medicina moderna) descrevia o alho como um laxante, diurético e que, também, servia no tratamento de tumores uterinos (HARRIS et al., 2001).

Além de seu uso na alimentação, evidências de atividades antimicrobianas do alho foram descritas na França, em 1721, quando, durante

uma praga em Marselha, 4 homens não foram infectados após a remoção dos mortos. Essa resistência à doença foi atribuída ao alho e vinho (HANN, 1996). Mas a atividade antimicrobiana do alho foi relatada por Pasteur em 1858, embora nenhuma referência esteja disponível.

O químico alemão Wertheim (1844) realizou os primeiros estudos químicos do alho. Por um processo de destilação a vapor, ele foi capaz de obter um óleo de cheiro pungente de dentes de alho. Ele propôs o nome de alilo para os hidrocarbonetos contidos no óleo. O destilado a vapor que tinha propriedades antimicrobianas também foi obtido por Semmler (1892). Cavallito e Bailey (1944) realizaram o primeiro estudo definitivo sobre a química do alho. Eles atribuíram a atividade antibacteriana do alho ao tiosulfonato de dialila, denominado alicina, que é uma substância volátil e instável. O bulbilho de alho contém o substrato aliina (S-alil-S-oxo-L-cisteína) que, ao ser fatiado ou esmagado, mistura-se à enzima alinase (Figura 1), produzindo o ácido tiosulfênico que, pela dimerização espontânea, forma a alicina, que é responsável pelo odor característico do alho (SLUSARENKO; PATEL; PORTZ, 2008). A alicina contém, aproximadamente, 40% de enxofre, porém, sem nitrogênio ou grupos halogênicos. O óleo é solúvel em água e miscível em álcool, benzina e éter. A alicina é mais bacteriostática do que bactericida; no entanto, seu efeito é semelhante em bactérias Gram positivas e em Gram negativas (CAVALLITO; BAILEY, 1944).

Em decorrência de sua alta instabilidade, a efetividade de sua ação antimicrobiana é questionada *in vivo* (AMAGASE et al., 2001). Bianchi et al. (1997) verificaram que compostos orgânicos voláteis do alho, como cadeias lineares de aldeídos, sulfeto de alila e dissulfetos, mostraram-se estáveis após uma semana de preparação em solução. As ações biológicas da alicina foram observadas em diversas pesquisas (PARK et al., 2005; SLUSARENKO; PATEL; PORTZ, 2008).

Na agricultura, o uso de extrato ou óleo de alho pode constituir-se numa alternativa no controle de diversas doenças de plantas, incluindo aquelas causadas por nematoides (BIANCHI et al., 1997; PARK et al., 2005; TARIQ; MAGEE, 1990).

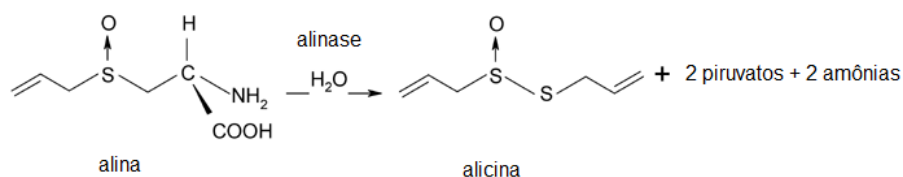


Figura 1 Produção de alicina pela quebra da aliina resultante da ação da enzima alinase

Óleos essenciais de alho, na maior concentração testada, apresentaram atividade nematicida, causando 100% de imobilidade e de mortalidade em machos, fêmeas e juvenis de *Bursaphelenchus xylophilus* (PARK et al., 2005). Também foram avaliados os componentes do alho (sulfeto de dialila, dissulfeto de dialila e trissulfeto de dialila) e da canela (cinemaldeído e acetato cinamil) quanto aos seus efeitos nematicidas a esse patógeno. O alho se mostrou mais eficiente que a canela. Os compostos encontrados nos óleos essenciais do alho foram o dissulfeto de dialila (59,7%), sulfeto de dialila (21,3%) e trissulfeto de dialila (10,9%). Dentre eles, o trissulfeto de dialila, foi o mais tóxico e com maior peso molecular, seguido do dissulfeto de dialila, com menor peso molecular. Entretanto, Neves et al. (2005) não obtiveram redução na eclosão de J2 de *M. javanica* com extratos cetônicos de alho, mostarda e pimenta malagueta.

Extrato de alho tem se mostrado eficiente no controle de fungos fitopatogênicos. Bianchi et al. (1997) verificaram efeito fungistático de extrato aquoso de pó de alho adicionado em meio BDA (batata dextrose Agar) em placas de Petri em testes realizados com *Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum*

var. *ultimum*, *Fusarium solani* e *Colletotrichum lindemuthianum*. Eles verificaram, por meio de MEV (microscópio eletrônico de varredura) que, na menor concentração testada, apenas *P. ultimum* apresentou alterações morfológicas. Entretanto, na maior concentração, *R. solani* e *C. lindemuthianum* tiveram suas hifas fortemente danificadas, enquanto *F. solani* teve suas hifas fragmentadas e com um diâmetro ligeiramente menor do que as do controle, porém, tanto *F. solani* quanto *C. lindemuthianum* aumentaram a produção de conídios nos tratamentos. O autor afirma que a atividade antifúngica do alho pode ser atribuída apenas parcialmente ao composto volátil que o alho contém e que essa atividade pode ser atribuída a ajoenos, que é um dos compostos ativos do alho. Balestra et al. (2009), utilizando extrato de alho contra *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Xanthomonas vesicatoria* e *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* verificaram o efeito antibacteriano tanto *in vitro* como *in vivo*.

2.4 Compostos orgânicos voláteis do alho e de outras plantas

Produtos à base de compostos orgânicos voláteis (COVs) poderão constituir-se em método alternativo de controle de fitonematoides no futuro. Na atualidade, a maioria dos estudos sobre a produção de COVs tem se concentrado na produção de tais substâncias pelas plantas (KESSELMEIER; STAUDT, 1999). As plantas podem produzir mais de 1700 COVs diferentes em mais de 90 famílias, mas a maioria das espécies pode emitir entre 20 e 60 compostos diferentes (KNUDSEN; GERSHENZON, 2006).

Compostos voláteis com ação biocida liberados, durante a decomposição de brássicas, estão envolvidos na biofumigação (ANGUS et al., 1994; KIRKEGAARD; SARWAR, 1998). Após a ruptura mecânica ou bioquímica de tecidos das brássicas, glucosinolatos e mirosinases, localizados

em diferentes partes das células, são liberados. A hidrólise enzimática de glucosinolatos leva à formação de isotiocianatos voláteis bioativos, sendo então os glucosinolatos os precursores do isotiocianato (ROUBTSOVA et al., 2007). O isotiocianato é tóxico a diversos patógenos (MOJTAHEDI; SANTO, 1996; SARAVIA; GAYLARDEB, 1998; ZASADA; FERRIS, 2003). Com cobertura plástica, os voláteis podem permanecer por mais tempo no ambiente do solo e ser mais eficientes no controle de fitopatógenos. No entanto, quando não há a cobertura plástica, os compostos são rapidamente dissipados para a atmosfera (AMBRÓSIO et al., 2008).

Muitos voláteis florais possuem atividade antimicrobiana ou antifúngica e podem, também, agir na defesa de órgãos reprodutivos da planta contra patógenos (FRIEDMAN; HENIKA; MANDRELL, 2002; HAMMER; CARSON; RILEY, 2003; MORAES et al., 2001).

O alho é famoso por seu odor característico, decorrente da alicina e outros componentes solúveis. Yu, Wu e Liou (1989a, 1989b) verificaram que, na destilação a vapor de homogeneizados de alho, a maioria das alicinas foram decompostas a sulfuretos, e os principais voláteis identificados por CG-MS foram monossulfetos, dissulfetos e trissulfetos. Wu, Yang e Liu (1996), expondo bulbos de alho a irradiações para verificar os níveis de compostos voláteis verificaram tanto em alho irradiado quanto não irradiado (controle) que os principais compostos voláteis foram dissulfeto de dialila (77% dos voláteis totais), dissulfeto de alila e metila (6%), 3,3'-tiobis-l-propeno (4%), tetrassulfeto de dialila (2%), *trans*-1,2-dimetoxicicloexano (1%), e trissulfeto de dialila (1%).

Em resumo, a alicina é um componente que possui características antimicrobianas e antifúngicas e é um composto extremamente instável, que se decompõe em sulfetos, incluindo ajoeno. Embora a alicina tenha demonstrado

ser um agente antimicrobiano eficaz *in vitro*, os seus efeitos *in vivo* são questionáveis (FREEMAN; KODERA, 1995).

3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Diversas dificuldades são encontradas no controle de *Meloidogyne incognita* por parte dos agricultores, por este patógeno apresentar uma ampla gama de hospedeiro além de alta adaptação a diversos tipos de ambientes. As principais formas de controle baseiam-se na aplicação de nematicidas sintéticos que, além de apresentarem um alto custo de produção, são altamente tóxicos ao meio ambiente e ao homem. Métodos de controle como rotação de cultura e consórcios se fazem necessários, porém, cada um isoladamente não apresenta alta eficiência. Conseqüentemente, vários estudos têm sido realizados com o objetivo de obter novos métodos de controle e que contornem os problemas dos produtos atualmente disponíveis. Para tanto, uma possível alternativa consiste no uso de substâncias orgânicas oriundas de extratos de plantas que possuem atividade nematicida. Extratos de alho podem apresentar propriedades nematicidas que poderão ser testadas tanto na forma de extratos aquosos, em que os compostos se apresentam solúveis em água, quanto na forma de compostos orgânicos voláteis.

REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. Amsterdam: Elsevier, 2005. 922 p.
- AMAGASE, H. et al. Supplement: recent advances on the nutritional effects associated with the use of garlic as a supple: intake of garlic and its bioactive components. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 131, n. 1, p. 955S-962S, Mar. 2001.
- AMARAL, D. R. et al. Efeito de alguns extratos vegetais na eclosão, mobilidade, mortalidade e patogenicidade de *M. exígua* do cafeeiro. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 26, n. 1, p. 43-48, fev. 2002.
- AMBRÓSIO, M. M. Q. et al. Controle de fitopatógenos do solo com materiais vegetais associados à solarização. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 34, n. 4, p. 354-358, out./dez. 2008.
- ANGUS, J. F. et al. Biofumigation: isothiocyanates released from *Brassica* roots inhibit growth of the take-all fungus. **Plant and Soil**, Netherlands, v. 162, n. 1, p. 107-112, May 1994.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils: a review. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 42, n. 2, p. 446-475, Apr. 2008.
- BALESTRA, G. M. et al. Antibacterial effect of *Allium sativum* and *Ficus carica* extracts on tomato bacterial pathogens. **Crop Protection**, Guildford, v. 28, n. 10, p. 807-811, Oct. 2009.
- BIANCHI, A. et al. Ultrastructural studies of the effects of *Allium sativum* on phytopathogenic fungi “*in vitro*”. **Plant Disease**, Quebec, v. 81, n. 11, p. 1241-1246, Nov. 1997.
- BLOCK, E. et al. Organosulfur chemistry of garlic and onion: recent results. **Pure & Applied Chemistry**, Cambridge, v. 65, n. 4, p. 625-632, Apr. 1993.
- BOAG, B. et al. Observations on the effect of different management regimes of set-aside land on nematode community structure. **Applied Soil Ecology**, Dublin, v. 9, n. 4, p. 339-343, Sept. 1998.

CAMPOS, V. P.; SILVA, J. R. C. Management of *Meloidogyne* spp. in coffee plantations. In: SOUZA, R. M. (Ed.). **Plant-parasitic nematodes of coffee**. New York: Springer Science, 2008. p. 149-164.

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

CAVALLITO, C. J.; BAILEY, H. J. Allicin, the antibacterial principle of *Allium sativum* I: isolation, physical properties and antibacterial action. **Journal of the America Chemical Society**, Washington, v. 66, n. 3, p. 1950-1951, Nov. 1944.

CHOI, I. H. et al. Nematicidal activity of monoterpenoids against the pine wood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*). **Russian Journal of Nematology**, Moscow, v. 15, n. 1, p. 35-40, Mar. 2007.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Alguns aspectos da importação de alho pelo Brasil**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/84e161edba8922fc7639d2a3d44a5682..pdf>>. Acesso em: 3 jan. 2011.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Sistemas de produção: tecnologias de produção de soja**, Paraná, 2007. Londrina, 2006. 217 p.

FERRAZ, L. C. C. B. As meloidoginoses da soja: passado, presente e futuro. In: SILVA, J. F. V. et al. (Ed.). **Relações parasito-hospedeiro nas meloidoginoses da soja**. Londrina: EMBRAPA Soja, 2001. p. 15-38.

FERRAZ, L. C. C. B.; MONTEIRO, A. R. Nematóides. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v. 1, p. 168-201.

FREEMAN, F.; KODERA, Y. Garlic chemistry: stability of *S*-(2-propenyl)-2-propene-1-sulfinothioate (allicin) in blood, solvents, and simulated physiological fluids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 43, n. 9, p. 2332-2338, Sept. 1995.

FRIEDMAN, M.; HENIKA, P. R.; MANDRELL, R. E. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escheria coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enteric*. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 65, n. 10, p. 1545-1560, Oct. 2002.

GUPTA, R.; SHARMA, N. K. Nematicidal properties of garlic, *Allium sativum*. **Indian Journal Nematology**, New Delhi, v. 21, n. 1, p. 14-18, June 1991.

HAMMER, K.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 95, n. 4, p. 853-860, Oct. 2003.

HANN, G. History, folk medicine, and legendary uses of garlic. In: KOCH, H. P.; LAWSON, L. D. (Ed.). **Garlic: the science and therapeutic application of *Allium sativum* L. and related species**. Baltimore: Williams and Wilkins, 1996. p. 37-107.

HARRIS, J. C. et al. Antimicrobial properties of *Allium sativum* (garlic). **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 57, n. 3, p. 282-286, Oct. 2001.

HUGOT, J. P.; BAUJARD, P.; MORAND, S. Biodiversity in helminthes and nematodes as a field study: an overview. **Nematology**, Leiden, v. 3, n. 3, p. 199-208, July 2001.

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

KIRKEGAARD, J. A.; SARWAR, M. Biofumigation potential of brassicas. **Plant and Soil**, The Hague, v. 201, n. 1, p. 71-89, Apr. 1998.

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

LORDELLO, R. R. A. et al. Plantio de cafezal em área infestada por *Meloidogyne exigua*. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 14, n. 1, p. 18-19, fev. 1990.

MACÊDO, F. S.; SILVA, R. J.; SILVA, E. C. Exigências climáticas. In: SOUZA, R. J.; MACÊDO, F. J. (Ed.). **Cultura do alho: tecnologias modernas de produção**. Lavras: UFLA, 2009. p. 31-38.

MARQUES, M. C. **Alho proposta de preço mínimo safra 2006/2007**.

Disponível em

:<http://www.conab.gov.br/conabweb/download/precos_minimos/proposta_de_precos_minimos_safra_2006_07_alho.pdf>. Acesso em: 3 jan. 2011.

MOJTAHEDI, H.; SANTO, G. S. Toxicity of isothiocyanate derivatives to *Meloidogyne chitwoodi* and *Pratylenchus penetrans* in soil environment. In: INTERNATIONAL NEMATOLOGY CONGRESS, 3., 1996, Guadeloup. **Proceedings...** Guadeloup: SIN, 1996. p. 128-129.

MORAES, C. M. de et al. Caterpillar-induced nocturnal plant volatiles repel nonspecific females. **Nature**, London, v. 410, n. 29, p. 577-580, Mar. 2001.

NEVES, W. S. et al. Atividade de extratos de alho (*Allium sativum*), mostarda (*Brassica campestris*) e pimenta malagueta (*Capsicum frutescens*) sobre a eclosão de juvenis de *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 29, n. 2, p. 273-278, 2005.

OKA, Y. et al. Nematicidal activity of essential oils and their components against root-knot nematodes. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 90, n. 7, p. 710-715, July 2000.

PARK, I. K. et al. Nematicidal activity of plant essential oils and components from ajowan (*Trachyspermum ammi*), allspice (*Pimenta dioica*) and litsea (*Litsea cubeba*) essential oils against pine wood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*). **Journal of Nematology**, College Park, v. 39, n. 3, p. 275-279, Mar. 2007.

_____. Nematicidal activity of plant essential oils and components from garlic (*Allium sativum*) and cinnamom (*Cinnamomum verum*) oils against the pine wood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*). **Nematology**, Leiden, v. 7, n. 5, p. 767-774, Sept. 2005.

POTTER, M. J.; DAVIES, K.; RATHJEN, A. J. Suppressive impact of glucosinolates in *Brassica* vegetative tissues on root lesion nematode *Pratylenchus neglectus*. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 24, n. 1, p. 67-80, Jan. 1998.

QUÉNÉHERVÉ, P. Population of nematodes in soils under banana cv. Poyo in the Ivory Coast: 2., influence of soil texture, pH and organic matter on nematode populations. **Revue de Nématologie**, Bondy, v. 1, n. 2, p. 245-251, 1988.

RESENDE, G. M.; PEREIRA, A. J. Importância econômica. In: SOUZA, R. J.; MACÊDO, F. J. **Cultura do alho: tecnologias modernas de produção**. Lavras: UFLA, 2009. p. 13-18.

ROBERTS, P. A. Conceptual and practical aspects of variability in root-knot nematodes related to host plant resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 33, p. 199-221, Sept. 1995.

ROUBTSOVA, T. et al. Effect of Broccoli (*Brassica oleracea*) tissue, incorporated at different depths in a soil column, on *Meloidogyne incognita*. **Journal of Nematology**, College Park, v. 39, n. 2, p. 111-117, Feb. 2007.

SARAVIA, S. G. G.; GAYLARDEB, C. C. The antimicrobial activity of an aqueous extract of *Brassica negra*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Birmingham, v. 41, n. 2, p. 145-148, Sept. 1998.

SASSER, J. N. Root-knot nematodes a global menace to crops production. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 64, n. 1, p. 36-41, Jan. 1980.

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, 1987. p. 7-14.

SEMMLER, F. W. Über das ätherische öl des knoblauchs (*Allium sativum*). **Archiv der Pharmazie**, Weinheim, v. 230, n. 6, p. 434-443, 1892.

