



LILIANA ESTUPIÑAN LÓPEZ

**TORTA DE ALGODÃO EMITE COMPOSTOS
ORGÂNICOS VOLÁTEIS TÓXICOS A *Meloidogyne
incognita***

LAVRAS – MG

2014

LILIANA ESTUPIÑAN LÓPEZ

**TORTA DE ALGODÃO EMITE COMPOSTOS ORGÂNICOS
VOLÁTEIS TÓXICOS A *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

2014

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Estupiñan López, Liliana.

Torta de algodão emite compostos orgânicos voláteis tóxicos a
Meloidogyne incognita / Liliana Estupiñan López. – Lavras : UFLA,
2014.

54 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.

Orientador: Vicente Paulo Campos.

Bibliografia.

1. Torta de algodão. 2. Compostos orgânicos voláteis. 3.
Nematoides das galhas. I. Universidade Federal de Lavras. II.
Título.

CDD – 632.65182

LILIANA ESTUPIÑAN LÓPEZ
TORTA DE ALGODÃO EMITE COMPOSTOS ORGÂNICOS
VOLÁTEIS TÓXICOS A *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 19 de fevereiro de 2014.

Dr. Flávio Henrique Vasconcelos de Medeiros – UFLA.

Dr. Luiz Antonio Augusto Gomez – UFLA.

Dr. Vicente Paulo Campos

Orientador

LAVRAS - MG

2014

A Deus,

A Mery, minha mãe e Alvaro, meu pai, por todo amor incondicional, esforço, paciência e especialmente pela perseverança para conseguir o que sonhamos na vida, por serem constantes e apoiar as decisões que tomei na minha vida.

Aos meus irmãos Edinzon, Carolina e Santiago, pelo carinho e exemplo de vida.

À toda minha família e amigos.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Fitopatologia (DFP), pela realização do Mestrado.

Ao CNPq, pela bolsa do Programa Estudantes-Convênio de Pós-Graduação – PEC-PG, da CAPES/CNPq – Brasil.

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

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

Aos amigos do laboratório Aline, Arinaldo, Eduardo, Julio, William Livia, Lilian, Simone, Luma, Ana, Thaisa, Cleber e Tarley, por toda a dedicação, companheirismo e ajuda nos experimentos.

Aos meus amigos de aventuras, Jaqueline, Naldo e Aline, por serem mais que amigos, pelo acolhimento, pela ajuda e paciência.

Às minhas amigas Viviane, Stéfanny, Thaisa, Mariana e Ana Karla, por serem uma família.

Aos meus amigos compatriotas, pelo carinho e a união.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

Os sonhos se devem perseguir, lutar, chorar e conseguir, não se pode desistir enquanto continuam vivos no coração.

Torta de algodão emite compostos orgânicos voláteis tóxicos a *Meloidogyne incognita*

RESUMO

Embora a eficácia nematicida da torta de algodão aplicada em solos infestados por fitonematoides seja conhecida, ainda são quase desconhecidos os efeitos, nesses patógenos, de compostos orgânicos voláteis (COVs) emitidos por ela, após a aplicação no solo. Para estudar o efeito dos COVs em *Meloidogyne incognita* foram propostos experimentos, colocando-se em cada copo plástico 200 g. de solo natural, solo esterilizado ou substrato artificial misturado com torta de algodão nas concentrações de 0,0; 1,5; 3,0; 4,5 ou 6,0% e também com 3000 ovos de *M. incognita* (MI), por copo. No centro de cada copo foram aterrados dois microtubos de 1,5 mL até a metade. Os copos foram vedados hermeticamente com plástico Parafilm® e mantidos por 10 e 20 dias em casa de vegetação. Dois dias antes do término desses períodos, foram injetados com uma seringa, em um dos microtubos, 200 juvenis de segundo estágio (J2) e no outro 800 J2 de MI. Ambos os microtubos com J2 foram expostos por 48 horas aos COVs. Os 200 J2 de MI dos microtubos foram usados para avaliar a porcentagem de J2 móveis, imóveis e mortos. E os 800 J2 do outro microtubo foram inoculados em tomateiro. Após a retirada da cobertura plástica, plantaram-se mudas de tomateiro nos copos infestados com ovos de MI. Nos tomateiros avaliaram-se infectividade (nº. de galhas) e reprodutividade (nº. de ovos). A torta de algodão reduziu significativamente a infectividade e a reprodução a partir de ovos de MI presentes no solo (esterilizado ou não) e no substrato artificial em qualquer concentração de torta e tempo de exposição (10 ou 20 dias). Os COVs que formaram a câmara de gás na superfície dessa mistura

(solo ou substrato mais torta) causaram também imobilidade dos J2, em qualquer período de formação dessa câmara (10 e 20 dias) e na presença das diversas concentrações de torta. A mortalidade de J2 foi significativamente mais elevada do que no controle, variando de 17% a 67%. A infectividade e reprodução de J2 expostos aos COVs foram significativamente reduzidas comparadas ao controle, a partir da adição de 3,0% de torta. A torta de algodão além de apresentar efeitos nematicidas no solo infestado com MI, os COVs por ela emitidos são nematicidas e nematostáticos a esse patógeno.

Palavras-chave: Torta de algodão, COVs, Nematóide das galhas.

Cottonseed cake emite volatile organic compounds toxics to *Meloidogyne incognita*

ABSTRACT

Although the nematicidal efficacy of cottonseed cake applied to infested soils with plant parasitic nematodes is known, the effects of only volatile organic compounds (VOCs) emissions to *Meloidogyne incognita* (MI) is almost unknown. To study the effect of cottonseed cake VOCs on MI, experiments were proposed. Therefore two hundred grams of soil (natural or sterilized) or artificial substrate was mixed with cottonseed cake concentrations (0.0, 1.5, 3.0, 4.5 or 6.0%) and 3000 MI eggs and placed into plastics cups. In the center of surface mixture, two 1.5 mL microtubes were half digged. The cups were hermetically sealed with plastic Parafilm®, maintained in greenhouse by 10 and 20 days. Two days before ending those times periods (10 and 20 days) 200 second stage juveniles (J2) of MI were injected with a syringe into one of the microtubes and 800 J2 into another. Both microtubes with J2 were exposed for 48 hours to VOCs. The J2 200 MI of the microtubes were used to assess the percentage of J2 mobile, immobile and dead. And another microtube 800 J2 were inoculated on tomato plants. After removing the plastic cover, tomato seedlings were transplanted to each cup infested with MI eggs. Thereafter infectivity (n°. of galls) and reproduction (n°. of eggs) were evaluated in tomato roots. The cottonseed cake reduced significantly infectivity and reproduction from MI eggs, in infested soil (natural or sterilized) and in the artificial substrate in any cake concentration and exposition time (10 or 20 days). The VOCs that formed on the surface of gas chamber, caused J2 immobility every time period (10 and 20 days) and cake concentrations compared to control. The J2 mortality

was higher than controls varying from 17% to 67 %. The infectivity and reproduction in tomato infested from J2 exposed to VOCs were significantly reduced compared to the control when 3.0 % or more concentrated cake was used. The cottonseed cake besides nematicidal effects in MI infested soils or substrate, the VOCs liberated from it have nematicidal and nematostatic effect on MI.

Keywords: Cottonseed cake, VOCs, Root knot nematode

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1 Os nematoides de galhas (<i>Meloidogyne</i> spp)	16
2.2 Controle de fitonematoides	17
2.2.1 Incorporação de matéria orgânica no controle de nematoides .17	
2.2.2 Incorporação de tortas no controle de fitonematoides	19
2.2.3 Torta de algodão no controle de fitonematoides	20
2.3 Compostos orgânicos voláteis	21
3 MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1 Obtenção de ovos e juvenis de segundo estágio de <i>Meloidogyne incognita</i>	24
3.2 Obtenção dos solos e substrato e determinação da umidade pelo índice da capacidade de campo (cc)	24
3.3 Montagem dos experimentos	25
3.3.1 Ovos de <i>Meloidogyne incognita</i> misturados ao solo natural, solo esterilizado ou substrato e vedação hermética dos copos.	25
3.3.2 Imobilidade e mortalidade dos juvenis de segundo estágio de <i>Meloidogyne incognita</i> pelos compostos orgânicos voláteis na câmara de gás na superfície dos copos.....	26
3.3.3 Infectividade de ovos de <i>Meloidogyne incognita</i> misturados à torta de algodão e ao solo ou substrato em tomateiro.....	27
3.3.4 Infectividade de Juvenis de segundo estágio de <i>M. ingconita</i> após exposição aos COVs.....	29

4	RESULTADOS.....	30
4.1	Ovos de <i>Meloidogyne incognita</i> misturados ao solo ou substrato com torta de algodão em ambiente hermético.	30
4.2	Toxicidade dos compostos orgânicos voláteis retidos na superfície dos solos e do substrato a juvenis de segundo estágio pelo fechamento hermético dos recipientes.	35
4.3	Infectividade dos juvenis de segundo estágio e reprodução após exposição à câmara de gás formada na superfície do recipiente hermeticamente fechado.	39
5	DISCUSSÃO.....	43
6	CONCLUSÕES	47
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	48

1. INTRODUÇÃO

Os nematoides habitam a Terra há milhões de anos, constituindo uma das mais antigas formas de vida existentes neste planeta, tendo desenvolvido um diversificado hábito alimentar. Nesse grupo, destacam-se os fitonematoides, os quais se alimentam de plantas, podendo causar perda total da produção, sob condições de alta densidade populacional, em cultivares suscetíveis e em condições ambientais favoráveis (TIHOHOD, 2000).

