



**WILLIAN JOSÉ RODRIGUES DA SILVA**

**SUBSTÂNCIAS ORGÂNICAS NO CONTROLE  
DE *Meloidogyne* spp. EM RAÍZES DE PLANTAS**

**LAVRAS - MG**

**2011**

**WILLIAN JOSÉ RODRIGUES DA SILVA**

**SUBSTÂNCIAS ORGÂNICAS NO CONTROLE DE *Meloidogyne* spp. EM  
RAÍZES DE PLANTAS**

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

Orientador

Dr. Denilson Ferreira de Oliveira

**LAVRAS – MG**

**2011**

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

Silva, Willian José Rodrigues da.

Substâncias orgânicas no controle de *Meloidogyne* spp. em raízes de plantas / Willian José Rodrigues da Silva. – Lavras : UFLA, 2011.

114 p. : il.

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

Orientador: Denilson Ferreira de Oliveira.

Bibliografia.

1. Fitonematoides. 2. Nematicida. 3. Indução de resistência. 4. Controle. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 632.65182

**WILLIAN JOSÉ RODRIGUES DA SILVA**

**SUBSTÂNCIAS ORGÂNICAS NO CONTROLE DE *Meloidogyne* spp. EM  
RAÍZES DE PLANTAS**

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

APROVADA em 25 de fevereiro de 2011.

Dr. Vicente Paulo Campos UFLA

Dr. Helvécio Martins dos Santos Júnior UFRJ

Dr. Denilson Ferreira de Oliveira  
Orientador

**LAVRAS – MG**

**2011**

*Aos meus pais,*  
*Pedro José da Silva*  
&  
*Petronila Rodrigues da Silva,*

OFEREÇO

*Aos meus avôs,*  
*José Pedro da Silva*  
&  
*Francelina dos Santos Silva,*

DEDICO

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, acima de tudo.

À UFLA, por meio do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, pela oportunidade de cursar o mestrado e ao CNPq, pela concessão da bolsa.

Ao meu amigo Alan que compartilhou os momentos bons e difíceis de analisar as amostras de ressonância magnética nuclear.

Aos meus amigos Jesse Valentim, Vanderley, Helvécio, Viviane, Marilua, Letícia, Maria Clara, Renata, Leidiane, Amanda, Lilian, Eduardo.

Aos técnicos Tarley e Cleber pela atenção prestada durante a execução do trabalho.

Ao meu orientador Professor Denilson Ferreira Oliveira, pela oportunidade concedida.

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

## RESUMO

Observam-se grandes prejuízos na agricultura mundial em decorrência da atuação dos nematoides das galhas (*Meloidogyne* spp.), que constituem o grupo de nematoides fitoparasitas com maior importância econômica na agricultura. Como grande parte dos métodos atualmente disponíveis para o controle destes nematoides se baseiam no uso de nematicidas convencionais, tóxicos ao ambiente e com alto custo, existe uma demanda cada vez maior por novas metodologias menos onerosas e com menos toxicidade ao ambiente e ao ser humano, para o controle de *Meloidogyne* spp. Em decorrência, avaliaram-se, neste trabalho, os efeitos de substâncias orgânicas voláteis (SOV), disponíveis comercialmente, sobre a resistência de cafeeiros a *Meloidogyne exigua*. Além disso, buscou-se averiguar, pelo emprego de métodos colorimétricos, se o aumento da resistência poderia estar associado à produção de carboidratos, aminoácidos, alcaloides e fenóis. Combinações de jasmona + jasmonato de metila, (Z)-hex-3-en-1-ol + (E)-hex-3-en-1-ol + (Z)-hex-2-en-1-ol + (E)-hex-2-enal, acetato de (E)-hex-2-enila + acetato de hexila, meso-butano-2,3-diol + butano-1,2-diol + butano-1,3-diol + butano-1,4-diol, 3-hidroxiбутanona + 4-hidroxiбутanona e acetato de linalila + nerolidol, reduziram a população de *M. exigua* nas raízes de cafeeiros quando foram aplicadas nas partes aéreas das plantas. As exposições das plantas a todas as combinações de SOV resultaram em alterações nas quantidades de alcaloides, aminoácidos, carboidratos, sacarose e fenóis. Também foram realizadas análises por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio, o que permitiu identificar várias substâncias nas raízes das plantas. Entretanto, não foi possível elucidar os mecanismos de ação dessas SOV nas plantas estudadas. Também se objetivou avaliar as atividades de substâncias orgânicas sintéticas, não voláteis, contra *Meloidogyne* spp. Dentre as substâncias testadas *in vitro*, o cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio e o ácido pícrico se destacaram. Logo, foram empregados em ensaio com plantas de alface e soja inoculadas com *Meloidogyne incognita*, o que permitiu observar que o cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio foi capaz de reduzir a população do nematoide nas raízes das plantas. Quanto ao ácido pícrico, ele mostrou-se tóxico às espécies vegetais dos experimentos, o que impossibilitou avaliar a sua ação sobre o nematoide. Estudos futuros deverão ser realizados, com vistas a obter substâncias estruturalmente parecidas com o cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio, que possam ser mais eficientes no controle de *Meloidogyne* spp.

Palavras-chave: Indução de resistência. Fitonematoides. Nematicida.

## ABSTRACT

Large losses in global agriculture are caused by root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.), which constitute the group of plant-parasitic nematodes of major economic importance to agriculture. Since most of the currently available methods for controlling these nematodes are based on the use of conventional nematicides, which are toxic to the environment and highly expensive, there is an increasing demand for new methodologies, less costly and less toxic to environment and human beings, to control *Meloidogyne* spp. Consequently, in this research the effects of commercially available volatile organic substances (VOS's) on the resistance of coffee plants to *Meloidogyne exigua* were evaluated. In addition, we sought to determine, by employing colorimetric methods, if the increase in resistance could be associated to the production of carbohydrates, amino acids, alkaloids and phenols. Combinations of methyl jasmonate + jasmone, (Z)-hex-3-en-1-ol + (E)-hex-3-en-1-ol + (Z)-hex-2-en-1-ol + (E)-hex-2-enal, (E)-hex-2-(tem algo errado aqui !!!)hexyl acetate + hexyl acetate, meso-butane-2,3-diol + butane-1,2-diol + butane-1,3-diol + butane-1,4-diol, 3-hydroxybut-2-one + 4-hydroxybut-2-one and linalyl acetate + nerolidol, were able to reduce the population of *M. exigua* in coffee roots when they were sprayed on the aerial parts of plants. Exposure of plants to all combinations of VOS's resulted in changes in the amounts of alkaloids, amino acids, carbohydrates, sucrose and phenol. The plants were also analyzed by hydrogen nuclear magnetic resonance spectroscopy, which allowed the identification of various substances in the roots. However, the mechanisms of action of these VOS's in the plants studied could not be elucidated. Another objective of this work was to evaluate the activities of nonvolatile synthetic organic chemicals against *Meloidogyne* spp. Among the substances tested *in vitro*, 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride and picric acid were the most effective. Consequently, both substances were tested on soybean and lettuce plants inoculated with *M. incognita*. 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride reduced the population of *M. incognita* in the roots of the plants, but the picric acid proved to be toxic to the plants tested, making it impossible to assess its effects on the nematode. Future studies should be conducted in order to obtain substances structurally similar to the 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, which can be more efficient in controlling *Meloidogyne* spp.