SIKORA, R. A.; BRIDGE, J.; STARR, J. L. Management practices: an overview of integrated nematode management technologies. In: LUC, M.; SIKORA, R. A.; BRIDGE, J. **Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture**. Cambridge: CABI, 2005. p. 793-825.

SILVA, E. C.; SILVA, R. J. Botânica e cultivares. In: SOUZA, R. J.; MACÊDO, F. J. (Ed.). **Cultura do alho: tecnologias modernas de produção**. Lavras: UFLA, 2009. p. 21-28.

SILVA, R. V.; OLIVEIRA, R. D. L.; ZAMBOLIM, L. Primeiro relato da ocorrência de *Meloidogyne paranaensis* em cafeeiro. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 33, n. 2, p. 187-190, 2009.

SLUSARENKO, A. J.; PATEL, A.; PORTZ, D. Control of plant diseases by natural products: allicin from garlic as a case study. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 121, n. 3, p. 313-322, July 2008.

TARIQ, V. N.; MAGEE, A. C. Effect of volatiles from garlic bulb extracts on *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici. **Mycological Research**, Cambridge, v. 94, n. 5, p. 617-620, 1990.

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

WERTHEIM, T. Untersuchung des knoblauchöls. **Annalen der Chemie und Pharmacie**, Leipzig, v. 51, p. 289-315, 1844.

WU, J. J.; YANG, J. S.; LIU, M. S. Effects of irradiation on the volatile compounds of garlic (*Allium sativum* L). **Journal of Science and Food Agriculture**, Easton, v. 70, n. 4, p. 506-508, Apr. 1996.

YU, T. H.; WU, C. M.; LIOU, Y. C. Effects of pH adjustment and subsequent heat treatment on the formation of volatile compounds of garlic. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 54, n. 3, p. 632-635, May 1989a.

_____. Volatile compounds from garlic. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 37, n. 3, p. 725-730, May 1989b.

ZASADA, I. A.; FERRIS, H. Sensitivity of *Meloidogyne javanica* and *Tylenchulus semipenetrans* to isothiocyanates in laboratory assays. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 93, n. 6, p. 747-750, June 2003.

CAPÍTULO 2

Compostos orgânicos voláteis e extrato de alho no controle de *Meloidogyne incognita*

RESUMO

Os compostos orgânicos voláteis (COVs) de órgãos de plantas, além de demonstrarem outro modo de ação das plantas, na redução populacional de fitonematoides, levam à investigação sobre a viabilidade de seu uso no controle desses patógenos. Objetivou-se investigar se os COVs e extratos de alho possuem atividade nematicida a *Meloidogyne incognita*. Com o uso de placas de Petri de plástico, foram realizados experimentos onde extratos de alho em diferentes concentrações ficaram em contato direto com juvenis do segundo estágio (J2) de *M. incognita* e avaliadas mortalidade e eclosão de J2. Também foi avaliada a mortalidade de J2 por COVs em placa de Petri de plástico bipartida assim como mortalidade e eclosão dos nematoides também, pelos COVs em tubos Supelco™ SPME. Foi verificado que o extrato aquoso de alho causou imobilidade e mortalidade de J2 de *M. incognita* bem como redução na eclosão de J2. Esse efeito foi maior com o aumento da concentração do alho no extrato e com o selamento das placas com parafilm onde estavam o extrato e os J2. A toxicidade do extrato aquoso de alho continuou elevada quando estocado por 21 dias. Os COVs do alho causaram imobilidade e mortalidade progressiva de J2 de *M. incognita* com o aumento da dosagem do alho em extrato aquoso com maior efeito no macerado sem água. Nesse macerado sem água os COVs liberados do alho causaram alta imobilidade e mortalidade de J2 a partir de 24 horas e foram sempre mais elevadas do que em extrato aquoso. Entretanto, quando no tubo Supelco™ SPME de uso na técnica empregada neste ensaio, adicionou-se areia seca ou úmida, a produção de COVs tóxicos a J2 pelos macerados de alho sem água foi semelhante. A eclosão de J2 foi reduzida por COVs liberados tanto pelo macerado sem água como pelo extrato aquoso de alho. Com base nesses resultados, o uso de COVs de alho pode ser um método alternativo de controle de *M. incognita*, mas pesquisas ainda deverão ser feitas tanto em casa de vegetação como em campo para aperfeiçoamento do método e evitar riscos de fitotoxidez.

Palavras-chave: Controle alternativo de fitonematoides. Manejo de fitonematoides. Nematoides das galhas. *Allium sativum*.

ABSTRACT

The volatile organic compounds (VOCs) from plant organs besides demonstrating other mode of action of plants on the reduction of plant-parasitic nematode populations also motivate the investigation about the viability of their use on the control of those pathogens. The objective of this study was to investigate whether VOCs and garlic extracts have nematicidal activity to *Meloidogyne incognita*. With the use of Petri dishes, experiments were performed where garlic extracts at different concentrations were in direct contact with second stage juveniles (J2) of *M. incognita* and evaluated mortality and hatching of J2. The J2 immobility and mortality by VOCs were also evaluated in compartmental Petri dishes. VOCs were also studied by technique which uses SupelcoTM SPME tubes. In the aqueous garlic extract, water diluted compounds caused immobility and mortality of second stage juveniles (J2) of *M. incognita* in addition to reduction of J2 hatching. Those effects were greater with the increase of garlic concentration in the extract and with sealing the plates with parafilm where the extract and J2 were inside. The garlic VOCs caused immobility and mortality of *M. incognita* J2 progressively with better effect when garlic were crushed without water. The VOCs released from crushed garlic without water caused high J2 immobility and mortality since 24 hours storage and the toxicity was always greater compared to aqueous garlic crushed. When in SupelcoTM SPME tubes wet and dried sands were used the VOCs productions from crushed garlic without water were alike. The J2 hatching was reduced similarly by VOCs released by both crushed garlic, aqueously or not. Based on those results, the use of garlic as bionematicide may become an alternative control method after development of additional research in field and greenhouse for modeling the uses and investigation on plant toxicity.

Keywords: Alternative control of nematodes. Management of nematodes. Root-knot nematodes. *Allium sativum*.

1 INTRODUÇÃO

O nematoide *Meloidogyne incognita* possui ampla gama de hospedeiros entre plantas anuais e perenes causando prejuízos à maioria das culturas exploradas economicamente (CAMPOS; SILVA, 2008; EVANS; TRUDGILL; WEBSTER, 1993; LUC; SIKORA; BRIDGE, 2005). No seu controle têm sido empregadas diversas táticas de controle individualizadas ou integradas (CAMPOS; SILVA, 2008; SIKORA; BRIDGE; STARR, 2005). Porém, buscam-se métodos alternativos que evitem a contaminação do homem e do meio ambiente.

As plantas, neste sentido, possibilitam o controle desses patógenos pelo uso direto (rotação de culturas, consórcio, incorporação de órgãos triturados ao solo) além de possibilitar a obtenção de conhecimento científico sobre moléculas orgânicas tóxicas integrantes de sua fisiologia e que já existem no comércio cujo potencial como nematicida devem ser analisados. Compostos constituintes de plantas tóxicas a fitonematoides têm sido encontrados como os glucosinolatos e seus produtos de hidrólise além de triterpenóides, glucosídeos, alcaloides, compostos fenólicos, ácidos graxos, sesquiterpenos, di e monoterpenoides, poliacetileno, entre outros (BEGUN et al., 2008; BUSKOV et al., 2002; CHITWOOD, 2002; DAYAN; CANTRELL; DUKE, 2009; LAZZERI; TACCONI; PALMIERI, 1993; ZASADA; FERRIS, 2003) e óleos essenciais (BAKKALI et al., 2008; CHOI et al., 2007; OKA et al., 2000; PARK et al., 2005, 2007).

Compostos constituintes dos tecidos do alho têm demonstrado atividades antifúngicas, antibacterianas, antiviral e antiprotozoários (HARRIS et al., 2001). Contudo, as atividades nematicidas têm sido investigadas recentemente. Os óleos essenciais de alho causam de 78 a 100% de mortalidade *in vitro* de *Bursaphelenchus xylophilus*. Nesses óleos encontram-se em concentrações

variadas de sulfeto de dialila (21,3%), dissulfeto de dialila (59,7%) e trissulfeto de dialila (10,9%), sendo o trissulfeto de dialila observado como o mais tóxico a *B. xylophilus* (PARK et al., 2005).

No bulbilho do alho, em extrato aquoso, existem compostos tóxicos a *Meloidogyne incognita* (AMARAL et al., 2002; GUPTA; SHARMA, 1991). Entretanto, a extração desses compostos tóxicos por cetona e posterior diluição em água não reduziu a eclosão de juvenis de segundo estágio (J2) de *M. javanica* (NEVES et al., 2005). Possivelmente, a cetona não tenha sido o extrator apropriado para as moléculas tóxicas do alho a nematoides, desde que essas moléculas orgânicas sejam de pequeno peso molecular e se volatilizam durante o procedimento empregado. Compostos orgânicos voláteis (COVs) de extrato aquoso de alho reduzem a germinação de microconídio e o crescimento de hifas de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (TARIQ; MAGEE, 1990). Entretanto, os COVs, ainda não foram testados em separado contra fitonematoides. Portanto, objetivou-se neste trabalho investigar a capacidade nematicida de compostos orgânicos voláteis e extratos de alho a *Meloidogyne incognita*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção de ovos e juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita*

Raízes galhadas de tomateiros cv. Kada, cultivadas em casa de vegetação e infestadas por *M. incognita*, foram lavadas cuidadosamente e cortadas em pedaços de, aproximadamente, 2 cm. A seguir, foram trituradas em liquidificador por 40 segundos em solução de hipoclorito de sódio 0,5%, conforme técnica de Hussey e Barker (1973). Foram colocadas, então, aproximadamente, 3 g de caulim por tubo, realizando-se a limpeza dos ovos pela técnica de Coolen e Herde (1972). Os ovos retidos na peneira de 0,025 mm foram recolhidos em béquer de 500 mL, utilizando-se pisseta contendo água destilada. Para a obtenção dos J2 foi utilizada uma câmara de eclosão formada com tela colocada num funil de vidro.