Os nematoides do gênero *Meloidogyne*, um dos mais disseminados no Brasil e de maior importância econômica, têm o seu controle dificultado pela alta capacidade reprodutiva, ampla gama de hospedeiros e sua adaptação a diferentes condições e ecossistemas (FERRAZ, 1985).

Os compostos orgânicos voláteis (COVs) são emitidos por plantas e diversos microorganismos (DUDAREVA et al., 2006; CAMPOS; PINHO; FREIRE, 2010). Muitos deles, produzidos por fungos e bactérias, apresentam efeitos nematicidas e nematostáticos contra fitonematoides (GU et al., 2007; FREIRE et al., 2012). Por outro lado, COVs produzidos por plantas têm seus efeitos nematicidas e nematostáticos nos fitonematoides pouco estudados, destacando-se os efeitos nematicidas dos isotiocianatos produzidos pela degradação dos glucosionolatos dos tecidos de *Brassicas* (BROWN; MORRA, 2005) e da alisina dos tecidos de alho (SLUSARENKO; PATEL; PORTZ, 2008).

Para o controle de fitonematoides, muitos compostos nematicidas têm sido isolados e identificados a partir de plantas (CHITWOOD, 2002), o que tem justificado o uso de extratos de plantas, adubação verde ou biofumigação no controle desses patógenos. Por exemplo, o uso de resíduos de plantas da família

Asteraceae no controle de fitonematoides tem sido relatado em vários estudos (OKA, 2009). E a folhagem de *Tagetes patula* incorporada ao solo para controle de nematoides, principalmente em áreas infestadas por *Pratylenchus* spp. e *Meloidogyne* spp. tem reduzido a infecção desses nematoides em plantas (PLOEG, 2000). Por conseguinte, agricultores têm utilizado adubos orgânicos no controle de fitonematoides, dentre eles estão aqueles que são subprodutos gerados da extração de óleos de mamona, pinhão manso, algodão e girassol (LOPES, 2009). Esses resíduos vegetais (tortas) são ricos em nitrogênio, fósforo e potássio, e também possuem substâncias tóxicas a nematoides como o gossipol, presente no algodão, a ricina na mamona e a curcucina, além do éster de forbol no pinhão manso (LOPES, 2009). Outras moléculas também têm sido encontradas em outras plantas como tetranortriterpenóide azadiractina (não volátil) produzida pelo nim e isotiocianatos (volátil), resultantes da hidrólise dos glucosinolatos, produzidos por algumas espécies de *Brassicas* (BROWN; MORRA, 2005).

Dentre as várias pesquisas realizadas em diferentes culturas sobre o uso de tortas vegetais no controle de fitonematoides, destacam-se aquelas que, quando incorporadas ao solo reduzem galhas e massas de ovos. Dentre as tortas mais estudadas encontram-se as obtidas de nim, gergelim, linhaça e algodão, com redução em até 90.1% de galhas e 98.5% de massas de ovos de *M. incognita* (IBRAHIM et al., 2007).

Apesar de a torta de algodão ter demonstrado eficiência no controle de fitonematoides no campo, quando aplicada em várias culturas por eles infestados (BADRA; SALEH; OTEIFA, 1979; RAMACHANDRAN et al., 2007; IBRAHIM et al., 2007; MEENA; NEHRA; TRIVEDI, 2009; MOHAN et al., 2011), ainda não se pesquisou o efeito isolado dos COVs emitidos após a sua

incorporação ao solo, quanto à toxicidade a fitonematoides. Por isso, objetivou-se, neste trabalho, estudar o efeito direto e conjunto de fatores (biofumigação e exposição aos COVs), misturando torta de algodão no solo infestado com ovos de *Meloidogyne incognita*; bem como o efeito dos COVs emitidos por essa mistura e capturados, em câmara de gás na superfície do copo, na toxicidade desses patógenos.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Os nematoides de galhas (*Meloidogyne spp*)

Dentre as espécies que causam grandes prejuízos à agricultura, no mundo, estão *M. incognita* (Kofoid & White) Chitwood, *M. javanica* (Treub) Chitwood e *M. arenaria* (Neal) Chitwood, que são altamente polífagas e se reproduzem por partenogênese mitótica, *Meloidogyne incognita* e *M. javanica* ocorrem, com frequência, nos solos com culturas, nas regiões temperadas e tropicais (SASSER, 1979).

M. incognita é capaz de parasitar mais de 2.000 espécies de plantas (SASSER, 1980) que incluem a maioria das culturas de exploração agrícola e também ervas daninhas, entre elas estão feijão, couve, melão, cenoura, aipo, acelga, milho, algodão, pepino, dente-de-leão, berinjela, alface, malva, quiabo, cebola, pêssego, pimenta, banana, batata, abóbora, beldroegas, rabanete, sorgo, soja, espinafre, abóbora, beterraba, cana-de-açúcar, batata-doce, tabaco, tomate, nabo, e melancia (TIWARI; EISENBACK; YOUNGMAN, 2009).

2.2 Controle de fitonematoides

O manejo de fitonematoides é baseado principalmente em tratamentos químicos. Porém, devido à alta toxicidade ao ambiente e mamíferos, como o brometo de metila, carbofuran, aldicarb, entre outros, poucos nematicidas químicos permanecem no mercado (MOHAN et al., 2011).

2.2.1 Incorporação de matéria orgânica no controle de nematoides

Os compostos orgânicos apresentam menor eficácia no controle quando comparado aos químicos, pois as moléculas tóxicas a fitonematoides, como ácidos graxos voláteis, amônio e sulfeto de hidrogênio, são geradas lentamente após a decomposição do material vegetal. No entanto, a incorporação de matéria orgânica, além de disponibilizar nutrientes, aumenta a biomassa de microrganismos o que pode contribuir para a redução das populações de fitopatógenos no solo (MOHAN et al., 2011).

A diminuição da população de nematoides pelo uso de matéria orgânica envolve vários modos de ação, entre eles, o favorecimento da microflora antagonista ao nematoide, a liberação de fitoquímicos secundários, como compostos nematicidas, além de aumentar a capacidade da planta em resistir ao parasitismo. Contudo, um dos problemas que existe no uso da matéria orgânica é a inconsistência no controle, devido ao tipo de solo e sua origem. Para o controle de fitonematoides têm sido isolados compostos de plantas, porém, são poucas as

plantas conhecidas que contêm essas substâncias usadas no controle desses fitopatógenos, comercialmente (OKA, 2010).

Plantas que contêm compostos nematicidas, quando usadas em rotação de cultura ou incorporadas ao solo, podem ser mais eficazes no controle de nematoides do que aquelas não hospedeiras e que não possuem compostos nematicidas (HALBRENDT, 1996). Entre as plantas que contêm compostos nematicidas encontra-se o nim (*Azadirachta indica*), conhecida pelas propriedades medicinais e pesticidas. Essa planta é usada como nematicida e inseticida, na forma de tortas, óleos e folhas incorporadas ao solo, entre outras. Os limonoides encontrados no nim são os responsáveis pelo controle, sendo o limonoide mais importante a azadiradictina (OKA, 2010). Porém, outros compostos nematicidas também já foram isolados de plantas astereaceas, como *Tagetes* que contêm politienil, especialmente o α -tertienil. Essa astereacea é usada na rotação de culturas para o controle de *Pratylenchus* spp e *Meloidogyne* spp. No entanto, têm sido usadas muitas plantas em experimentos, em pequena escala, para o controle de fitonematoides, contudo, não se conhecem os seus compostos químicos tóxicos. Existem algumas plantas que não possuem compostos nematicidas preexistentes, mas com a degradação, após a incorporação ao solo, geram-se esses compostos fitoquímicos, especialmente os que contêm alto teor de nitrogênio. Entre esses compostos encontrados no solo após a decomposição, encontram-se os derivados de glucosinolatos, ácidos orgânicos, compostos nitrogenados, entre outros (OKA, 2010).