Keywords: Induction of resistance, Plant-parasitic nematodes, Nematicides.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### PRIMEIRA PARTE

|           |  |    |
|-----------|--|----|
| Figura 1  | Substâncias orgânicas voláteis de origem vegetal.....  | 18 |
| Figura 2  | Substâncias orgânicas voláteis utilizadas por plantas para o controle de insetos.....  | 19 |
| Figura 3  | Substâncias orgânicas voláteis liberadas por folhas atacadas por insetos ou fungos que ativam o sistema de defesa de folhas intactas da planta atacada ou de vizinhas.....                           | 21 |
| Figura 4  | Metabólitos ligados ao sistema de defesa de <i>Nicotiana attenuata</i> Steud e de <i>Ocimum basilicum</i> L., cuja produção foi aumentada pelas exposições destas plantas a jasmonato de metila..... | 23 |
| Figura 5  | Estrutura de substância que pode ser liberada pelas raízes de plantas e que faz parte do sistema de defesa das mesmas.....   | 24 |
| Figura 6  | Substâncias orgânicas voláteis produzidas por bactérias que aumentam a resistência de <i>Arabidopsis</i> sp. a pragas e doenças.....   | 25 |
| Figura 7  | Estruturas de alguns aminoácidos utilizados na síntese de proteínas.....   | 26 |
| Figura 8  | Estruturas de aminoácidos ativos contra nematoides.....  | 27 |
| Figura 9  | Aminoácidos comumente encontrados em plantas, que são produzidos em maiores quantidades em cultivares de algodão resistentes a nematoides.....   | 28 |
| Figura 10 | Estruturas de aminoácidos ativos contra insetos e animais.....   | 29 |
| Figura 11 | Estruturas de alcaloides com propriedades nematicidas.....   | 33 |
| Figura 12 | Estruturas de alguns alcaloides inibidores da acetilcolinesterase... 34  |    |
| Figura 13 | Estruturas de alcaloides cuja produção pelas plantas é estimulada por fungos.....  | 35 |
| Figura 14 | Fenóis com atividade nematicida.....   | 37 |
| Figura 15 | Fenol de origem vegetal que pode estar associado à resistência de plantas a nematoides.....  | 38 |
| Figura 16 | Fenol com atividade nematicida que foi isolado do fungo <i>Stereum</i> sp. ....  | 38 |
| Figura 17 | Estruturas de monossacarídeos comumente encontrados em plantas.....  | 39 |
| Figura 18 | Estrutura do nematicida sintético aldicarbe e da tioureia.....   | 44 |
| Figura 19 | Núcleo fundamental dos tetrazóis e heterociclo nitrogenado farmacologicamente ativo.....   | 45 |
| Figura 20 | Estrutura geral de substâncias tetrazólicas ativas contra nematoides.....  | 46 |

## SEGUNDA PARTE - ARTIGO 1

- Figura 1 Concentrações de alcaloides, aminoácidos, carboidratos, sacarose e fenóis, nas raízes de *Coffea arabica* cuja parte aérea foi pulverizada com soluções das combinações de jasmona + jasmonato de metila (1 e 7), (Z)-hex-3-en-1-ol + (E)-hex-3-en-1-ol + (Z)-hex-2-en-1-ol + (E)-hex-2-enal (2 e 8), acetato de (E)-hex-2-enila + acetato de hexila (3 e 9), *meso*-butano-2,3-diol + butano-1,2-diol + butano-1,3-diol + butano-1,4-diol (4 e 10), 3-hidroxiбутан-2-ona + 4-hidroxiбутан-2-ona (5 e 11) ou acetato de linalila + nerolidol (6 e 12). Como controle, foi empregado Tween 80 (13). Nos tratamentos de 1 a 6, cada substância se encontrava na concentração de 0,5 mmol.L<sup>-1</sup>, enquanto nos tratamentos de 7 a 12 cada substância foi empregada na concentração de 1,0 mmol.L<sup>-1</sup>. Barras com as mesmas letras em cada gráfico não diferem entre si, pelo teste de Scott & Knott ( $P \leq 0,05$ ) ..... 75
- Figura 2 Metabólitos identificados e quantificados nas raízes de cafeeiro (*Coffea arabica*) com o uso da espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio. As plantas foram pulverizadas com combinações de jasmona + jasmonato de metila (1 e 7), (Z)-hex-3-en-1-ol + (E)-hex-3-en-1-ol + (Z)-hex-2-en-1-ol + (E)-hex-2-enal (2 e 8), acetato de (E)-hex-2-enila + acetato de hexila (3 e 9), *meso*-butano-2,3-diol + butano-1,2-diol + butano-1,3-diol + butano-1,4-diol (4 e 10), 3-hidroxiбутан-2-ona + 4-hidroxiбутан-2-ona (5 e 11) ou acetato de linalila + nerolidol (6 e 12). Como controle foi empregado Tween 80 (13). Nos tratamentos de 1 a 6, cada substância se encontrava na concentração de 0,5 mmol.L<sup>-1</sup>, enquanto nos tratamentos de 7 a 12 cada substância foi empregada na concentração de 1,0 mmol.L<sup>-1</sup>. Barras com as mesmas letras, em cada gráfico, não diferem entre si, pelo teste de Scott & Knott ( $P \leq 0,05$ ) ..... 77
- Figura 3 Escores das análises de componentes principais dos espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio dos extratos das raízes de *Coffea arabica* (Tx.y, sendo “x” correspondente ao tratamento e “y”, o número de repetição). As plantas foram pulverizadas com combinações de jasmona + jasmonato de metila (tratamentos 1 e 7), (Z)-hex-3-en-1-ol + (E)-hex-3-en-1-ol + (Z)-hex-2-en-1-ol + (E)-hex-2-enal (tratamentos 2 e 8), acetato de (E)-hex-2-enila + acetato de hexila (tratamentos 3 e 9), *meso*-

butano-2,3-diol + butano-1,2-diol + butano-1,3-diol + butano-1,4-diol (tratamentos 4 e 10), 3-hidroxiбутан-2-ona + 4-hidroxiбутан-2-ona (tratamentos 5 e 11), acetato de linalila + nerolidol (tratamentos 6 e 12). Como controle foi empregado Tween 80 (tratamento 13). Nas combinações de 1 a 6, cada substância foi empregada na concentração de 0,5 mmol.L<sup>-1</sup>, enquanto, nas combinações de 7 a 12, cada substância estava na concentração de 1.0 mmol.L<sup>-1</sup> ..... 79