2.2 Obtenção do extrato aquoso de alho

Bulbilhos de alho do grupo Roxo, subgrupo Nobre, produzidos em Mendoza, na Argentina, foram descascados e triturados em liquidificador com água destilada por 1 minuto e 30 segundos. O extrato, assim obtido, foi diluído em água destilada e esterilizada conforme as necessidades de cada ensaio.

2.3 Obtenção do macerado sem água de alho

Bulbilhos de alho comercializado em Lavras, MG, foram descascados e esmagados em esmagador de alho de cozinha e empregados imediatamente nos ensaios.

2.4 Compostos diluídos em água a partir de macerado aquoso de alho

2.4.1 Imobilidade e mortalidade de juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita*

Foram colocados em placas de Petri de 5 cm de diâmetro, 1 mL de suspensão contendo 100 J2 recentemente eclodidos juntamente com 7 mL do extrato de alho nas concentrações de 5, 10, 20 e 40 g/L de água esterilizada. Como controle, utilizou-se água no lugar do extrato de alho. O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado em fatorial (2X4) com 4 repetições (placas): [2 (placas seladas com parafilm e placas não seladas com parafilm) X 4 (dosagens) X 4 (repetições)]. Todas as placas foram mantidas em câmara de crescimento a 28°C. Quarenta e oito horas após, avaliou-se o número de J2 imóveis e mortos. À suspensão de J2 imóveis adicionou-se NaOH 1M conforme metodologia descrita por Chen e Dickson (2000), caracterizando-se, assim, os J2 mortos.

2.4.2 Eclusão de J2 de *M. incognita* em extrato aquoso de alho

Ovos de *M. incognita* foram colocados em 8 mL de extrato aquoso de alho nas concentrações de 5, 10, 20 e 40 g/L de água esterilizada em placas de Petri com 5cm de diâmetro, formando câmaras de eclusão que foram mantidas em temperatura de 28°C. Como controle, os ovos foram colocados em água pura. O experimento foi feito em delineamento inteiramente casualizado, com 8 repetições. O número de J2 eclodido foi contado a cada 24 horas durante 14 dias, em microscópio de objetiva invertida. A cada dia foi feita, também, a substituição do extrato de alho das placas por outro extrato que foi produzido no dia da montagem do experimento.

2.4.3 Mortalidade de J2 de *M. incognita* em extrato aquoso de alho estocado por 21 dias

Extrato aquoso de alho nas concentrações de 5 e 20g/L foram armazenados em garrafas plásticas tipo “PET” durante 21 dias. A seguir, sete mL desses extratos foram colocados em placas de Petri de 5 cm de diâmetro e adicionado 1mL de suspensão contendo, aproximadamente, 100 J2 vivos. Como controle, foi colocado água na placa em substituição ao extrato aquoso de alho. O delineamento empregado foi inteiramente casualizado com 8 repetições (placas). As placas foram incubadas em câmara de crescimento a 28°C por 48 h. A seguir, contou-se o número de J2 imóveis e móveis. Empregando-se técnica de Chen e Dickson (2000) estimou-se o número de J2 mortos dentre aqueles imóveis.

2.5 Compostos orgânicos voláteis (COVs) de alho a *Meloidogyne incognita*

Utilizaram-se no estudo de COVs de alho as técnicas desenvolvidas por Fernando et al. (2005) em que se usam placas bipartidas e por Botelho et al. (2011) em que se usam tubos Supelco™ SPME. Foram estudados os COVs liberados pelo extrato aquoso e macerado seco.

2.5.1 Mortalidade de J2 de *M. incognita* por COVs liberados por extrato aquoso de alho empregando placas bipartidas

Extrato aquoso de alho na concentração de 5, 10, 20 ou 40 g/L foi colocado em um dos compartimentos de placa de Petri de plástico bipartida com 9 cm de diâmetro pela técnica de Fernando et al. (2005). No compartimento contíguo foi colocado 1 mL de suspensão com 100 J2. O delineamento do

experimento foi inteiramente casualizado com 8 repetições. Como controle, foi colocado água no lugar de extrato de alho. As placas foram incubadas em câmara de crescimento a 28°C. Após 48 h foi feita a avaliação. Para isto, a suspensão foi colocada em placa Elisa e contados os J2 imóveis e mortos. A mortalidade entre os J2 imóveis foi definida pelo teste de NaOH seguindo técnica de Chen e Dickson (2000).

2.5.2 Mortalidade de J2 de *M. incognita* por COVs liberados por alho macerado sem água empregando placas bipartidas

Alho macerado sem água nas quantidades de 2, 4, 6 ou 8 gramas foi colocado em um dos compartimentos da placa bipartida. No compartimento oposto foi colocado 1mL de suspensão com 100 J2. Como controle, foi colocado em um dos compartimentos apenas a suspensão de J2. A placa, então, foi selada com parafilm. O delineamento foi inteiramente casualizado com 5 repetições. Após 24 horas foram contados os J2 móveis e imóveis. A mortalidade dentre os J2 imóveis foi avaliada utilizando-se a técnica de Chen e Dickson (2000), com NaOH 1M.

2.5.3 Mortalidade e imobilidade de J2 de *M. incognita* por COVs liberados do alho macerado sem água e do extrato aquoso empregando tubos Supelco™ SPME

Foi utilizada técnica descrita por Botelho et al. (2011) (Figura 1) modificada, para avaliação de voláteis de órgãos vegetais, já que a técnica original foi desenvolvida para COVs de solo. Na superfície da camada de 25 g de areia seca e ao lado do microtubo enterrando até sua metade (Figura 1D e E), colocaram-se 2, 4, 6 ou 8 gramas de alho macerado sem água ou alho macerado

com adição de água esterilizada 1:1 (1 grama de alho para 1 mL de água) formando o extrato aquoso de alho. Como controle foi preparado o tubo Supelco™ SPME apenas com areia e o microtubo. Colocou-se no microtubo de cada tubo Supelco™ SPME, aproximadamente, 100 juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita* em 1 mL de suspensão no mesmo dia em que o ensaio foi montado (Figura 1F a H). Os frascos foram, então, vedados com tampa rosqueada metálica, revestida internamente por uma película de silicone ligando a tampa metálica ao frasco, garantindo vedação total (Figura 1 A a C). O ensaio foi montado em delineamento inteiramente casualizado em fatorial (2X5) com 4 repetições: [2 (alho macerado sem água e extrato aquoso) X 5 (dosagens) X 4 (repetições)]. Vinte e quatro horas e quarenta e oito horas após, avaliou-se o número de J2 imóveis e móveis. A mortalidade, dentre os imóveis, foi avaliada empregando-se a técnica de Chen e Dickson (2000) utilizando-se NaOH 1 M.

2.5.4 Mortalidade de J2 de *M. incognita* por COVs liberados do alho macerado sem água em tubos Supelco™ SPME com areia seca e molhada

Foi utilizada técnica descrita por Botelho et al. (2011) (Figura 1). Em frasco Supelco™ SPME colocaram-se 25 g de areia lavada e seca, ou areia úmida a 80% da capacidade de campo utilizando-se água esterilizada após 20 minutos a 120°C sob pressão de 1 kgf/cm². No centro, enterrado até a sua metade, colocou-se um microtubo Eppendorf (1,5 mL de capacidade). Na superfície da camada da areia seca ou molhada e ao lado do microtubo, colocaram-se 2, 4, 6 ou 8 gramas de alho macerado sem água. Como controle utilizou-se apenas areia seca ou areia molhada e o microtubo enterrado até sua metade. Colocaram-se no microtubo, dentro de cada tubo, aproximadamente 100 J2 de *M. incognita* em 1 mL de suspensão no mesmo dia em que o ensaio foi montado. Os frascos foram, então, vedados com tampa rosqueada. O ensaio foi

montado em delineamento inteiramente casualizado em fatorial (2X4) com 3 repetições [2 (areia molhada e areia seca) X 4 (dosagens) X 3 (repetições)]. Vinte e quatro horas e quarenta e oito horas após, avaliou-se o número de J2 mortos. A mortalidade, foi avaliada empregando-se a técnica de Chen e Dickson (2000) utilizando-se NaOH 1 M.