2.2.2 Incorporação de tortas no controle de fitonematoides

Resíduos de culturas têm sido usados como matéria- prima em bioprocessos como em bioremediação, biopesticidas, além de serem usados na indústria para produção de aminoácidos, enzimas, ácidos orgânicos, entre outros. Outro subproduto são as tortas orgânicas que resultam do processo de extração de óleos a partir de sementes (RAMACHANDRAN et al., 2007).

Essas tortas podem ser classificadas como comestíveis e não comestíveis. Dentre as tortas não comestíveis encontram-se a torta de nim e a torta de mamona, usadas na agricultura como fertilizantes devido ao alto teor de nitrogênio, fosforo e potássio, além de serem usadas no controle de nematoides, insetos e outros parasitas do solo (RAMACHANDRAN et al., 2007). As comestíveis são usadas principalmente na alimentação de animais.

Como agentes no biocontrole têm sido usadas as tortas de nim e de mamona para o controle de fungos fitopatogênicos como *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani*, *Phyllosticta phaseolina*, *Fusarium oxysporum* f. *ciceri*. Porém, por serem substratos ricos em microelementos alguns autores observaram o aumento de microrganismos saprófitas. Também essas tortas têm sido usadas no controle dos fitonematoides como *M. incognita*, *Rotylenchulus reniformis*, *Tylenchorhynchus brassicae*, *Helicotylenchus indicus* (RAMACHANDRAN et al., 2007).

Mahmoud e Wafaa (2004) observaram redução de 48,1 a 88,8% no número de galhas e de 20 a 80% de massas de ovos quando a torta de gergelim foi incorporada a 15 g/vaso, plantado com abóbora e infestado por *M.incognita* comparado ao controle sem a incorporação da torta de gergelim.

2.2.3 Torta de algodão no controle de fitonematoides

Pela decomposição de tortas oleaginosas resultam compostos oxigenados, amônio, fenóis, aldeídos entre outros, os quais têm efeito nematocida. Alguns desses compostos são caracterizados pelas suas propriedades lipofílicas, que envolvem a degradação e desnaturação de proteínas estruturais do corpo do nematoide, dissolvem a membrana citoplasmática de suas células, inibem enzimas e interferem no fluxo de elétrons na respiração ou pelo ADP (ISMAIL; ABD-EL-MIGEED; AWAAD, 2011).

Na obtenção da torta de algodão, que é feita mecanicamente, primeiro se retira a fibra das sementes. A seguir, extrai-se o óleo das sementes e o que resta, como resíduo deste processo, é a torta de algodão (PANAGIOTOPOULOS et al., 2013). Para isso faz-se o esmagamento dos caroços em prensas para extração do óleo, utilizando apenas a prensagem, sem utilização de solvente químico, o que deixa no produto um residual de óleo conhecida como torta gorda (5% de óleo residual) e que é mais energética. O farelo de algodão é obtido quando são utilizados processos químicos (solventes) e físicos (prensagem) para a extração do óleo, conhecida também como torta magra (menos de 2% de óleo residual), que é menos energética (PAIM et al., 2010).

Um dos seus usos preconizados pelos pecuaristas é no suplemento alimentar de animais, devido ao elevado conteúdo nutricional, proteico (40%) e de fibra (11-13%) (RAMACHANDRAN et al., 2007). Porém, há algumas restrições para alimentação animal devido ao conteúdo de gossipol, pigmento polifenólico, que afeta as proteínas da digestão, quando encontra-se maior que 250 mg / kg de alimentação para frangos (ADEYEMO; LONGE, 2007). Outro uso para essa torta de algodão é no controle de fitonematoides. Ibrahim et al.

(2007) realizaram ensaios incorporando 30 g/vaso de torta de algodão, linhaça ou gergelim com o substrato. A seguir, incorporaram ovos de *M. incognita*. Quarenta e cinco dias depois da inoculação avaliaram número de galhas e de massas de ovos comprovando redução entre 84,9 – 90,1% e de 86,9 – 94,5% respectivamente. Meena, Nehra e Trivedi (2009) observaram redução na população de *Heterodera cajani* em guandú (*Cajanus cajan*), incorporando 5g/vaso da torta de nim (51,77%), torta de gergelim (46,71%), torta de mostarda (43,25%) e torta de algodão (39,85%). Mohan (2011) comparou o efeito da aplicação do carbofurano e diversas tortas em híbridos de cana-de-açúcar infestados com fitonematoídeos. A máxima redução populacional ocorreu com aplicação do carbofurano em 105,38%, seguido pela torta de nim 89,36% e pela torta de algodão 60,84%.

2.3 Compostos orgânicos voláteis

Os COVs compreendem uma grande variedade de moléculas a base de carbono, tais como aldeídos, cetonas, e outros hidrocarbonetos (GAMLIEL; STAPLETON, 1985). Os COVs provenientes de ecossistemas terrestres têm focado na produção de tais substâncias pelas plantas intactas (FERRIS; ZHENG, 1999; CARLI, 2011), culturas fúngicas (FREIRE et al., 2012; RIGA; LACEY; GUERRA, 2008) e bacterianas (GU et al., 2007; HUANG et al., 2010). Acredita-se que mais de 1.700 COVs sejam produzidos por plantas (folhas, flores, frutos e raízes) (KNUDSEN et al., 2006), o equivalente a 1% do metabolismo secundário das plantas (DUDAREVA et al., 2006; LEFF; FIERER, 2008). Vários aspectos das interações entre microorganismos têm sido estudadas por muitos anos, entretanto, a toxicidade dos COVs a microorganismos tem sido

ênfáticas apenas recentemente (CAMPOS; PINHO; FREIRE, 2010). E os efeitos tóxicos dos COVs produzidos por fungos, bactérias bem como o efeito direto de COVs produzido no solo pela sua microflora aos fitonematoides vem sendo demonstrado nos últimos anos.

Os COVs são moléculas com até 20 átomos de carbono, com alta pressão de vapor, produzidas pelas plantas (DUDAREVA et al., 2006) e pelos microrganismos, tendo importante influência na química da atmosfera, nos processos biológicos do solo e nas suas interações bióticas (LEFF; FIERER, 2008). Os COVs podem atravessar as membranas livremente e são liberados na atmosfera ou no solo, na ausência de uma barreira de difusão (PICHERSKY; NOEL; DUDAREVA, 2006). Também são difundidos pelo movimento de solução aquosa e pelo fluxo em massa de água pelo perfil do solo, proporcionando rápido movimento dos voláteis pelo sistema (WHEATLEY, 2002). São de fácil penetração pela membrana e distribuição eficiente pela porosidade do solo, o que aumenta a área de influência dos voláteis e melhoram sua eficácia na morte de microrganismos, sob o ponto de vista de controle. Assim, os voláteis atuam na atmosfera acima e abaixo do solo (CAMPOS; PINHO; FREIRE, 2010).

Na última década, tem-se dado ênfase aos estudos sobre COVs tóxicos a fitopatógenos (CAMPOS; PINHO; FREIRE, 2010) com alguns trabalhos sobre seus efeitos a fitonematoides (FREIRE et al., 2012). Bactérias e fungos isolados de solos agricultáveis produzem COVs tóxicos a fungos (fungistasis) e a fitonematoides (GU et al., 2007; RIGA; LACEY; GUERRA, 2008; HUANG et al., 2010; FREIRE et al., 2012). Pinho (2010) caracterizou algumas moléculas dos COVs emitidos por isolados de bactérias endofíticas tóxicos a *M. incognita* e também testou, contra *M. incognita*, algumas moléculas análogas comerciais.