## SEGUNDA PARTE - ARTIGO 2

Figura 1 Núcleo fundamental dos tetrazóis e estrutura do cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio ..... 109

## SUMÁRIO

|              |  |    |
|--------------|--|----|
|              | <b>PRIMEIRA PARTE</b> .....  | 12 |
| <b>1</b>     | <b>INTRODUÇÃO</b> .....  | 12 |
| <b>2</b>     | <b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....   | 14 |
| <b>2.1</b>   | <b>Nematoides do gênero <i>Meloidogyne</i></b> .....   | 14 |
| <b>2.2</b>   | <b>Formas de controle de <i>Meloidogyne spp.</i></b> .....   | 15 |
| <b>2.3</b>   | <b>Substâncias orgânicas voláteis (SOV) empregadas como sinalizadoras por plantas</b> .....                            | 17 |
| <b>2.4</b>   | <b>Substâncias orgânicas não voláteis de origem vegetal ativas contra nematoides</b> .....                             | 25 |
| <b>2.4.1</b> | <b>Aminoácidos</b> .....   | 26 |
| <b>2.4.2</b> | <b>Alcaloides</b> .....  | 29 |
| <b>2.4.3</b> | <b>Fenóis</b> .....  | 36 |
| <b>2.4.4</b> | <b>Carboidratos</b> .....  | 39 |
| <b>2.4.5</b> | <b>Outras estruturas</b> .....   | 41 |
| <b>2.5</b>   | <b>Substâncias orgânicas sintéticas ativas contra nematoides</b> .....   | 44 |
|              | <b>REFERÊNCIAS</b> .....   | 47 |
|              | <b>SEGUNDA PARTE</b> .....   | 60 |
|              | <b>ARTIGO 1 Substâncias orgânicas voláteis no controle de <i>Meloidogyne exigua</i> em <i>Coffea arabica</i></b> ..... | 60 |
|              | <b>ARTIGO 2 Efeito <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de substâncias orgânicas sobre <i>Meloidogyne spp.</i></b> .....   | 96 |

## PRIMEIRA PARTE

### 1 INTRODUÇÃO

A agricultura mundial enfrenta um cenário complexo, com oscilações nos valores de comercialização de seus produtos, o que contribui para a diminuição dos investimentos em manejo cultural. Em decorrência disso, pode-se observar um aumento da incidência de doenças, dentre as quais merecem destaque as causadas por nematoides parasitas de plantas, que podem ser chamados de fitonematoides. Além de não apresentarem a desejada eficiência, os métodos empregados para o controle destes patógenos acarretam problemas, como o aumento do custo de produção e a contaminação de seres humanos e do ambiente com as substâncias presentes nos vários produtos comerciais ativos contra nematoides. Consequentemente, torna-se necessário o desenvolvimento de novos métodos de controle de nematoides parasitas de plantas que possam solucionar tais problemas (Chitwood, 2002; Filgueira, 2000).

Dentre as diversas espécies de fitonematoides, destacam-se aquelas do gênero *Meloidogyne*, que são responsáveis por grandes prejuízos na produção agrícola (Sasser & Freckman, 1987; Koenning et al., 1999; Chitwood, 2003). Um exemplo simples pode ser observado na cultura do café, que é de grande importância para o estado de Minas Gerais, no qual são produzidos 49,10% do café brasileiro (Conab, 2011). Acredita-se que a infestação das áreas agrícolas com nematoides fitoparasitas cause perdas anuais da ordem US\$ 125 bilhões no mundo (Chitwood, 2003).

Com vistas a contribuir para a solução de tais problemas, no presente trabalho abordaram-se duas possibilidades. A primeira delas consistiu em averiguar se o uso de substâncias orgânicas voláteis poderia aumentar a resistência de cafeeiros a *Meloidogyne exigua* Goeldi, que é um nematoide

amplamente disseminado pelos cafezais brasileiros (Campos et al., 1997; Oliveira et al., 2005; Castro et al., 2008). Além disso, buscou-se, também, investigar os mecanismos de ação de tais substâncias voláteis. Na segunda possibilidade, substâncias orgânicas com potencial atividade nematicida, segundo dados da literatura ou segundo testes previamente realizados, foram submetidas a testes *in vitro* e *in vivo* para que suas atividades contra *M. exigua*, *M. incognita* (Kofoid & White) Chitwood e *M. javanica* (Treub) Chitwood, pudessem ser avaliadas.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Nematoides do gênero *Meloidogyne*

Os nematoides do gênero *Meloidogyne*, vulgarmente conhecidos como nematoides de galhas, são endoparasitas sedentários. Várias são as espécies incluídas neste gênero, sendo *M. exigua*, *M. incognita* e *M. javanica* as principais causadoras de prejuízos na agricultura (Nasu et al., 2010; Marchese et al., 2010).

Com a finalidade de completar seus ciclos de vida, estes patógenos invadem as raízes de plantas susceptíveis, nas quais induzem uma grande transformação em determinadas células do hospedeiro, que passam a fornecer os nutrientes necessários para que possam completar todo o seu ciclo de vida. Na fase adulta, as fêmeas do nematoide depositam seus ovos em uma massa gelatinosa que, geralmente, é exposta para a parte de fora da raiz. Dentro de poucas horas após a liberação do ovo, começa o desenvolvimento do embrião, resultando na formação de uma larva (Tihohod, 2000).

Nestes ovos, a multiplicação celular se torna intensa, com vários processos mitóticos e meióticos, até chegar à formação dos juvenis de primeiro estágio (J1). Logo após, é formado o juvenil de segundo estágio (J2), que rompe as camadas do ovo e migra até a raiz da planta. Geralmente, a penetração ocorre na coifa da raiz. O J2 migra até um local específico, onde as células não estão diferenciadas e, em seguida, induz a formação do seu sítio de alimentação no parênquima vascular (Zhao; Schmitt; Hawes, 2000). Após aproximadamente quatorze dias, ocorre a formação do juvenil do terceiro estágio (J3) e, mais a seguir, do quarto estágio (J4). Por fim, ocorre a formação da fase adulta, durante a qual a fêmea, com corpo em formato piriforme, inicia o desenvolvimento reprodutivo, com crescimento das gônadas funcionais, com posterior produção

de ovos e liberação dos mesmos no solo, para o início de um novo ciclo do nematoíde. Quanto aos machos, eles possuem corpo vermiforme e não se alimentam. Uma vez formados, migram para o solo, onde permanecem até a morte (Eisenback & Triantaphyllou, 1991).

## **2.2 Formas de controle de *Meloidogyne* spp.**

Uma das possibilidades para o controle de fitonematoides é o emprego de métodos culturais, como, por exemplo, a rotação com culturas resistentes ou não hospedeiras (Ferraz & Freitas, 2004). Outra possibilidade diz respeito ao emprego de coberturas verdes, já que há várias plantas produtoras de substâncias tóxicas a nematoides (Lopes et al., 2005; Neves et al., 2005). Apesar de tais métodos serem de grande valor, demandam planejamento, já que se faz necessário o investimento de tempo e dinheiro para que possam alcançar sucesso. Além disso, existem várias culturas, principalmente as perenes, que apresentam grandes dificuldades para a implementação de tais metodologias (Blum; Cares; Uesugi, 2006; Starr; Bridge; Cook, 2002).