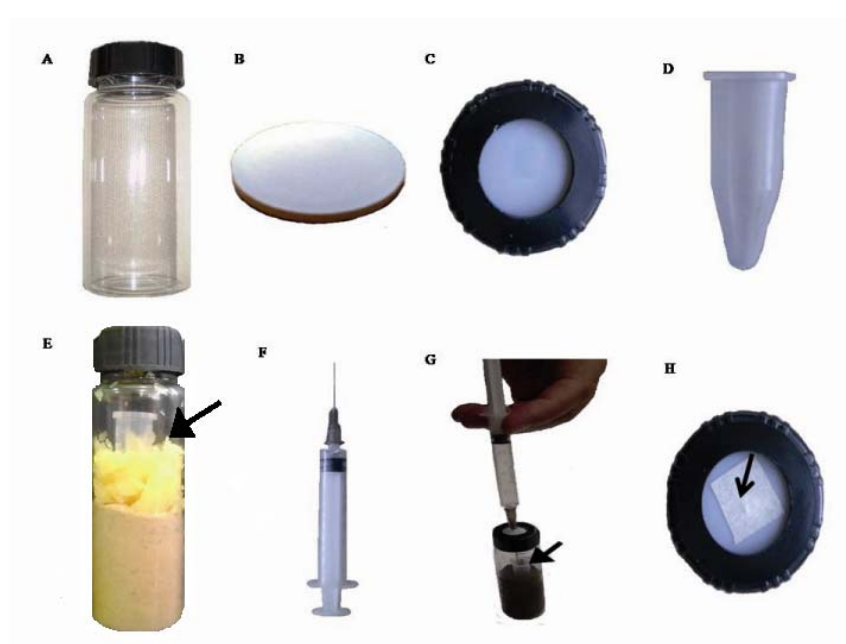


Figura 1 Material usado na avaliação de voláteis de macerados de alho. A) frascos Supelco™ SPME; B) película de silicone; C) tampa metálica expondo, no topo, a película de silicone; D) tubos Eppendorf; E) frasco com areia, alho macerado e J2, pronto para o bioteste de voláteis de alho tóxicos; F) seringa para injeção da suspensão de juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita*; G) injeção da suspensão de juvenis de segundo estágio (J2); H) selagem com fita adesiva do orifício de perfuração do silicone pela seringa. Seta em E: indica o alho macerado; em G: injeção da suspensão no interior do microtubo Eppendorf e em H: indica a fita adesiva sobre orifício feito pela agulha

2.5.5 Mortalidade e imobilidade de J2 de *M. incognita* por COVs liberados pelo alho macerado sem água e estocado empregando tubos Supelco™ SPME

Utilizou-se, também, a técnica modificada de Botelho et al. (2011), porém, substituindo o solo por areia, pois a técnica foi desenvolvida para estudos de COVs de solo.

Com o objetivo de avaliar a mortalidade e imobilidade de J2, quanto a diferentes tempos de estocagem dos COVs de alho, dois gramas de alho macerado sem água foram colocados na superfície da camada de areia ao lado do microtubo e em tubos Supelco™ SPME. Os tubos foram vedados e estocados em câmara de crescimento a 28°C nos tempos de 3, 6 e 12 dias. No terceiro dia de estocagem, injetou-se 1 mL de uma suspensão aquosa com, aproximadamente, 100 J2 no microtubo. Esse procedimento foi feito no sexto e no décimo segundo dia para os tubos correspondentes de cada tratamento (diferentes tempos). Como controle, empregou-se frasco apenas com areia (sem alho). O delineamento foi inteiramente casualizado com 4 repetições. Após 24 e 48 horas contou-se o número de J2 móveis e imóveis. A mortalidade entre os J2 imóveis foi definida empregando NaOH de acordo com a técnica descrita por Chen e Dickson (2000).

2.5.6 Eclosão de J2 de *M. incognita* por COVs liberados pelo alho em tubos Supelco™ SPME

Utilizou-se, também, a técnica modificada de Botelho et al. (2011). Para isto, o alho foi macerado sem água e em água esterilizada 1:1 (1 grama de alho para 1 mL de água). Na superfície da camada de areia lavada e seca e ao lado do microtubo colocaram-se 2, 4, 6 ou 8 gramas de alho macerado sem água ou em

água. No microtubo de cada tubo colocaram-se, aproximadamente, 500 ovos de *M. incognita* em 1 mL de suspensão em água. Os tubos foram vedados e mantidos a 28°C em câmara de crescimento. O delineamento foi estabelecido no delineamento inteiramente casualizado. Sete dias após, foi avaliado o número de J2 eclodidos e calcularam-se as porcentagens de eclosão e de redução da eclosão.

2.6 Desenvolvimento embrionário dentro dos ovos

Após a exposição dos ovos aos COVs dos macerados a seco e aquoso do alho do experimento anterior (teste de eclosão de J2) avaliaram-se as fases do desenvolvimento embrionário dentro dos ovos não eclodidos. Para isso, 100 ovos foram escolhidos ao acaso e estimou-se o número deles nas fases: Fase 0= ovos na fase unicelular, embriões mortos ou anormais, Fase A = 2 células, Fase B = 4 células, Fase C = multicelular, Fase D = gástrula, Fase E = tadpole e Fase H = ovos com juvenil formado. Esta avaliação foi repetida, ao acaso, por 3 vezes e calculada a média que foi utilizada como resultado de cada repetição. Os dados obtidos das fases A, B e C foram agrupados em MC (multiplicação celular), bem como os obtidos nas fases D e E em DE (desenvolvimento embrionário).

Todos os ensaios foram repetidos por 2 a 3 vezes.

2.7 Análise dos dados e estatística

os valores foram submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Scott e Knott (1974) a 5% de significância. Para tanto, empregou-se o programa SISVAR. Também se usou em alguns ensaios a análise de regressão.

3 RESULTADOS

3.1 Efeito dos compostos do alho diluídos em água a partir de macerado aquoso em *Meloidogyne incognita*

O extrato aquoso de alho apresentou toxicidade progressiva reduzindo a mobilidade e aumentando a mortalidade de juvenil de segundo estágio (J2) de *M. incognita*, de acordo com o aumento da concentração de alho no extrato em placas mantidas seladas ou não com parafilm, sendo mais elevada a toxicidade nas placas seladas, porém, igualaram-se na concentração mais elevada dos extratos testados chegando a 100% de mortalidade dos J2 (Gráfico 1A e B). Da mesma forma, a eclosão foi reduzida, significativamente, com o aumento da dose de alho no extrato igualando-se nas maiores doses (10- 40 g/L com 96% de redução da eclosão) (Gráfico 1 C). Quando o extrato aquoso foi estocado por 21 dias, os compostos aumentaram, significativamente, a mortalidade com o aumento da concentração do alho no extrato comparados com o controle chegando a 98% de mortalidade na maior dose (Gráfico 1D).

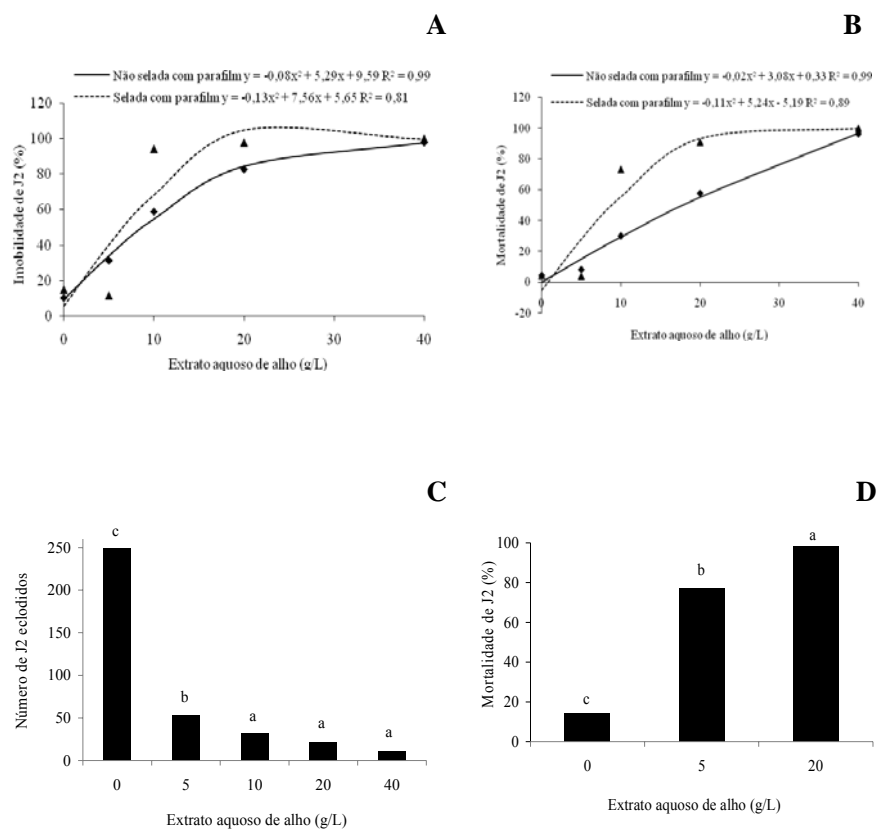


Gráfico 1 Toxicidade de compostos diluídos em água a partir do extrato aquoso de alho a juvenis de segundo estágio (J2) e inibição da eclosão de J2 de *Meloidogyne incognita*. Imobilidade (A) e mortalidade (B) de J2 por várias concentrações de alho em placas seladas ou não com parafim avaliadas 48 horas após a exposição à suspensão do extrato. Eclosão de J2 (C) por extrato aquoso de alho. Mortalidade de J2 (D) por extrato aquoso de alho estocado por 21 dias. Barras com mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade

3.2 Efeito dos compostos orgânicos voláteis do alho em *Meloidogyne incognita*

Estudos preliminares foram realizados, utilizando-se a técnica de Fernando et al. (2005) (placas bipartidas) e observou-se que tanto o extrato aquoso como o macerado sem água de alho liberaram componentes orgânicos voláteis (COVs) tóxicos a J2 de *Meloidogyne incognita*. Embora as concentrações dos macerados colocados nas placas sejam diferentes, observou-se de imediato menor atividade nematicida do extrato aquoso comparado com o macerado sem água. O macerado sem água causou alta mortalidade (100 %) desde a menor dose testada (Gráfico 2B) enquanto no extrato aquoso o aumento foi progressivo e lento, chegando à maior dose testada a 17% (Gráfico 2A).