Das 23 moléculas estudadas, 5 causaram 100% de imobilidade e mortalidade (3,3,5-trimetil-ciclohexanona; (+/-) 2-octanol; 3-octanol e benzaldehído). Kimura et al. (2007) encontraram 86% de mortalidade de *B. xilophilus* e *Caenorhabditis elegans*, pelo ácido 5-hidroximetil-2-furoico, oriundo de *Aspergillus* sp.. Também fungos endofíticos produzem compostos que, em solução aquosa, demonstram toxicidade a nematoides, como o ácido 3-hidroxipropionico, que foi tóxico a *M. incognita*, com valor de DL₅₀ de 12.5 a 15 µg/ml. Vale ressaltar que esses trabalhos têm demonstrado a ação nematicida, devido ao contato direto das substâncias com o nematoide, não ocorrendo a verificação de sua capacidade volátil e tóxica a esse patógeno.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizados experimentos empregando-se solo natural, solo esterilizado e substrato artificial para se avaliar o efeito direto de concentração de torta de algodão em ovos de *M. incognita* misturados a eles e também o efeito dos compostos orgânicos voláteis (COVs), emitidos pela mistura e retidos na superfície através do fechamento hermético plástico, em juvenis de segundo estágio (J2), dessa mesma espécie. Esses efeitos foram avaliados pela imobilidade e mortalidade de J2, bem como pela infectividade e reprodução de *M. incognita* em tomateiro.

3.1 Obtenção de ovos e juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne incognita*

O inóculo para os ensaios foi obtido de populações puras de *M. incognita*, multiplicadas em plantas de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L cultivar do grupo Santa Cruz), em vasos com substrato Multiplant®, mantidas em casa de vegetação. Das raízes galhadas de tomateiro, uma suspensão de ovos de *M. incognita* foi obtida conforme Hussey e Barker (1973), modificado por Boneti e Ferraz (1981). Assim, raízes de tomateiro foram lavadas cuidadosamente em água corrente para retirar substratos ou solos aderidos, picadas em pedaços de aproximadamente 0,5 cm e trituradas em liquidificador com solução de NaOCl 0,5%, por cerca de 20 segundos. A suspensão de ovos e raízes trituradas foi vertida em uma peneira de 0,074 mm de abertura (200 “mesh”), acoplada a outra de 0,025 mm (500 “mesh”), ficando os ovos retidos nessa última. A contagem dos ovos foi realizada em câmara de Peters em microscópio de luz. Parte dos ovos obtidos foi incubada em câmara de eclosão a 28 °C. Os J2 eclodidos, no segundo e no terceiro dia após a montagem da câmara, foram utilizados nos ensaios.

3.2 Obtenção dos solos e substrato e determinação da umidade pelo índice da capacidade de campo (cc).

O solo natural foi obtido de área de mata primária. A amostra foi coletada abaixo da camada de litter até 25 cm de profundidade. Parte desse mesmo solo foi autoclavado por 1 hora a 120 °C. Posteriormente, foi colocado em bandejas e levado para casa de vegetação e lá deixado por 15 dias para evaporação dos compostos voláteis tóxicos e aeração. A seguir, foi usado no experimento.

O substrato artificial agrícola empregado em um dos experimentos foi adquirido no comércio com o nome de Multiplant[®].

No solo natural, esterilizado e no substrato artificial foram ajustadas à umidade para 60% da cc. Para isso, foi adicionado um volume conhecido de água até o ponto de saturação do solo ou substrato artificial. A água drenada após saturação completa foi coletada e o volume medido em proveta. Do volume inicial foi subtraída a quantidade medida na proveta chegando-se a cc de cada solo ou substrato.

3.3 Montagem dos experimentos

3.3.1 Ovos de *Meloidogyne incognita* misturados ao solo natural, solo esterilizado ou substrato e vedação hermética dos copos.

Copos plásticos de 300 mL foram preenchidos com uma mistura de 200 g de substrato agrícola, solo natural ou solo esterilizado e torta de algodão nas concentrações de 0,0; 1,5; 3,0; 4,5 ou 6,0%. Foram também adicionados 3.000 ovos de *M. incognita* para cada copo e misturados ao substrato ou solo (natural ou esterilizado). No centro de cada copo foram aterrados, até a metade, dois microtubos de 1,5 mL. Os copos foram vedados com Parafilm[®] e colocados em

casa de vegetação. Foram feitas 15 repetições para cada tratamento, sendo que, cinco delas foram utilizadas para plantio direto de mudas de tomateiro; outras cinco foram para exposição de J₂ de *M. incognita* aos oito dias de formação de COVs e as restantes foram para exposição de J₂ de *M. incognita* aos dezoito dias de formação de COVs.

3.3.2 Imobilidade e mortalidade dos juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne incognita* pelos compostos orgânicos voláteis, na câmara de gás, na superfície dos copos.

Nos copos que foram vedados visando à formação de COVs, durante dez dias, como descrito anteriormente, no oitavo dia, com uma seringa foi injetado em um dos microtubos, 1 mL de suspensão aquosa, contendo 200 J₂ de *M. incognita* e no outro microtubo, 1 mL contendo 800 J₂ de *M. incognita*, em cada repetição dos tratamentos. O orifício foi imediatamente vedado com fita adesiva, após a retirada da agulha perfurante. Os microtubos, contendo os J₂ de *M. incognita*, permaneceram então expostos aos COVs por mais dois dias, totalizando 10 dias de vedação dos copos.

Os copos que foram vedados visando à formação de COVs, durante vinte dias, no decimo oitavo dia repetiu-se o mesmo procedimento com a injeção dos J₂ de *M. incognita* nos tratamentos, visando à exposição dos J₂ por dois dias, totalizando-se 20 dias de vedação dos copos. Portanto os J₂ ficaram sempre expostos aos COVs por 48 horas.

Ao final de cada período de exposição dos J₂ aos COVs, foi removido o Parafilm[®] e os microtubos foram retirados e agitados. Do microtubo que continha 200 J₂ foram colhidas duas alíquotas de 200 µL de cada repetição, que

foram transferidas para células de placa de poliestireno. Avaliou-se a porcentagem de J₂ imóveis, em microscópio de objetiva invertida. Em seguida, o volume da célula da placa de poliestireno foi completado com água destilada e a placa foi colocada em BOD a 25° C, por 24 horas, para a avaliação da porcentagem de mortalidade.

Os experimentos foram organizados em delineamento inteiramente casualizado com cinco tratamentos (torta de algodão nas concentrações 0,0; 1,5; 3,0; 4,5 ou 6,0%) e 10 repetições para cada concentração. A Análise de Variância (ANOVA) foi realizada em esquema fatorial dois tempos de exposição (COVs formados por 10 e 20 dias) x cinco concentrações da torta de algodão, com total de dez tratamentos. Os resultados foram previamente submetidos a testes de normalidade (Shapiro- Wilk) e à homogeneidade de variância dos erros (Bartlett). Uma vez atendidos estes pressupostos, aplicou-se o teste F, por meio da Análise de Variância (ANOVA). Quando o teste F foi significativo (P <0,05) procedeu-se, para as variáveis qualitativas de cada tratamento, à comparação por teste de Tukey (P <0,05).

3.3.3 Infectividade de ovos de *Meloidogyne incognita* misturados à torta de algodão e ao solo ou substrato, em tomateiro.

Em bandejas com células de 75 cm³, preenchidas com substrato artificial, foram colocadas, para germinar, de 2 a 4 sementes de tomateiro (*S. lycopersicum* L. cultivar do grupo Santa Cruz). Após a germinação foi deixada apenas uma planta por célula. Quando as mudas estavam com 3 a 4 pares de folhas definitivas, foram transplantadas para os copos em que foi incorporado substrato ou solo com a torta de algodão e receberam 3000 ovos de *M. incognita*.

Como controle, o solo ou substrato não receberam a adição de torta de algodão. As plantas foram mantidas em casa de vegetação durante 30 dias, irrigadas frequentemente e adubadas. Ao final dos 30 dias foram feitas as avaliações do número de galhas e de ovos por sistema radicular. Para isso, cortaram-se a parte aérea e as raízes foram cuidadosamente lavadas em água parada. A seguir, foram colocadas sobre papel toalha para retirar o excesso de água. Então as raízes foram pesadas, contadas o número de galhas por sistema radicular e dividido esse número por grama de raiz. A seguir, as raízes foram cortadas em pedaços de 0,5 cm de comprimento, batidas em liquidificador com 200 ml de hipoclorito de sódio a 0,5%, por 20 segundos, seguindo a técnica de Hussey e Barker (1973) e obteve-se o número de ovos que foi dividido também por grama de raiz.