Em princípio, os nematoides das galhas podem ser controlados, em algumas culturas, pelo uso de genes para resistência, como é o caso do gene *Mi*, proveniente de *Solanum peruvianum* (Pi 128657) (Watts), que foi empregado para conferir resistência a tomateiros comerciais (Rossi et al., 1998; Gilbert & Mcguirre, 1956). No entanto, populações de *Meloidogyne* spp. capazes de contornar tal resistência já foram identificadas. Também se observa que, em vários casos, esses genes de resistência são ineficientes em temperaturas elevadas no solo (Dropkin, 1969).

Outra possibilidade para o controle de *Meloidogyne* spp. consiste em fazer enxertia, o que tem resolvido parcialmente o problema de produção de café em locais contaminados por nematoides (Fahl et al., 1998; Costa; Gonçalves;



Fasuoli, 1991).

Outras medidas de controle de *Meloidogyne* spp. se baseiam na utilização de organismos considerados inimigos naturais de fitonematoides, tais como fungos, bactérias e nematoides predadores (Kerry, 1990). Especificamente no caso dos fungos, há vários nematófagos, no Brasil (Ferraz et al, 1992; Ribeiro et al., 1999a), que utilizam redes ou nódulos adesivos tridimensionais para aprisionar, infectar e colonizar o nematoide. Há também aqueles que empregam seus micélios como armadilhas ou produzem esporos que aderem à cutícula do nematoide. Dentre as bactérias, destaca-se a *Pasteuria penetrans*, que pode atuar sobre a fêmea do nematoide das galhas inibindo a produção de ovos ou, mesmo, impedindo o juvenil de segundo estágio (J2) de penetrar nas raízes, atuando assim como um nematicida biológico.

Apesar da eficiência observada em vários experimentos, tais agentes de controle biológico ainda não podem ser produzidos e utilizados de forma economicamente viável (Sasser & Carter, 1985; Karsen, 2002; Pimentel; Peixoto; Paz, 2009).

Embora os métodos acima mencionados apresentem vantagens, principalmente no aspecto ecológico, o uso de substâncias nematicidas de origem sintética ainda faz parte dos procedimentos mais empregados para o controle de fitonematoides. Em grande parte, isto se deve ao fato de tais substâncias representarem a possibilidade mais viável, sob o aspecto econômico, após o estabelecimento da cultura (Mashela; Shimelis; Mudau, 2008; Hafez & Sundararaj, 2000). Entretanto, os nematicidas de origem sintética atualmente em uso são altamente tóxicos a seres humanos e a organismos benéficos. Além disso, como os nematoides podem ser disseminados no solo, faz-se necessária a aplicação de grandes quantidades de substâncias com equipamentos especializados. Conseqüentemente, observa-se forte demanda por novos métodos de controle de nematoides (Ferraz & Freitas, 2004). Para tanto, a

utilização de substâncias orgânicas voláteis e não voláteis de origem vegetal, bem como de novas substâncias sintéticas de baixa toxicidade ao homem e ambiente, é uma possibilidade bem promissoras (Arab & Bento, 2006).

### **2.3 Substâncias orgânicas voláteis (SOV) empregadas como sinalizadoras por plantas**

Estima-se que algo em torno de 1.700 substâncias orgânicas voláteis (SOV) de plantas, oriundas de mais de 90 famílias, já tenham sido identificadas (Knudsen & Gershenzon, 2006). Em geral, são classificadas como estruturas químicas de baixa polaridade que possuem alta pressão de vapor, com capacidade de atravessar as membranas com facilidade para serem liberadas no solo e na atmosfera (Dudareva et al., 2006). Na grande maioria dos casos, são terpenoides, fenilpropanoides e derivados de aminoácidos, carotenos e de ácidos graxos (Figura 1).

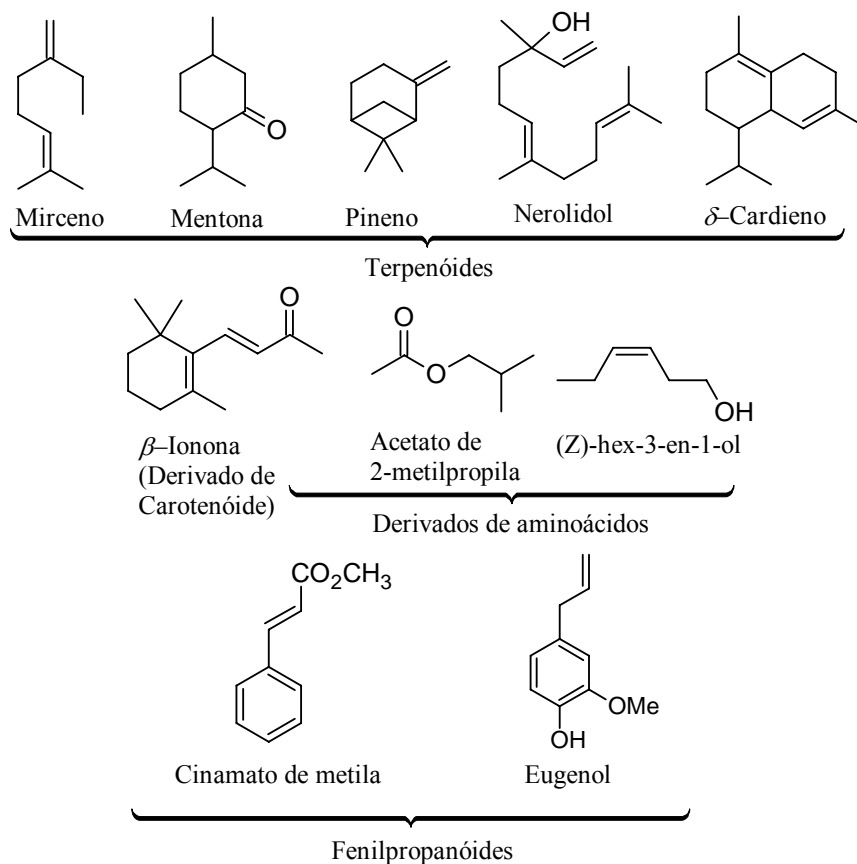


Figura 1 Substâncias orgânicas voláteis de origem vegetal

Quando sofrem danos por fatores bióticos ou abióticos, as plantas emitem respostas de defesa, com a síntese e a liberação de SOV no local afetado ou de maneira sistêmica (Rose et al., 1996; Paré et al., 2005; Paré & Tumlinson, 1999; Arimura; Kost; Boland, 2005; Roda & Baldwin, 2003). Uma das SOV produzidas é o jasmonato de metila (Figura 3) (Rodriguez-Saona et al., 2001), que pode ativar genes de defesa na planta (Bate & Rothstein, 1998).