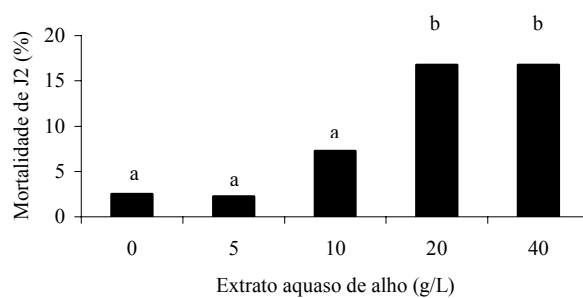
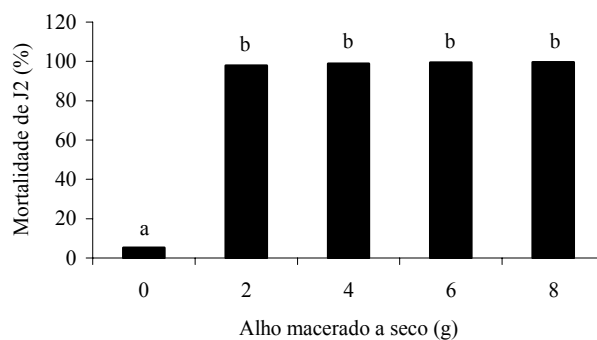
A**B**

Gráfico 2 Toxicidade de compostos orgânicos voláteis (COVs) liberados por extrato aquoso de alho e por alho macerado sem água a *Meloidogyne incognita* empregando-se placas bipartidas: Mortalidade (A) de juvenis de segundo estágio (J2) por COVs liberados por extrato aquoso de alho. Mortalidade (B) por COVs liberados pelo alho. Barras com mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade

Decidiu-se, então, realizar um estudo comparativo entre macerado sem água e com água utilizando-se a técnica de Botelho et al. (2011) e as mesmas concentrações de alho macerado. No macerado sem água, tanto a mortalidade como a imobilidade foram mais elevadas comparadas com o macerado aquoso, principalmente, nas menores dosagens. Na avaliação feita em 48 horas de exposição aos COVs, a menor dosagem do macerado sem água (1 g) a mortalidade chegou a 96%, enquanto no extrato aquoso (1g/1 mL de água) foi de 35%. Maior mortalidade e imobilidade foram observadas nas avaliações de 48 horas de exposição dos J2 aos COVs comparada com 24 horas. A porcentagem de J2 mortos foi sempre menor do que os imóveis em qualquer dose ou tempo de exposição (Gráfico 3 A, B, C e D). Os COVs das doses 6 e 8 gramas de alho em extrato aquoso em 48 horas causaram mortalidade semelhante ao macerado sem água e maior ($P \leq 0,05$) do que os demais testados. Porém, no macerado sem água apenas os COVs da dose mais baixa (1 g) causaram mortalidade de J2 menor ($P \leq 0,05$) do que os demais testados (Gráfico 3D). No controle a imobilidade e mortalidade de J2 em 24 horas foram em média de 3,5% e 1,25% respectivamente. No período de 48 horas as médias de imobilidade e mortalidade do controle foram de 2,75% e 2,25%, respectivamente.

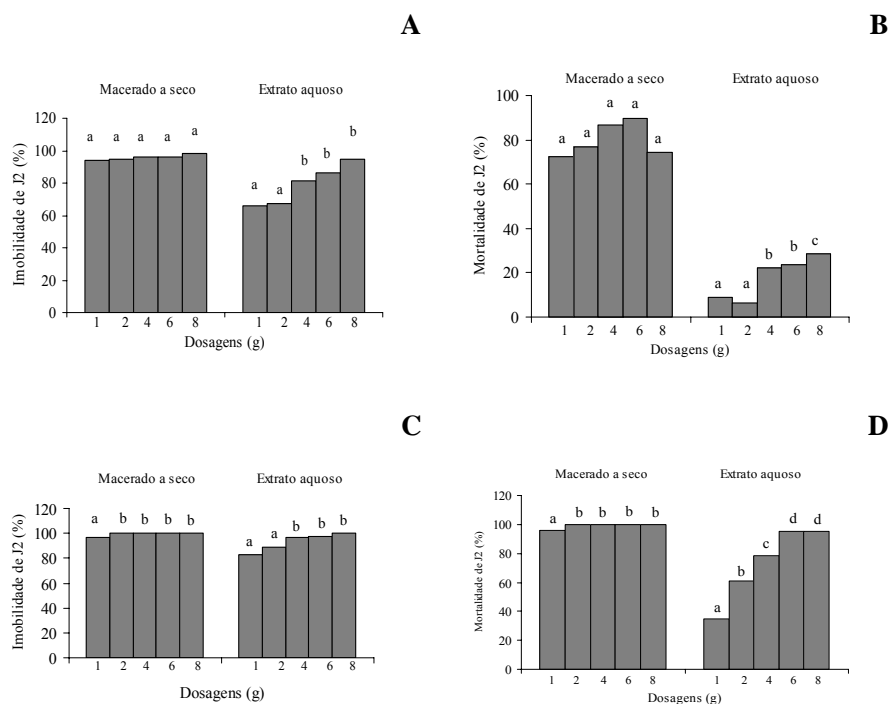
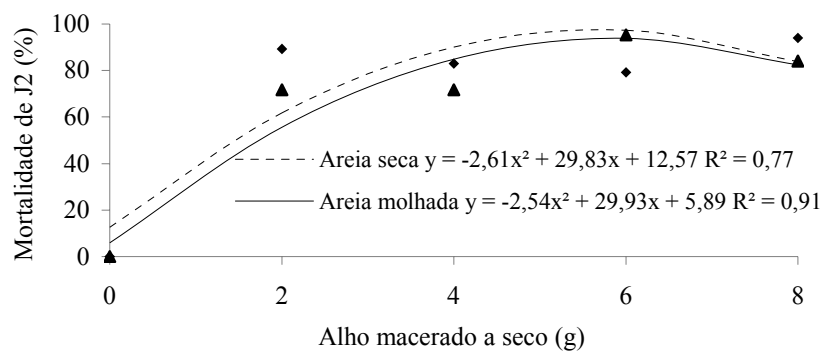


Gráfico 3 Toxicidade de compostos orgânicos voláteis (COVs) liberados por extrato aquoso de alho e macerado sem água em dois tempos de exposição dos juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita* (24 e 48 horas). Imobilidade (A) e mortalidade (B) de J2 avaliados após 24 horas após de exposição dos J2 aos COVs. Imobilidade (C) e mortalidade (D) de J2 avaliados após 48 horas de exposição dos J2 aos COVs. Barras com mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade

Como a umidade foi fator importante na diminuição da capacidade nematicida do macerado de alho, testou-se, então, o efeito na mortalidade de J2 da areia seca ou molhada (80 % da capacidade de campo) que se usa como suporte para o microtubo na técnica de Botelho et al. (2011). Embora o efeito não tenha sido significativo, houve um aumento gradativo da mortalidade, de acordo com as doses, igualando-se na maior dosagem (Gráfico 4).

Como a atividade nematicida do extrato aquoso se manteve elevada com 21 dias de estocagem, decidiu-se testar a estocagem dos COVs. Observou-se que os COVs estocados por 3, 6 e 12 dias mantêm alta mortalidade e imobilidade de J2 expostos por 48 horas (91 – 97%). Entretanto, os J2 expostos em COVs por 24 horas tiveram alta mortalidade com 3 dias de estocagem (91%) e queda significativa aos 6 (44%) e 12 dias (57%) (Gráfico 5 A, B e C). No controle, a imobilidade e mortalidade médias foram de 3 e 1,5%, respectivamente.