Os experimentos foram organizados em delineamento inteiramente casualizado com cinco tratamentos (torta de algodão nas concentrações 0,0; 1,5; 3,0; 4,5 ou 6,0%) e 15 repetições para cada concentração. A Análise de Variância (ANOVA) foi realizada em esquema fatorial três tempos de permanência dos ovos no substrato (0, 10 e 20 dias) x cinco concentrações da torta de algodão, com total de quinze tratamentos. Os resultados foram previamente submetidos a testes de normalidade (Shapiro- Wilk) e a homogeneidade de variância dos erros (Bartlett). No caso dos dados não atenderem aos pressupostos de normalidade e homogeneidade, esses foram submetidos à transformação. No solo natural, o número de ovos por grama de raiz foi transformado a $\log(x + 1)$. No solo esterilizado, sobre os dados de número de galhas por grama de raiz fez-se a transformação a \sqrt{x} . No substrato artificial, sobre os dados de número de galha por grama de raiz fez-se a transformação a \sqrt{x} . Uma vez atendidos estes pressupostos, aplicou-se o teste F, por meio da Análise de Variância (ANOVA). Quando o teste F foi significativo

($P < 0,05$) procedeu-se, para as variáveis qualitativas de cada tratamento a comparação pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

3.3.4 Infectividade de Juvenis de segundo estágio de *M. incognita*, após exposição aos COVs.

A avaliação do efeito dos COVs acumulados na superfície do solo (natural ou esterilizado) ou substrato foi feita através da inoculação dos 800 J_2 , que foram injetados nos microtubos dentro da câmara de gás, em tomateiro. Para isso copos de 300 ml foram preenchidos com substrato artificial e, em cada copo, plantou-se uma muda de tomateiro do grupo Santa Cruz. No momento do transplante da muda, os 800 J_2 expostos aos voláteis por dois dias (vedação dos copos por 10 e 20 dias) foram inoculados por muda fazendo-se quatro perfurações no substrato a 2 cm do caule da muda. A suspensão com 800 J_2 foi igualmente distribuída nessas perfurações/muda. Após a inoculação, as mudas foram mantidas por 30 dias em casa de vegetação com irrigações frequentes e as adubações necessárias. Ao final dos 30 dias, pesaram-se o sistema radicular e fez-se a contagem do número de galhas e de ovos. Todos os experimentos foram repetidos duas vezes.

Os experimentos foram organizados em delineamento inteiramente casualizado com cinco tratamentos (torta de algodão nas concentrações 0,0; 1,5; 3,0; 4,5 ou 6,0%) e 10 repetições, para cada concentração. A Análise Variância (ANOVA) foi realizada em esquema fatorial dois tempos de exposição (COVs formados por 10 e 20 dias) x cinco concentrações da torta de algodão, com total de dez tratamentos. Os resultados foram previamente submetidos a testes de normalidade (Shapiro- Wilk) e à homogeneidade de variância dos erros (Bartlett). No caso dos dados não atenderem aos pressupostos de normalidade e

homogeneidade, esses foram submetidos à transformação. No solo natural, fez-se a transformação de \sqrt{x} e $\log(x)$ para o número de galhas e ovos por grama de raiz, respectivamente. No solo esterilizado, fez-se a transformação do número de ovos por grama de raiz para \sqrt{x} . No substrato artificial, fez-se a transformação a \sqrt{x} para o número de galhas e ovos por grama de raiz, respectivamente. Uma vez atendidos estes pressupostos, aplicou-se o teste F, por meio da Análise de Variância (ANOVA). Quando o teste F foi significativo ($P < 0,05$) procedeu-se, para as variáveis qualitativas de cada tratamento à comparação por teste de Tukey ($P < 0,05$).

4 RESULTADOS

4.1 Ovos de *Meloidogyne incognita* misturados ao solo ou substrato com torta de algodão, em ambiente hermético.

Neste ensaio, em que os ovos de *M. incognita* permaneceram por 0, 10 e 20 dias em contato com o solo (natural ou esterilizado) ou o substrato artificial e as concentrações de torta de algodão, houve interação significativa entre os tempos de exposição e as concentrações da torta, quando avaliou-se a infectividade ($P < 0,001$) e reprodução ($P < 0,001$) de *M. incognita*. A infectividade de J2, a partir de ovos de *M. incognita* expostos à torta de algodão avaliada por galhas por grama de raiz foi reduzida significativamente em solo natural, solo esterilizado e substrato artificial misturados com torta de algodão, mesmo na menor concentração (1,5%) e em qualquer tempo de duração de exposição desses ovos aos compostos derivados da torta (10 e 20 dias). Porém, a partir de 3,0% a redução do número de galhas foi bem mais elevada alcançando

até 100% de redução, quando se utilizaram 4,5 e 6,0% com 10 e 20 dias de exposição dos ovos aos compostos derivados da torta de algodão, podendo ser essa a dose mais econômica. A reprodução avaliada em ovos por grama de raiz também foi reduzida significativamente comparada com o controle, inclusive na menor concentração (1,5% de torta) e em qualquer período de exposição dos ovos à torta (10 e 20 dias). A redução do número de ovos foi ainda maior do que galhas, quando se usaram os três substratos (Tabelas 1, 2 e 3).

O período de exposição de ovos à torta de algodão por 20 dias, em solo esterilizado e solo natural reduziu significativamente o número de galhas comparadas aos demais períodos (0 e 10 dias). No entanto, no substrato artificial as galhas foram significativamente reduzidas nos períodos de exposição à torta de 10 e 20 dias comparadas com o controle (0 dias), isto é, mistura de torta com os ovos e plantio imediato do tomateiro (Tabela 3).

Tabela 1: Galhas e ovos por grama de raiz de tomateiros infectados por ovos de *Meloidogyne incognita* em contato com as diferentes concentrações de torta de algodão em solo natural durante 0, 10 e 20 dias.

Permanência dos ovos de <i>M. incognita</i> no solo natural (dias)	Galhas.g ⁻¹ de raiz					Ovos.g ⁻¹ de raiz				
	Concentração torta de algodão (%)					Concentração torta de algodão (%)				
	0,00	1,50	3,00	4,50	6,00	0,00	1,50	3,00	4,50	6,00
0	58 Ad	48 Bc	32 Bb	22 Ba	17 Ba	24330 Ae	12858 Cd	9273 Cc	3621 Cb	2189 Ca
10	57 Ac	52 Bc	39 Cb	2 Aa	0,Aa	29856 ABe	5214 Bd	2443 Bc	51 Bb	26 Ba
20	53 Ac	10 Ab	0 Aa	0 Aa	0 Aa	33564 Bc	32 Ab	0 Aa	0 Aa	0 Aa

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

Tabela 2: Galhas e ovos por grama de raiz de tomateiros infectados por ovos de *Meloidogyne incognita* em contato com as diferentes concentrações de torta de algodão em solo esterilizado, durante 0, 10 e 20 dias.

Permanência dos ovos de <i>M. incognita</i> no solo natural (dias)	Galhas.g ⁻¹ de raiz					Ovos.g ⁻¹ de raiz				
	Concentração torta de algodão (%)					Concentração torta de algodão (%)				
	0,00	1,50	3,00	4,50	6,00	0,00	1,50	3,00	4,50	6,00
0	162 Ce	104 Bd	53 Bc	19 Bb	8 Ba	17612 Cd	5537 Bc	2984 Bb	882 Aa	382 Aa
10	129 Be	108 Bd	63 Cc	29 Cb	14 Ca	13324 Ac	9065 Cb	472 Aa	229 Aa	75 Aa
20	111 Ad	2 Ac	1 Ab	0 Aab	0 Aa	14895 Bb	480 Aa	70 Aa	27 Aa	0 Aa

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

Tabela 3: Galhas e ovos por grama de raiz de tomateiros infectados por ovos de *Meloidogyne incognita* em contato com as diferentes concentrações de torta de algodão em substrato artificial, durante 0, 10 e 20 dias.