Dentre as várias rotas biossintéticas para a produção de SOV, pode-se mencionar, por exemplo, a síntese de terpenoides pelas vias do mevalonato e do 1-deoxixilulose-5-fosfato (Lichtenthaler et al., 1997).

Também é possível mencionar que plantas de batata (*Solanum tuberosum* L.) infestadas com o besouro-da-batata-do-colorado *Leptinotarsa decemlineata* (Say) liberam o (Z)-hex-3-en-1-ol (Figura 1), que atrai o percevejo rajado *Bioculatus Perillus* (Fabr.) para atuar como predador do besouro (Weissbecker; Van Loon; Dicke, 1999). Outro exemplo pode ser observado quando plantas de milho (*Zea mays* L.) sofrem danos artificiais em folhas tratadas com o material regurgitado por larvas de *Spodoptera exigua* (Hübner). Em decorrência de tal tratamento, as plantas liberam SOV que causam repelência ao pulgão *Rhopalosiphum maidis* (Fitch) (Bernasconi et al., 1998).

Algumas SOV também podem ter ação direta contra agentes patogênicos ou insetos. Um exemplo é o efeito repelente ou tóxico dos monoterpenos  $\beta$ -pineno e 3-careno (Figura 2), que são produzidos por *Pinus ponderosa* (Lawson), quando sob a herbivoria de larvas de mariposas (*Halisidota ingens* Hy. Edwards) (Litvak & Monson, 1998).

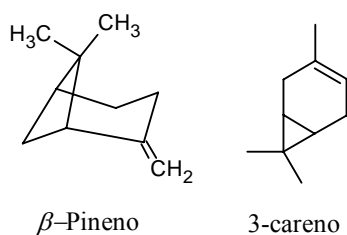


Figura 2 Substâncias orgânicas voláteis utilizadas por plantas para o controle de insetos

Observa-se, em alguns casos, que plantas atacadas por pragas ou doenças liberam SOV que podem afetar plantas vizinhas. Este é o caso, por exemplo, de *Phaseolus lunatus* L. que, ao ser atacada por ácaros herbívoros,

libera (Z)-hex-3-en-1-ol (Figura 1), (E)-hex-2-enal e acetato de (Z)-hex-3-enila (Figura 3), que ativam várias proteínas relacionadas ao sistema de defesa em plantas vizinhas não atacadas pelo inseto (Arimura et al, 2001; Kost & Heil, 2006). Sabe-se também que as plantas de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh, expostas a (E)-hex-2-enal, (Z)-hex-3-enal, (Z)-hex-3-en-1-ol ou *allo*-ocimeno (Figura 3), têm maior resistência ao fungo *Botrytis cinerea* (Kishimoto et al., 2005). Segundo Bate & Rothstein (1998), o (E)-hex-2-enal (Figura 3) ativa vários genes em plântulas de *Arabidopsis* sp. que estão envolvidos com o sistema de defesa da planta. Tais resultados foram confirmados por Kishimoto et al. (2006), segundo os quais algumas substâncias voláteis induzem o aumento da lignificação em *A. thaliana*, o que torna a penetração do fungo *B. cinerea* mais difícil. Ademais, ocorre o acúmulo de substâncias antifúngicas como a camalexina, que inibe o crescimento fúngico no interior da planta.

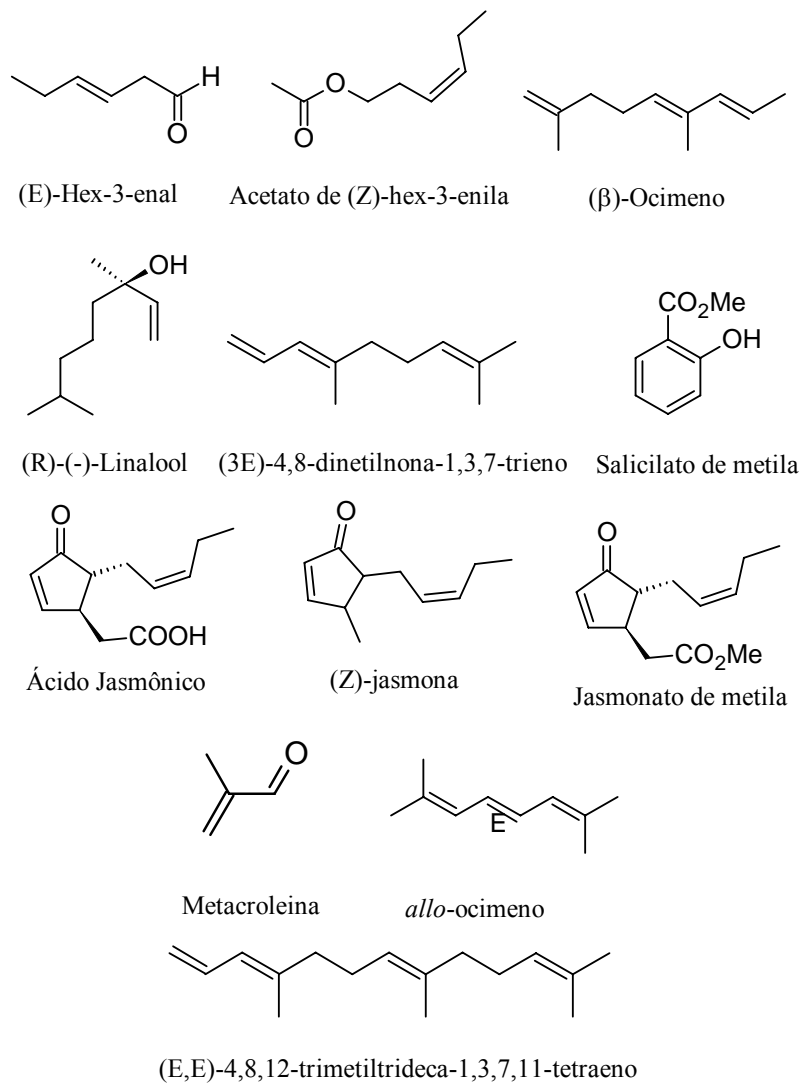


Figura 3 Substâncias orgânicas voláteis liberadas por folhas atacadas por insetos ou fungos que ativam o sistema de defesa de folhas intactas da planta atacada ou de vizinhas

Também é possível mencionar *Artemisia tridentata tridentata* Nutt. que, ao liberar várias substâncias pela parte aérea como jasmonato de metila, metacroleína (Figura 3) e alguns terpenoides, torna plantas de *Nicotiana*

*attenuata* Steud mais preparadas para a resistência a insetos herbívoros. Quando atacadas por lagartas de *Manduca sexta* L., ocorre uma acelerada produção de inibidores da tripsina proteinase em indivíduos de *N. attenuata*, nas proximidades da planta *A. tridentata* (Kessler et al., 2006).