A



B

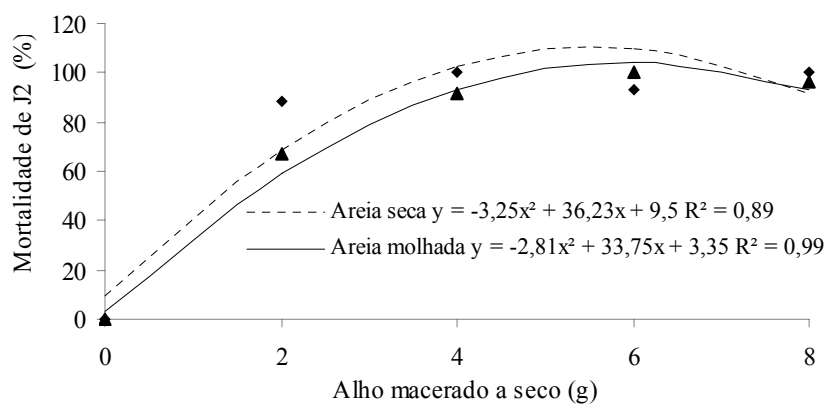


Gráfico 4 Toxicidade de compostos orgânicos voláteis (COVs) liberados por macerado de alho a seco colocado na superfície da areia molhada e de areia seca dentro de tubo SupelcoTM SPME a juvenil de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita*. Mortalidade de J2 avaliada com 24 horas (A) e com 48 horas (B) de exposição aos COVs

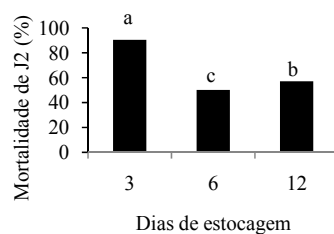
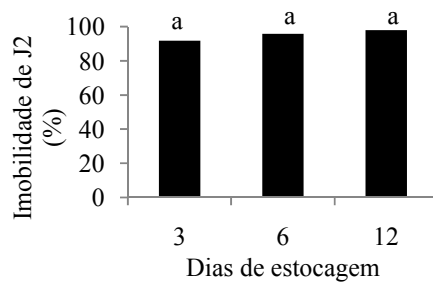
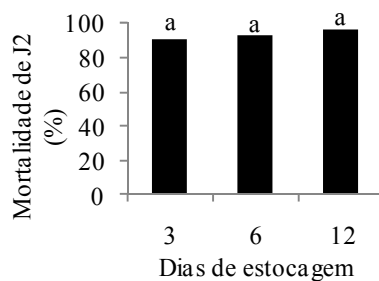
A**B****C**

Gráfico 5 Toxicidade de compostos orgânicos voláteis (COVs) a partir de alho macerado sem água e armazenado em recipiente fechado por 3, 6 e 12 dias em tubos SupelcoTM SPME avaliado com juvenis de segundo estágio (J2) expostos por 24 (A) e 48 horas (B e C). Mortalidade (A) de J2 avaliados com 24 horas após a introdução no microtubo. Imobilidade (B) e mortalidade (C) de J2 avaliados 48 horas após a introdução no microtubo. Barras com mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade

A exposição de ovos aos COVs emitidos pelo macerado de alho sem água ou aquoso não diferiram estatisticamente, no entanto, causaram redução semelhante ($P \leq 0,05$) na eclosão de 67 a 84% e significativa comparados com ovos não expostos aos COVs, porém, sem aumento significativo na inibição da eclosão pelo aumento da dosagem de alho no macerado (Tabela 1).

Tabela 1 Eclosão de juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita* a partir de ovos expostos a compostos orgânicos voláteis liberados por macerados de alho a seco e em água

Dosagens (g)	Alho macerado sem água		Extrato aquoso	
	Nº de J2 eclodido	% de Redução da eclosão	Nº de J2 eclodido	% de Redução da eclosão
0	125,5 Ab	0	125,5 Ab	0
2	34,0 Aa	72	41,0 Aa	67
4	29,75 Aa	76	30,25 Aa	76
8	19,25 Aa	84	29,25 Aa	77

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade

A análise dos ovos, após o período de 7 dias de exposição aos COVs, mostrou que apenas na fase de desenvolvimento do embrião (DE) ocorreu maior ($P \leq 0,05$) número de ovos comparado com o controle, quando se usou alho macerado sem água, porém, sem aumento significativo dos COVs encontrados nesta fase com o aumento das doses de alho no extrato. O número de ovos nas demais fases avaliadas (0, MC e H) não diferiram significativamente entre controle e doses de alho no extrato. Os COVs de alho macerado em água tiveram efeitos semelhantes nas fases 0 e H do desenvolvimento embrionário analisados e diferiram do controle nas fases DE e MC (Tabela 2)

Menos de 10% dos ovos permaneceram nas fases de multiplicação celular (MC) e entre 42 a 51% deles nas fases de desenvolvimento do embrião (DE) após a exposição aos COVs. Contudo, mesmo nos ovos não expostos aos

COVs a menor porcentagem deles foi, também, na fase de multiplicação celular e a maior em desenvolvimento embrionário (DE) (Tabela 2).

Tabela 2 Avaliação das fases do desenvolvimento embrionário dentro dos ovos de *Meloidogyne incognita* 7 dias após a exposição aos compostos orgânicos voláteis de alho macerado sem água e em água em diversas dosagens (g/L de água)

Alho macerado à seco				
Dosagens (g/L)	Fases (%)			
	0	MC	DE	H
0	31,75 Ba	9,25 Aa	35,75 Ba	23,25 Ba
2	20,50 Ba	6,25 Aa	46,75 Cb	26,50 Ba
4	23,25 Ba	6,75 Aa	47,25 Cb	22,75 Ba
8	17,25 Ba	7,00 Aa	48,00 Db	27,75 Ca
Alho macerado em água				
Dosagens (g/L)	Fases (%)			
	0	MC	DE	H
0	31,75 Ba	9,25 Ab	35,75 Ba	23,25 Ba
2	18,25 Ba	4,25 Aa	51,50 Cc	26,00 Ba
4	23,25 Ba	5,25 Aa	42,50 Cb	29,00 Ba
8	16,00 Aa	6,75 Aa	47,50 Cc	29,75 Ba

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade

Fase 0: ovos na fase unicelular, mortos ou anormais, **Fase MC:** multiplicação celular, **Fase DE:** gástrula + tadpole e **Fase H:** ovos com juvenil formado

4 DISCUSSÃO

O extrato aquoso do alho contém compostos que causam mortalidade de *Meloidogyne incognita* (AMARAL et al., 2002; GUPTA; SHARMA, 1991), os quais, também, causam imobilidade e redução na eclosão de *M. incognita*, demonstrado neste trabalho. Compostos encontrados no extrato de alho (aldeídos, sulfeto de alila e dissulfetos) são estáveis em solução aquosa por uma semana (BIANCHI et al., 1997). Ao que tudo indica, os compostos responsáveis pela toxicidade a *M. incognita* no extrato aquoso de alho encontrados neste trabalho, ainda não caracterizados, têm estabilidade em solução aquosa por 21 dias.

Além dos compostos em solução no extrato de alho, existem outros que se volatilizam e são tóxicos a *Meloidogyne incognita* como demonstrado neste trabalho, pois, a técnica empregada nos testes com os COVs permite contato com a suspensão de nematoides apenas pelo ar. Essa toxicidade pode estar relacionada à volatilização, entre outros compostos, da alicina que, também, é responsável pelo odor característico do alho (SLUSARENKO; PATEL; PORTZ, 2008), a qual tem atividade antifúngica (HUGHES; LAWREN, 1991) e antibacteriana (JONKERS; SLUIMER; STOBBERINGH, 1999). Porém, outros compostos presentes no alho como dialila, trissulfeto de dialila, ajoenos, álcool alila, têm propriedades antifúngicas e antivirais (HARRIS et al., 2001). Tariq e Magee (1990), verificaram que o extrato aquoso de alho reduz a germinação de microconídio e o crescimento hifal de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. Os compostos presentes no alho: sulfeto de dialila, dissulfeto de dialila e trissulfeto de dialila têm atividade nematicida contra o nematoide *Bursaphelenchus xylophilus* (PARK et al., 2005). O maior efeito nematicida e nematostático dos COVs do macerado sem água do alho, comparado ao extrato aquoso, indica que a volatilização direta a partir das células vegetais pelo macerado sem água evita

várias formas de inativação dos compostos, como solvatação, sorção e alterações causadas por reações químicas que ocorrem na presença da água (REZENDE et al., 2010).

Embora a exposição dos J2 aos COVs por 24 horas apresente efeitos nematocida e nematostático, os dados com a exposição por 48 horas são mais consistentes. Entretanto, isto indica que neste menor tempo de exposição (24 horas) o nível do componente tóxico que chega às células de J2 já foram eficazes na redução dos seus movimentos bem como no aumento da mortalidade. Os COVs são ativos em baixas concentrações (WHEATLEY, 2002). Presume-se, portanto, que menor exposição (24 horas) de J2 aos COVs resulte em menor nível dos componentes tóxicos que chegam à célula e desta forma o bioteste feito com J2 neste período de exposição (24 horas) torna-se eficaz na detecção de possíveis inativações de molécula no armazenamento. Por conseguinte, certa degradação dos COVs ocorrem no período de 6 e 12 dias de estocagem, porém, isto não ocorre com a toxicidade do extrato aquoso estocado por 21 dias a *M. incognita*.

A maior imobilidade dos J2 comparada com a mortalidade causada pelos COVs em todos os ensaios realizados indica que os órgãos sensoriais e todo o sistema nervoso são afetados pelos COVs antes da efetivação de reações letais como, talvez, a interrupção da cadeia de transporte de elétrons da respiração. Contudo, a imobilidade do J2 já vai afetar o tempo de conclusão do seu ciclo de vida e os danos nos órgãos sensoriais poderão impedir o reconhecimento do local da penetração no hospedeiro causando, por conseguinte, morte dos J2 por inanição.