Permanência dos ovos de <i>M. incognita</i> no solo natural (dias)	Galhas.g ⁻¹ de raiz					Ovos.g ⁻¹ de raiz				
	Concentração torta de algodão (%)					Concentração torta de algodão (%)				
	0,00	1,50	3,00	4,50	6,00	0,00	1,50	3,00	4,50	6,00
0	309 Bd	236 Bc	151 Cb	133 Bb	85 Ba	748 Aa	493 Aa	283 Aa	264 Aa	230 Aa
10	154 Ac	113 Ab	99 Bb	20 Aa	11 Aa	4976 Cc	1731 Bb	235 Aa	143 Aa	130 Aa
20	167 Ad	122 Ac	25 Ab	16 Ab	6 Aa	1934 Bb	1464 Bb	382 Aa	155 Aa	113 Aa

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

4.2 Toxicidade dos compostos orgânicos voláteis retidos na superfície dos solos e do substrato a juvenis de segundo estágio, pelo fechamento hermético dos recipientes.

Houve interação significativa entre os tempos de formação dos COVs (10 e 20 dias) e as concentrações de torta de algodão, quando avaliaram-se imobilidade ($P < 0,001$) e mortalidade ($P < 0,001$) dos J2 expostos aos COVs por 48 horas na câmara de gás formada na superfície desses copos, nos três experimentos realizados com solo natural, solo esterilizado e substrato artificial. A imobilidade sempre foi mais elevada comparada ao controle em qualquer período de tempo de formação da câmara (10 e 20 dias) na presença das diversas concentrações de torta de algodão. A imobilidade dos J2 foi também mais alta no período de 20 dias de formação da câmara de gás superficial, variando de 95% a 100%, em comparação ao período de 10 dias (variando de 57% a 88%). A mortalidade, contudo foi sempre mais baixa do que a imobilidade em qualquer concentração de torta de algodão, mas foi sempre mais elevada do que no controle, variando de 18% a 67% com muitas variações entre o período de 10 e 20 dias empregadas na formação de câmara de gás (Tabelas 4, 5 e 6).

Tabela 4: Porcentagem de imobilidade e mortalidade de juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne incognita* após exposição por 48 horas aos compostos orgânicos voláteis da câmara de gás, formada na superfície dos copos em 10 e 20 dias após a adição de torta de algodão aos copos, com solo natural.

Tempo de formação da câmara de gás quando incorporados solo natural e torta de algodão (dias)	Imobilidade					Mortalidade				
	Concentração torta de algodão (%)					Concentração torta de algodão (%)				
	0,00	1,50	3,00	4,50	6,00	0,00	1,50	3,00	4,50	6,00
10 dias	6 Bc	79 Ba	71 Bba	65 Bb	76 Ba	1 Ad	35 Ac	48 Ab	56 Aab	55 Aa
20 dias	12 Ab	95 Aa	100 Aa	100 Aa	100 Aa	2 Be	18 Bd	26 Bc	55 Bb	67 Ba

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

Tabela 5: Porcentagem de imobilidade e mortalidade de juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne incognita* após exposição por 48 horas aos compostos orgânicos voláteis da câmara de gás, formada na superfície dos copos em 10 e 20 dias após a adição de torta de algodão aos copos, com solo esterilizado.

Tempo de formação da câmara de gás quando incorporados solo esterilizado e torta de algodão (dias)	Imobilidade					Mortalidade				
	Concentração torta de algodão (%)					Concentração torta de algodão (%)				
	0,00	1,50	3,00	4,50	6,00	0,00	1,50	3,00	4,50	6,00
10	20 Bc	79 Bab	81 Ba	74 Bb	78 Bab	18 Ac	29 Ab	40 Aa	43 Ba	46 Ba
20	27 Ab	98 Aa	99 Aa	99 Aa	99 Aa	20 Ac	31 Ab	36 Ab	53 Aa	58 Aa

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

Tabela 6: Porcentagem de imobilidade e mortalidade de juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne incognita* após exposição por 48 horas aos compostos orgânicos voláteis da câmara de gás, formada na superfície dos copos em 10 e 20 dias após a adição de torta de algodão aos copos, com substrato artificial.

Tempo de formação da câmara de gás quando incorporados substrato artificial e torta de algodão (dias)	Imobilidade					Mortalidade				
	Concentração torta de algodão (%)					Concentração torta de algodão (%)				
	0,00	1,50	3,00	4,50	6,00	0,00	1,50	3,00	4,50	6,00
10	3 Bd	57 Bc	72 Bb	80 Bba	88 Ba	1 Ac	23 Ab	31 Aa	35 Ba	38 Ba
20	12 Ab	95 Aa	97 Aa	100 Aa	100 Aa	3 Ac	25 Bb	24 Bb	47 Aa	46 Aa

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

4.3 Infectividade dos juvenis de segundo estágio e reprodução após exposição à câmara de gás, formada na superfície do recipiente hermeticamente fechado.

Houve interação significativa entre os tempos de formação dos COVs (10 e 20 dias) e as concentrações de torta de algodão, quando avaliou-se a infectividade ($P < 0,001$) e reprodução ($P < 0,001$) dos J2 expostos aos COVs, relatados no item 4.2. A infectividade expressa em número de galhas foi reduzida já na menor concentração (1,5%) da torta de algodão adicionada ao solo ou substrato artificial comparada com o controle. Porém, as maiores reduções foram observadas nas concentrações iguais ou acima de 3,0% de torta. Entretanto, o número de galhas foi significativamente maior, quando os J2 ficaram expostos aos COVs da câmara formada em 20 dias, do que em 10 dias.

A reprodução das fêmeas (nº de ovos) foi sempre mais baixa do que o número de galhas formadas em qualquer concentração de torta e tempo de formação da câmara de gás (10 ou 20 dias), quando se usaram solo natural. Entretanto, no substrato artificial ocorreu sempre muita variação nos períodos de 10 e 20 dias nas diversas concentrações de torta. Embora no solo esterilizado a reprodução tenha sido semelhante entre fêmeas desenvolvidas de J2 expostos aos COVs de câmara formadas com 10 e 20 dias, no solo natural e substrato artificial a reprodução foi maior, quando J2 foram expostos aos COVs da câmara de 20 dias comparada a de 10 dias. Entretanto, em qualquer concentração de torta e tempo para formação da câmara de gás (10 e 20 dias) a reprodução (nº de ovos) foi significativamente reduzida em comparação ao controle (Tabelas 7, 8 e 9).

Tabela 7: Galhas e ovos por grama de raiz de tomateiros infectados por juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne incognita* após exposição por 48 horas aos compostos orgânicos voláteis, formados na superfície do copo em 10 e 20 dias após a mistura de diferentes concentrações de torta de algodão em solo natural e vedação do recipiente.

Tempo de formação da câmara de gás quando incorporado solo natural e torta de algodão (dias)	Galhas.g ⁻¹ de raiz					Ovos.g ⁻¹ de raiz				
	Concentração torta de algodão (%)					Concentração torta de algodão (%)				
	0,00	1,50	3,00	4,50	6,00	0,00	1,50	3,00	4,50	6,00
10	44 Ad	22 Ac	16 Ab	12 Ab	7 Aa	1556 Ae	604 Ad	315 Ac	201 Ab	91 Aa
20	135 Be	105 Bd	91 Bc	73 Bb	41 Ba	12718 Bd	10179 Bd	6251 Bc	1921 Bb	673 Ba

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

Tabela 8: Galhas e ovos por grama de raiz de tomateiros infectados por juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne incognita* após exposição por 48 horas aos compostos orgânicos voláteis, formados na superfície do copo em 10 e 20 dias após a mistura de diferentes concentrações de torta de algodão em solo esterilizado e vedação do recipiente.

Tempo de formação da câmara de gás quando incorporado solo esterilizado e torta de algodão (dias)	Galhas.g ⁻¹ de raiz					Ovos.g ⁻¹ de raiz				
	Concentração torta de algodão (%)					Concentração torta de algodão (%)				
	0,00	1,50	3,00	4,50	6,00	0,00	1,50	3,00	4,50	6,00
10	29 Bd	21 Ac	6 Ab	3 Aab	2 Aa	1466 Be	206 Ad	53 Ac	25 Ab	8 Aa
20	23 Ad	20 Ac	15 Bb	13 Bb	2 Aa	1172 Ae	339 Bd	136 Bc	54 Bb	24 Ba

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

Tabela 9: Galhas e ovos por grama de raiz de tomateiros infectados por juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne incognita* após exposição por 48 horas aos compostos orgânicos voláteis, formados na superfície do copo em 10 e 20 dias após a mistura de diferentes concentrações de torta de algodão em substrato artificial e vedação do recipiente.