Uma potencial forma de aproveitar tal comportamento diz respeito à liberação de substâncias orgânicas voláteis na proximidade de plantas que se queira proteger de algum ataque. Cientes disso, Heil & Kost (2006) liberaram, em baixa concentração, durante 24 horas, uma mistura de acetato de (*Z*)-hex-3-enila,  $\beta$ -ocimeno, (*R*)-(-)-linalool, (3*E*)-4,8-dimetilnona-1,3,7-trieno, salicilato de metila, (*Z*)-jasmona,  $\beta$ -cariofileno e (3*E*,7*E*)-4,8,12-trimetiltrideca-1,3,7,11-tetraeno (Figura 1 e 3), na presença de *P. lunatus*. A seguir, fizeram danos mecânicos na planta e avaliaram as respostas do seu sistema de defesa, o que permitiu observar que os indivíduos submetidos à referida mistura de substâncias voláteis tinham apresentado resposta 180% superior à daqueles sem qualquer exposição. (Keinanen; Oldham; Baldwin, 2001) também utilizaram tal possibilidade ao exporem *N. attenuata* Steud a jasmonato de metila (Figura 3). Com isso, as concentrações de alguns metabólitos diretamente ligados ao sistema de defesa da planta (cafeoilputrescina, nicotina - Figura 4 - e diterpenos glicosilados) aumentaram sensivelmente nas folhas.

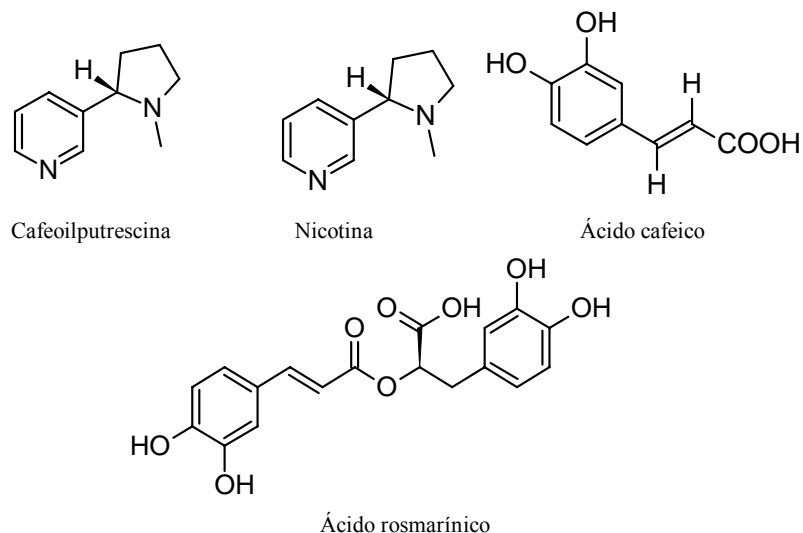


Figura 4 Metabólitos ligados ao sistema de defesa de *Nicotiana attenuata* Steud e de *Ocimum basilicum* L., cuja produção foi aumentada pelas exposições destas plantas a jasmonato de metila

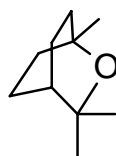
Ao se borrifar *Ocimum basilicum* L. com soluções de jasmonato de metila (Figura 3) a 0,1 e 0,5 mmol/L, Kim et al. (2006) observaram grande aumento nas concentrações de ácido rosmarínico, ácido cafeico (Figura 4), (R)-(-)-linalool e de eugenol (Figuras 3 e 1). Em trabalho subsequente, verificou-se que o jasmonato de metila induz o aumento da produção das enzimas lipoxigenase (LOX), ácido 4-hidroxicinamicolase (C4H), pterinato desidrogenase (PDH), polifenol oxidase (PPO), ácido fosfatase (APase) e pentatricopeptídeo repetidora (PPR), que têm papel fundamental na produção dos metabólitos secundários da referida planta (Li et al., 2007). Da mesma forma, (Cooper; Jia; Goggin, 2005) obtiveram resultados que indicam uma resposta de defesa sistêmica que reduz a reprodução de *Meloidogyne incognita* em plantas de tomate pulverizadas com solução de ácido jasmônico (Figura 3) na concentração de 1,5 mmol/L. Com plântulas de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don e *Cinchona ledgeriana* (Howard) Bern. Moens ex Trimen, observou-se que



a produção de alcaloides era duplicada quando tais plantas eram expostas a jasmonato de metila na concentração de 1 µg/mL (Aerts et al, 1994).

Segundo Chen et al. (2004), quando a planta *Solanum lycopersicon* L. é exposta a jasmonato de metila, ocorre aumento da atividade de arginase, que é uma enzima de grande importância no metabolismo do aminoácido L-arginina para a produção de poliaminas e de óxido nítrico. Em *Picea abies* (L.) H. Karst., a referida SOV induz a formação de uma oleoresina rica em terpenoides que protege a planta de pragas e doenças (Martin et al., 2002).

A liberação da SOV não se dá apenas pela parte aérea. Sabe-se, por exemplo, que, quando atacadas por bactérias patogênicas ou por insetos predadores, as raízes de plantas podem liberar substâncias como o 1,8-cineol (Figura 5), também conhecido como eucaliptol (Rocha & Santos, 2007).



1,8-cineol

Figura 5 Estrutura de substância que pode ser liberada pelas raízes de plantas e que faz parte do sistema de defesa das mesmas

Também vale mencionar que o efeito promotor do crescimento de plantas por rizobactérias pode ser, em grande parte, decorrente da produção de substâncias orgânicas voláteis por tais microrganismos. Em trabalhos recentes (Ryu et al., 2003; Ryu et al., 2004; Farag et al, 2006) foi observado que butano-2,3-diol, acetoína (Figura 6) e análogos, produzidos por *Bacillus* spp., são capazes de ativar vários genes relacionados ao sistema de defesa de *Arabidopsis* sp.

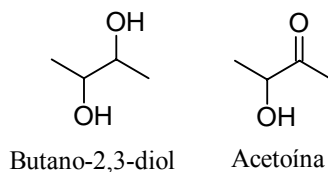


Figura 6 Substâncias orgânicas voláteis produzidas por bactérias que aumentam a resistência de *Arabidopsis* sp. a pragas e doenças

Em trabalho preliminarmente realizado pelo Grupo de Produtos Naturais da Universidade Federal de Lavras (UFLA), verificou-se que a população de *Meloidogyne incognita* podia ser reduzida nas raízes de feijoeiros suscetíveis a tal nematoide pela aplicação foliar de uma combinação de linalool e nerolidol (Figuras 3 e 1), na concentração de 0,5 mmol/mL. Como foi verificado que tal combinação não tinha qualquer efeito *in vitro* sobre os juvenis do segundo estágio de tal nematoide, acredita-se que a redução populacional observada tenha ocorrido em decorrência de ativação de mecanismos de defesa da planta (Machado et al., 2008a).