A semelhança na inibição da eclosão entre os COVs do macerado sem água e aquoso contrapondo os dados com mortalidade e imobilidade de J2, indica que processos vitais são inativados com os COVs tóxicos do alho mesmo em menor concentração ao nível celular. Extrato de alho inibe a síntese de

lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos (ADETUMBI; JAVOR; LAU, 1986) e danifica membranas (GHANNOUM, 1988). Por conseguinte, ovos expostos aos COVs de alho podem ter inativação da multiplicação celular e do desenvolvimento do embrião e matar o juvenil formado, impedindo a eclosão, afetando assim, na mesma intensidade todas as fases envolvidas na formação do J2 dentro do ovo. De fato, neste trabalho, apenas o efeito na fase DE não explica toda a inibição da eclosão de J2 ocorrida no macerado sem água, pois, a retenção de ovos na fase DE foi de 6,75- 15,75% em relação ao controle e a inibição da eclosão de 72- 84% (Tabelas 1 e 2).

Com os resultados obtidos em todo o trabalho, pode-se verificar que tanto os COVs como os extratos de alho controlam o nematoide e a eclosão destes em testes realizados *in vitro*, no entanto, faz-se necessário pesquisar metodologias de aplicação dos COVs e do extrato em casa de vegetação e campo, além de identificar as moléculas ativas contra os nematoides para posterior isolamento destas e análise individual sobre o efeito na mortalidade e eclosão de *Meloidogyne incognita*.

5 CONCLUSÕES

- a) quanto maior a concentração do extrato, menor a mobilidade e maior a mortalidade de J2 de *Meloidogyne incognita*;
- b) extrato aquoso e COVs de alho causam alta redução na eclosão de J2 de *M. incognita*;
- c) extrato aquoso e macerado sem água de alho liberam compostos orgânicos voláteis (COVs) tóxicos a *M. incognita*, porém macerado sem água é muito mais tóxico desde baixas concentrações;
- d) os COVs de alho são mais eficientes no aumento da imobilidade e mortalidade no período de 48 horas do que no período de 24 horas.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Compostos orgânicos voláteis e extrato aquoso de alho apresentaram alta capacidade nematicida a *Meloidogyne incognita* em experimentos realizados em laboratório. A utilização de COVs e extrato de alho poderão, futuramente, ser mais uma alternativa de método de controle de nematoides empregado pelo agricultor. Diante dos resultados deste trabalho, faz-se necessário a busca por resultados similares em campo, com o desenvolvimento de metodologias que utilizem os COVs e/ou os extratos de alho e que impeçam o nematoide de concluir seu ciclo de vida. As identificações moleculares desses compostos que são ativos contra nematoides, também fazem-se necessárias, uma vez que, tendo o conhecimento das moléculas, é possível fazer uma análise individual delas sobre o efeito na mortalidade e eclosão de *M. incognita* e, posteriormente, utilizá-las em produtos comerciais naturais de fácil acesso a produtores.

REFERÊNCIAS

- ADETUMBI, M.; JAVOR, G. T.; LAU, B. H. S. *Allium sativum* (garlic) inhibits lipid synthesis by *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, London, v. 30, n. 3, p. 499-501, Sept. 1986.
- AMARAL, D. R. et al. Efeito de alguns extratos vegetais na eclosão, mobilidade, mortalidade e patogenicidade de *M. exigua* do cafeeiro. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 26, n. 1, p. 43-48, fev. 2002.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils: a review. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 42, n. 2, p. 446-475, Apr. 2008.
- BEGUM, S. et al. Pentacyclic triperpenoids from the aerial parts of *Lantana camara* and their nematocidal activity. **Chemistry and Biodiversity**, Weinheim, v. 5, n. 9, p. 1856-1866, Sept. 2008.
- BIANCHI, A. et al. Ultrastructural studies of the effects of *Allium sativum* on phytopathogenic fungi “*in vitro*”. **Plant Disease**, Quebec, v. 81, n. 11, p. 1241-1246, Nov. 1997.
- BOTELHO, A. O. et al. Fatores de supressividade a *M. exigua* na rizosfera cafeeira no campo: nova técnica para avaliação de compostos orgânicos voláteis tóxicos a fitonematoides. **Biological Control**, Orlando, 2011. In press.
- BUSKOV, S. et al. Effects of intact glucinolates and products produced from glucosinolates em myrosinase-catalyzed hydrolysis on the potato cyst nematode (*Globodera rostochiensis* cv. wall). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 50, n. 4, p. 690-695, Feb. 2002.
- CAMPOS, V. P.; SILVA, J. R. C. Management of *Meloidogyne* spp. in coffee plantations. In: SOUZA, R. M. (Ed.). **Plant-parasitic nematodes of coffee**. New York: Springer Science, 2008. p. 149-164.
- CHEN, S. Y.; DICKSON, D. W. A technique for determining live second-stage juveniles of *Heterodera glycines*. **Journal of Nematology**, Saint Paul, v. 32, n. 1, p. 117-121, Feb. 2000.
- CHITWOOD, D. J. Phytochemical based strategies for nematode control. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 40, p. 221-249, Sept. 2002.

CHOI, I. H. et al. Nematicidal activity of monoterpenoids against the pine wood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*). **Russian Journal of Nematology**, Moscow, v. 15, n. 1, p. 35-40, Mar. 2007.

COOLEN, W. A.; HERDE, C. J. **A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue**. Ghent: State Agriculture Research Centre, 1972. 77 p.

DAYAN, F. E.; CANTRELL, C. L.; DUKE, S. O. Natural products in crop protection. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 17, n. 12, p. 4022-4034, Dec. 2009.

EVANS, K.; TRUDGILL, D. L.; WEBSTER, J. M. **Plant parasitic nematodes in temperate agriculture**. Cambridge: CABI, 1993. 648 p.

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

GHANNOUM, M. A. Studies on the Anticandidal mode of action of *Allium sativum* (garlic). **Journal of General Microbiology**, London, v. 134, n. 7, p. 2917-2924, July 1988.

GUPTA, R.; SHARMA, N. K. Nematicidal properties of garlic, *Allium sativum*. **Indian Journal Nematology**, New Delhi, v. 21, n. 1, p. 14-18, June 1991.

HARRIS, J. C. et al. Antimicrobial properties of *Allium sativum* (garlic). **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 57, n. 3, p. 282-286, Oct. 2001.

HUGHES, B. G.; LAWSON, L. D. Antimicrobial effects of *Allium sativum* L. (garlic), *Allium ampeloprasum* (elephant garlic) and *Allium cepa* L. (onion), garlic compounds and commercial garlic supplement products. **Phytotherapy Research**, London, v. 5, n. 4, p. 154-158, Aug. 1991.

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

JONKERS, D.; SLUIMER, J.; STOBBERINGH, E. Effect of garlic on vancomycin resistant enterococci. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, London, v. 43, n. 12, p. 3045, Dec. 1999.

LAZZERI, L.; TACCONI, R.; PALMIERI, S. *In vitro* activity of some glucosinolates and their reaction products toward a population of the nematode *Heterodera Schachtii*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 41, n. 5, p. 825-829, May 1993.

LUC, M.; SIKORA, R. A.; BRIDGE, J. **Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture**. Cambridge: CABI, 2005. 871 p.

NEVES, W. S. et al. Atividade de extratos de alho (*Allium sativum*), mostarda (*Brassica campestris*) e pimenta malagueta (*Capsicum frutescens*) sobre a eclosão de juvenis de *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 29, n. 2, p. 273-278, 2005.

OKA, Y. et al. Nematicidal activity of essential oils and their components against root-knot nematodes. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 90, n. 7, p. 710-715, July 2000.

PARK, I. K. et al. Nematicidal activity of plant essential oils and components from ajowan (*Trachyspermum ammi*), allspice (*Pimenta dioica*) and litsea (*Litsea cubeba*) essential oils against pine wood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*). **Journal of Nematology**, College Park, v. 39, n. 3, p. 275-279, Mar. 2007.

_____. Nematicidal activity of plant essential oils and components from garlic (*Allium sativum*) and cinnamon (*Cinnamomum verum*) oils against the pine wood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*). **Journal of Nematology**, College Park, v. 7, n. 5, p. 767-774, May 2005.

REZENDE, D. C. et al. Compostos orgânicos voláteis fúngicos no controle de fitopatógenos. **RAPP**, São Paulo, v. 18, p. 276-302, 2010.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. Cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, Washington, v. 30, n. 3, p. 507-512, Sept. 1974.

SIKORA, R. A.; BRIDGE, J.; STARR, J. L. Management practices: an overview of integrated nematode management technologies. In: LUC, M.; SIKORA, R. A.; BRIDGE, J. **Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture**. Cambridge: CABI, 2005. p. 793-825.

SLUSARENKO, A. J.; PATEL, A.; PORTZ, D. Control of plant diseases by natural products: allicin from garlic as a case study. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 121, n. 3, p. 313-322, July 2008.

TARIQ, V. N.; MAGEE, A. C. Effect of volatiles from garlic bulb extracts on *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici. **Mycological Research**, Cambridge, v. 94, n. 5, p. 617-620, Sept. 1990.

WHEATLEY, R. E. The consequences of volatile organic compound mediate bacterial and fungal interactions. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 81, n. 11, p. 357-364, Nov. 2002.

ZASADA, I. A.; FERRIS, H. Sensitivity of *Meloidogyne javanica* and *Tylenchulus semipenetrans* to isothiocyanates in laboratory assays. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 93, n. 6, p. 747-750, June 2003.