Tempo de formação da câmara de gás quando incorporado substrato artificial e torta de algodão (dias)	Galhas.g ⁻¹ de raiz					Ovos.g ⁻¹ de raiz				
	Concentração torta de algodão (%)					Concentração torta de algodão (%)				
	0,00	1,50	3,00	4,50	6,00	0,00	1,50	3,00	4,50	6,00
10	46 Ac	24 Ab	12 Aa	11 Aa	8 Aa	633 Ac	306 Ab	176 Aba	134 Aa	89 Aa
20	160 Bd	121 Bc	107 Bb	97 Bba	92 Ba	2873 Bc	2313 Bc	1655 Bb	1079 Ba	924 Ba

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

5 DISCUSSÃO

A alta redução na infectividade e reprodução de *M. incognita* em tomateiro pela incorporação de 3,0% ou mais de torta de algodão em solo ou substrato infestado com ovos também têm sido alcançadas por outros pesquisadores. Ibrahim et al. (2007) obtiveram diminuição de 84,9% em número de galhas, quando incorporou 30 g / vaso de torta de algodão com o substrato e inocularam ovos de *M. incognita*. Meena, Nehra e Trivedi (2009) observaram redução na população de *Heterodera cajani* em guandú (*Cajanus cajan*), incorporando 5g/vaso da torta de algodão (39,85%) e Mohan (2011) obteve a redução populacional (60,84%), utilizando torta de algodão em híbridos de cana de açúcar infestados com fitonematoides. Entre outras tortas testadas, Badra, Saleh e Oteifa (1979) concluíram que a torta de algodão foi uma das mais tóxicas e que sua incorporação como material fresco proporcionou 100% de efeito nematicida no controle de *Rotylenchulus reniformis* e *Tylenchulus semipenetrans*. Porém com 10 dias de decomposição do material a torta de algodão tornou-se menos tóxica com mortalidade entre 13,42 a 55,16% para *R. reniformis* e maior que 75,53% para *T. semipenetrans*. Javed et al. (2008) avaliaram o efeito de formulações de nim no controle de *M. javanica* e obtiveram um incremento na imobilidade maior que 80% e na mortalidade maior que 30%. Jothi et al. (2004), incorporando torta de nim ao solo infestado observaram a diminuição da população de *Pratylenchus delattrei* em 61% quando comparado com a testemunha.

Badra, Saleh e Oteifa (1979) usando a técnica de cromatografia gasosa detectaram na torta de algodão cinco ácidos graxos de baixo peso molecular: acético, propiónico, butírico, isovalérico e valéricos, contendo 12,39 µg / grama

de torta, sendo tóxico para os nematoides. Realizaram também o teste de colorimetria para determinar a fração de fenol constituinte da torta de algodão, determinando um total de 255 µg / grama. Dentre os fenóis o de maior importância na torta de algodão é o gossipol, um composto polifenólico, que tem sido estudado como envolvido na resistência das plantas contra insetos (O'BRIEN et al., 2005), além de ser uma das substâncias tóxicas que restringe o uso da torta de algodão na alimentação animal (ADEYEMO; LONGE, 2007).

A torta de algodão nos ensaios aqui realizados com solo natural, solo esterilizado e substrato artificial infestados com ovos de *M. incognita* demonstraram efeito nematicida que aumentaram com o tempo de exposição dos ovos por 20 dias. De fato, na decomposição de tortas oleaginosas resultam compostos oxigenados, amônio, fenóis, aldeídos, entre outros, os quais têm efeito nematicida. Esses compostos são caracterizados pelas suas propriedades lipofílicas, que envolve a degradação e desnaturação de proteínas estruturais do corpo do nematoide, dissolve a membrana citoplasmática de suas células, inibe enzimas e interfere no fluxo de elétrons na respiração ou pelo ADP (ISMAIL; ABD-EL-MIGEED; AWAAD, 2011). Assim, quanto maior o tempo de contato (20 dias) maior é a atuação dessas moléculas no corpo do nematoide.

Como nos ensaios realizados neste trabalho, os ovos de *M. incognita* estavam dispersos no solo ou no substrato artificial misturados com a torta de algodão e o recipiente foi hermeticamente fechado, somaram-se a esses fatores nematicidas citados, os efeitos tóxicos dos COVs produzidos não só pela torta, mas também pela microbiota que usa a torta como alimento para seu crescimento e que pode até ser mais relevante na produção de COVs. Os microrganismos degradadores de litter produzem até 11 vezes mais COVs do que o litter isento deles (esterilizado) (GRAY; MONSON; FIERER, 2010).

A alta imobilidade e mortalidade de J2 de *M. incognita* introduzido na câmara de gás formada na superfície dos recipientes demonstram os efeitos nematicida e nematostático dos COVs emitidos pela mistura de torta de algodão e solo ou substrato artificial. Esses COVs seriam perdidos sem a vedação hermética realizada nos recipientes. A cobertura plástica após a incorporação de massa verde de *Brassica*, em solo infestado com o nematoide *Globodera pallida*, resultou em maior redução populacional do nematoide comparado com as mesmas áreas descobertas (LORD et al., 2011). A irrigação após a aplicação da torta de algodão no campo pode auxiliar, talvez, na retenção dos COVs no solo, pois moléculas polares como álcoois, cetonas etc. são dissolvidas na água e nela retidas por mais tempo, possibilitando maior toxicidade aos fitonematoides.

A imobilidade e mortalidade de J2 de *M. incognita* e de outros nematoides têm sido observados após a exposição dos COVs de plantas e de microrganismos como fungos e bactérias. Freire et al. (2012) comprovaram que a exposição dos J2 de *M. incognita* aos COVs emitidos pelo fungo *F. oxysporum* (Isolado 21) tiveram um forte efeito na mobilidade e mortalidade. Yang et al. (2012) avaliaram, por diferentes métodos, a mortalidade causada pelos COVs emitidos por *Trichoderma* sp. YMF1.00416, obtendo 80,75%, 65,76%, e 54,07% para *Caenorhabditis elegans*, *Panagrellus redivivus*, e *Bursaphelenchus xylophilus*. Riga, Lacey e Guerra (2008) mostraram que os COVs emitidos por *Muscodor albus* têm propriedades nematicidas significativas na mortalidade e imobilidade contra os nematoides *Paratrichodorus allius*, *Pratylenchus penetrans*, *Meloidogyne chitwoodi* e *Meloidogyne hapla*. Entretanto, COVs de plantas tóxicos a fitonematoides têm sido pouco estudados. Algumas pesquisas têm demonstrado o efeito isolado dos COVs a fitonematoides. Por exemplo, Barros et al. (2013) testaram os COVs pelos macerados de nim, guandu, mostarda,

mucuna e feijão de porco para *M. incognita* J2, sendo que baixas quantidades dos macerados secos (0,5 g) causaram imobilidade maior de 90% nos J2. O isotiociano, composto volátil produzido pela degradação de glucosinolato de *Brassicacae* reduz a imobilidade e causa mortalidade de *Globodera pallida* (LORD et al., 2011).

Embora a infectividade e reprodução tenha sido reduzida nos J2 expostos aos COVs armazenados nas câmaras de gás de 20 dias, comparando com 10 dias, elas foram significativamente reduzidas comparadas ao controle, comprovando o efeito nematocida e nematostático já avaliado pela imobilidade e mortalidade. Barros et al. (2013) avaliaram a infectividade de *M. incognita* com J2 expostos a COVs emitidos pelo macerado das folhas de nim e mostarda e constataram diminuição do número de galhas por grama de raiz. O macerado seco mostarda causou reduções de 72-79% no número de galhas em relação ao macerado nim seco 50 - 57%. O número de ovos foi diminuído em 81,5-96% para todas as concentrações. Freire et al. (2012) comprovaram que a exposição dos J2 de *M. incognita* aos COVs emitidos pelo fungo *F. oxysporum* (Isolado 21) reduziram a infectividade do nematoide em comparação com a testemunha (HUANG et al., 2010).

6 CONCLUSÕES

O efeito direto da torta de algodão nos ovos de *M. incognita* misturados ao solo (natural ou esterilizado) ou substrato resultou na redução do número de galhas e ovos em tomateiros, em ambos os tempos de exposição (10 e 20 dias) e em qualquer concentração de torta.

Os COVs retidos na câmara de gás, na superfície dos copos, aumentaram a imobilidade e mortalidade de J2 comparados ao controle, em qualquer concentração de torta de algodão e período de produção dos COVs (10 e 20 dias).

A partir da concentração de 3,0%, a infectividade e reprodução de J2 expostos aos COVs foram reduzidas comparadas ao controle.