#### **2.4 Substâncias orgânicas não voláteis de origem vegetal ativas contra nematoides**

Durante o processo de defesa da planta contra doenças, pode ocorrer a produção de vários metabólitos secundários, cuja ação contra os agentes patogênicos pode ser direta ou indireta (Chitwood, 2002). Logo, o estudo de tais substâncias também pode ser de grande importância para o desenvolvimento de métodos mais eficientes para o controle de nematoides parasitas de plantas.

### 2.4.1 Aminoácidos

Os aminoácidos estão envolvidos na formação de praticamente todos os compostos nitrogenados de origem vegetal: alcaloides, glicosídeos cianogênicos, proteínas, porfirinas, purinas, citoquininas, etc. Podem ser divididos em dois grupos: os não proteicos e os proteicos, que perfazem um total de 20 substâncias (Barbosa, 2004; Harborne, 1998; Wink, 1997). A primeira substância orgânica nitrogenada produzida pela planta é a glutamina (Figura 7), que é empregada na síntese do ácido L-glutâmico (Figura 7). Este, por sua vez, é utilizado na síntese de outros aminoácidos (Harborne, 1998; Lea, 1997).

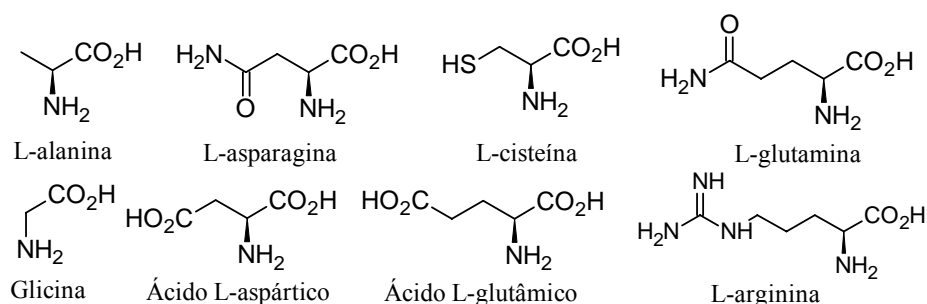


Figura 7 Estruturas de alguns aminoácidos utilizados na síntese de proteínas

Recentemente, o Grupo de Pesquisas em Produtos Naturais da Universidade Federal de Lavras (UFLA) realizou um trabalho com *M. exigua* que permitiu detectar a atividade nematicida de aminoácidos de origem bacteriana (Oliveira et al., 2008). Alguns aminoácidos de fontes comerciais também foram submetidos a testes *in vitro* com *M. exigua*, o que permitiu observar que L-cisteína (Figura 7) era o mais ativo de todos, com CL<sub>50</sub> de 283 g.L<sup>-1</sup>. Nas mesmas condições, o nematicida comercial Aldicarbe apresentou CL<sub>50</sub> de 26 g.L<sup>-1</sup>. Quando submetido a teste com plantas de cafeeiro infectadas com

*M. exigua*, o aminoácido L-cisteína a  $8.480 \text{ g.L}^{-1}$  reduziu a população de nematoides a níveis estatisticamente iguais aos obtidos quando se empregou o nematicida comercial aldicarbe a  $500 \text{ g.L}^{-1}$ .

O resultado obtido está em sintonia com o trabalho realizado por Oka & Cohen (2001), que observaram a atividade do ácido DL- $\beta$ -aminobutírico (Figura 8) contra *Heterodera avenae* Wollenweber. De forma análoga, foi verificada a atividade de DL-metionina contra *M. incognita* (Talavera & Mizukubo, 2005; Tsai & Van Gundy, 1988). O mecanismo exato de controle destes nematoides por estes aminoácidos ainda não foi determinado. Contudo, existe a ênfase que a concentração dos D-aminoácidos na extremidade da raiz pode interferir na nutrição do nematoide.

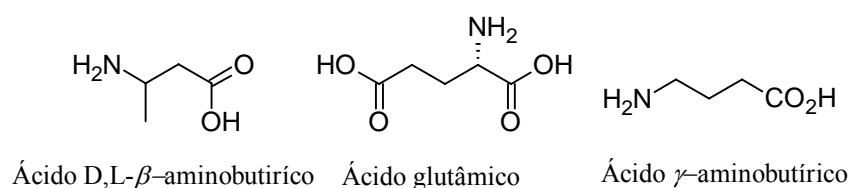


Figura 8 Estruturas de aminoácidos ativos contra nematoides

O ácido glutâmico e o ácido  $\gamma$ -aminobutírico (Figura 8) são substâncias ligantes mediadoras, que abrem os canais de cloro de forma irreversível, sendo a última substância um transmissor inibitório na junção neuromuscular. Especificamente nos nematoides, agem no sistema nervoso e na musculatura, aumentando a inibição da neurotransmissão, o que causa a paralisia e a morte dos nematoides (Sangster; Song; Demeler, 2005). Tais dados parecem em consonância com o trabalho desenvolvido por Perry e Maule (2004), segundo os quais o ácido  $\gamma$ -aminobutírico (Figura 8) pode causar paralisia flácida dos músculos de nematoides e, especificamente em *Ascaris suum* Goeze, observou-se que tal substância inibia os neurônios responsáveis pelo nervo ventral.

Também se observa que glutamatos induzem tanto respostas inibitórias quanto excitatórias em nematoides e que há evidências de que glicina (Figura 7) pode ter importante papel no sistema nervoso central desses animais (Gasol, 2004).

Tem-se observado significativa variação na quantidade e na proporção de aminoácidos em plantas infectadas com nematoides. Embora ainda não seja possível entender completamente tal variação, existem indícios de que plantas resistentes produzam mais aminoácidos. Este é o caso, por exemplo, de algodão (*Gossypum hirsutum* L.), pois Hedin & Creech (2001) verificaram que mudas resistentes aumentaram as concentrações dos aminoácidos metionina, lisina, ácido aspártico, arginina, alanina e ácido glutâmico (Figura 7, 8, 9) nas raízes, quando comparadas com mudas suscetíveis.

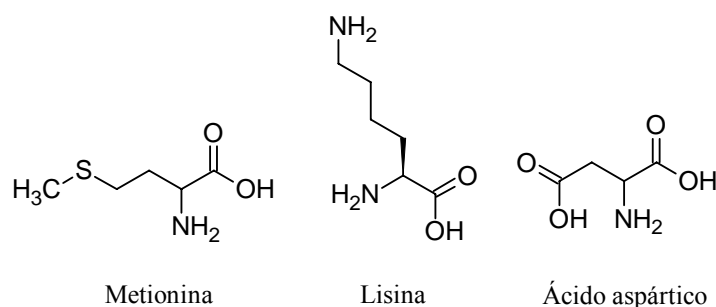


Figura 9 Aminoácidos comumente encontrados em plantas, que são produzidos em maiores quantidades em cultivares de algodão resistentes a nematoides

Os resultados até agora obtidos têm demonstrado que a utilização de aminoácidos como ingredientes ativos em produtos nematicidas não parece viável, pois não foram muito eficientes nos testes realizados. No entanto, é importante ressaltar que apenas uma parte muito pequena dos mais de 900 aminoácidos de origem vegetal (Harborne, 1998; Wink, 1997; Rozan; Kuo; Lambein, 2000; Bell, 2003) foi testada até o momento. Também vale mencionar

que várias dessas estruturas ainda não testadas contra nematoides podem fazer parte do mecanismo de defesa das plantas contra outros organismos. Um exemplo é a L-canavanina (Figura 10), que algumas espécies da família Leguminosae utilizam como inseticida (Mitri et al., 2009; Rosenthal, 2001). Outro exemplo é o ácido L-pipecólico (Figura 10), que simplesmente repele alguns insetos (Bell, 2003). Também é possível citar aqui a mimosina (Figura 10), que protege espécies de *Leucaena* de animais herbívoros (Hammond, 1995).