REFERÊNCIAS

ADEYEMO, G. O.; LONGE, O. G. Effects of graded levels of cottonseed cake on performance, haematological and carcass characteristics of broilers fed from day old to 8 weeks of age. **African Journal of Biotechnology**, Oxford, v. 6, n. 8, p. 1064-1071, 2007.

BADRA, T.; SALEH, M. A.; OTEIFA, B. A. Nematicidal activity and composition of some organic fertilizers and amendments. **Revue de Nématologie**, Bondy, v. 2, n. 1, p. 29-36, 1979.

BARROS, A. F. et al. Nematicide activity of volatile organic compounds emitted by *Brassica juncea*, *Azadirachta indica*, *Canavalia ensiformis*, *Mucuna pruriens* and *Cajanus cajan* against *Meloidogyne incognita*. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 1, n. 1, p. 23-30, 2013.

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

BROWN, J.; MORRA, M. **Glucosinolate-containing seed meal as a soil amendment to control plant pests 2000-2002**. Oak Ridge: Department of Energy, 2005.

CAMPOS, V. P.; PINHO, R. S. C.; FREIRE, E. S. Volatiles produced by interacting microorganisms potentially usefull for the control of plant pathogens. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 3, p. 525-535, maio/jun. 2010.

CARLI, M. C. **Compostos orgânicos voláteis e em extrato aquoso de alho no controle de meloidogyne incognita**. 2011. 60 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

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

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

FERRAZ, S. Summary report on the current status, progress and needs for *Meloidogyne* research in Brazil (Region III). In: SASSER, J. N.; CARTER, C. C. (Ed.). **An advanced treatise on *Meloidogyne***. volume I: biology and control. 1985. p. 351-352.

FERRIS, H.; ZHENG L. Plant sources of chinese herbal remedies: effects on *Pratylenchus vulnus* and *Meloidogyne javanica*. **Journal of Nematology**, College Park, v. 31, n. 3, p. 241-263, Sept. 1999.

FREIRE, E. S. et al. Volatile substances produced by *Fusarium oxysporum* from coffee rhizosphere and other microbes affect *Meloidogyne incognita* and *Arthrobotrys conoides*. **Journal of Nematology**, College Park, v. 44, n. 4, p. 321-328, Oct. 2012.

GAMLIEL, A.; STAPLETON, J. J. Characterization of antifungal volatile compounds evolved from solarized soil amended with cabbage residues. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 83, n. 9, p. 899-905, 1985.

GRAY, C. M.; MONSON, R. K.; FIERER, N. Emissions of volatile organic compounds during the decomposition of plant litter. **Journal of Geophysical Research**, Washington, v. 115, p. 1-9, 2010.

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

HALBRENDT, J. M. Allelopathy in the management of plant-parasitic nematodes. **Journal of Nematology**, College Park, v. 28, n. 1, p. 8-14, Mar. 1996.

HUANG, Y. et al. Characterisation of volatiles produced from *Bacillus megaterium* YFM3.25 and their nematicidal activity against *Meloidogyne incognita*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 126, n. 3, p. 417-422, Mar. 2010.

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

IBRAHIM, I. K. A. et al. Control of the Root-Knot nematode *Meloidogyne incognita* on sunflower plants with certain organic plant materials and biocontrol agents. **Egyptian Journal of Phytopathology**, Cairo, v. 35, n. 1, p. 13-24, 2007.

ISMAIL, A. E.; ABD-EL-MIGEED, R. A.; AWAAD, M. S. *Meloidogyne incognita* suppression and changes of grapevine yield properties determined by waste residues from jojoba, black seed oil extraction and slow release of nitrogen fertilizer. **Journal of Nematology**, College Park, v. 29, n. 2, p. 187-205, 2011.

JAVED, N. et al. Efficacy of neem (*Azadirachta indica*) formulations on biology of root-knot nematodes (*Meloidogyne javanica*) on tomato. **Crop Protection**, Guildford, v. 27, n. 1, p. 36-43, Jan. 2008.

JOTHI, G. et al. Management of root lesion nematode, *Pratylenchus delattrei* in crossandra using oil cakes. **Bioresource Technology**, Barking, v. 93, n. 3, p. 257-259, July 2004.

KIMURA, Y. et al. Nematicidal activity of 5-hydroxymethyl-2-furoic acid against plant-parasitic nematodes. **Zeitschrift für Naturforschung**, Tübingen, v. 62, n. 3-4, p. 234-238, Mar./Apr. 2007.

KNUDSEN, J. T. et al. (Ed.). **Biology of floral scent**. New York: CRC Press, 2006.

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

LOPES, P. E. **Efeito de tortas de algodão, mamona e pinhão manso na biologia de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* e no desenvolvimento de bananeira “prata-anã”**. 2009. 56 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)- Universidade Estadual de Montes Claros, Janaúba, 2009.

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**, Easton, v. 59, n. 14, p. 7882-7890, 2011.

MAHMOUD, M. A. Y.; WAFAA, M. A. Cellular alteration of root-knot nematode *Meloidogyne incognita*-infected squash plant and intercropping sesame plant or sesame oil seed cake as control measures. **Egyptian Journal of Phytopathology**, Cairo, v. 32, n. 1-2, p. 77-85, 2004.

MEENA, P.; NEHRA, S.; TRIVEDI, P. C. Efficacy of Decomposed Organic Cakes Against *Heterodera cajani* Infecting *Cajanus cajan*. **Asian Journal of Experimental Sciences**, Amsterdam, v. 23, n. 1, p. 181-184, 2009.

MOHAN, K. et al. Comparison of inorganic and organic nematicides on the population of soil nematodes in hybrids of *Saccharum* species. **Journal of Biopesticides**, Oxford, v. 4, n. 2, p. 201-204, Dec. 2011.

O'BRIEN, R. D. et al. Cottonseed Oil. **Bailey's Industrial Oil and Fat Products**, Essex, v. 6, n. 6, p.194, 2005.

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

PAIM, T. P. et al. Uso de subprodutos do algodão na nutrição de ruminantes. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, Recife, v. 13, n. 1-3, p. 24-37, 2010.

PANAGIOTOPOULOS, I. A. et al. Biodiesel and biohydrogen production from cotton-seed cake in a biorefinery concept. **Bioresource Technology**, Essex, v. 136, p. 78–86, May 2013.

PICHERSKY, E.; NOEL, J. P.; DUDAREVA, N. Biosynthesis of plant volatiles: Nature's diversity and ingenuity. **Science**, Oxford, v. 311, n. 5762, p. 808-811, 2006.

PINHO, R. S. C. **Efeito de metabólitos bacterianos em diferentes estádios de *Meloidogyne incognita***. 2010. 73 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia)- Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

PLOEG, A. T. Effects of amending soil with *Tagetes patula* cv. single gold on *Meloidogyne incognita* infestation of tomato. **Journal of Nematology**, College Park, v. 2, n. 5, p. 489–493, 2000.

RAMACHANDRAN, S. et al. Oil cakes and their biotechnological applications: a review. **Bioresource Technology**, Essex, v. 98, n. 10, p. 2000–2009, July 2007.

RIGA, E.; LACEY, L. A.; GUERRA, N. *Muscodor albus*, a potential biocontrol agent against plant-parasitic nematodes of economically important vegetable crops in Washington State, USA. **Biological Control**, Essex, v. 45, n. 3, p. 380-385, June 2008.

SASSER, J. N. Economic importance of *Meloidogne* in tropical countries. In: LAMBERTI, F.; TAYLOR, C. E. (Ed.). **Root-knot nematodes (*Meloidogne* spp.) systematics, biology and control**. London: Academic Press, 1979. p. 359-374.

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

SLUSARENKO, A. J.; PATEL, A.; PORTZ, D. Control of plant disease 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.

TIHOHOD, D. **Nematologia agrícola aplicada**. Jaboticabal: FUNEP, 2000.

TIWARI, S.; EISENBACK, J. D.; YOUNGMAN, R. R. **Root-knot nematode in field corn**. Virginia: Virginia Polytechnic Institute and State University, 2009.

WHEATLEY, R. E. The consequences of volatile organic compound mediated bacterial and fungal interactions. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 81, n. 1-4, p. 357-364, 2002.

YANG, Z. et al. Nematicidal effect of volatiles produced by *Trichoderma* sp. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, Elmsford, v. 15, n. 4, p. 647–650, Dec. 2012.