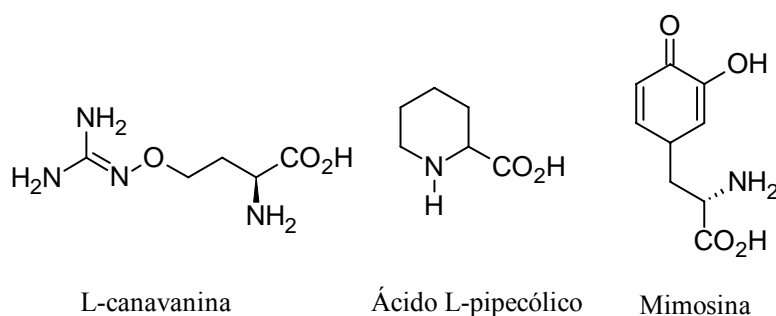


Figura 10 Estruturas de aminoácidos ativos contra insetos e animais

Com base no exposto até o presente momento, conclui-se que é de grande importância averiguar se os aminoácidos podem estar relacionados com o mecanismo de defesa de plantas contra nematoides.

#### 2.4.2 Alcaloides

Em geral, o acúmulo de vários alcaloides em plantas é induzido por fungos, íons de metais pesados, radiação ultravioleta, e choque osmótico (Hashimoto & Yamada, 1994; Kutchan & Zenk, 1993; Meijer; Verpoorte; Hoge, 1993). Além disso, muitos dos alcaloides descritos na literatura atuam na defesa das plantas contra herbívoros e patógenos (Caporale, 1995; Wink, 1999). Há também dados que apontam para a utilização de alcaloides pelo sistema de

defesa de plantas contra fitonematoides (Chitwood, 2002) (Tabela 1).

Um dos primeiros relatos de alcaloide com atividade nematicida ocorreu para a fisostigmina, também conhecida como eserina (Tabela 1), que foi isolada de *Physostigma venosum* Balf. Tal substância podia imobilizar irreversivelmente *Ditylenchus dipsaci* (Kuhn) Filipjev, quando na concentração de 1.000  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  (Bijloo, 1965). Desde então, vários outros alcaloides com atividade nematicida foram identificados (Tabela 1).

Tabela 1 Estruturas e nomes de alcaloides com atividade nematicida, plantas das quais podem ser isolados e nematoides contra os quais são ativos (Chitwood, 2002)

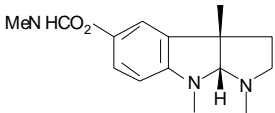
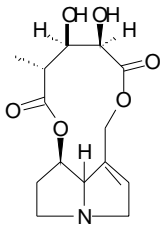
| Alcaloide  | Planta  | Nematoide   |
|--|---|---|
|  <p>Eserina</p>        | <p><i>Physostigma</i><br/><i>Venosum</i> Balf.</p>    | <p><i>Ditylenchus dipsaci</i><br/>(Kuhn) Filipjev.</p>            |
|  <p>Monocrotalina</p> | <p><i>Crotalaria</i><br/><i>spectabilis</i> Roth.</p> | <p><i>Meloidogyne incognita</i> Kofoid e<br/>White) Chitwood.</p> |

Tabela 1, continuação

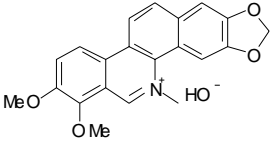
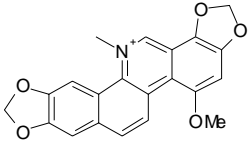
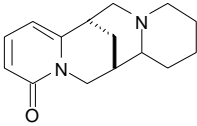
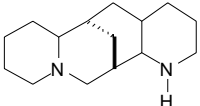
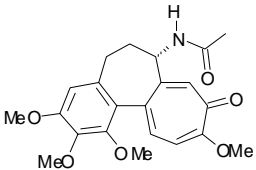
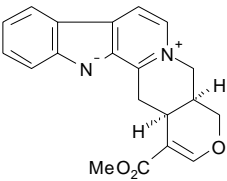
|   |                                     |  |
|---|-------------------------------------|--|
|    | <i>Bocconia cordata</i><br>Willd.   | <i>Rhabditis</i> sp.* e <i>Panagrolaimus</i> sp.*      |
| Queleritina   | <i>Bocconia cordata</i><br>Willd.   | <i>Rhabditis</i> sp.* e <i>Panagrolaimus</i> sp.*      |
|    | <i>Bocconia cordata</i><br>Willd.   | <i>Rhabditis</i> sp.* e <i>Panagrolaimus</i> sp.*      |
| Boconina  | <i>Sophora flavescens</i><br>Aiton. | <i>Bursaphelenchus xylophilus</i><br>Steiner e Buhner. |
|  | <i>Sophora alopecuroides</i> L.     | <i>Bursaphelenchus xylophilus</i><br>Steiner e Buhner. |
| Citisina  |                                     |  |



Tabela 1, conclusão

|   |   |   |
|---|---|---|
|    | <i>Sophora alopecuroides</i> L.         | <i>Bursaphelenchus xylophilus</i><br>Steiner e Buhner.  |
| Aloperina   | <i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don. | <i>Meloidogyne incognita</i> (Kofoid e White) Chitwood. |
|    | <i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don. | <i>Meloidogyne incognita</i> (Kofoid e White) Chitwood. |
| Colcichina  | <i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don. | <i>Meloidogyne incognita</i> (Kofoid e White) Chitwood. |
|  | <i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don. | <i>Meloidogyne incognita</i> (Kofoid e White) Chitwood. |
| Serpetina   | <i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don. | <i>Meloidogyne incognita</i> (Kofoid e White) Chitwood. |

\* Nematóide de vida livre

Também se pode mencionar aqui o trabalho de (Thoden; Boppré; Hallmann, 2007), que observaram atividade nematicida *in vitro* contra *M. incognita* (Kofoid e White) Chitwood, por parte do alcaloide 1,2-deidropirrolizidina. De forma análoga, verificou-se que ergostamina (Figura 11) é altamente eficiente para a imobilização de *Pratylenchus scribneri* Steiner (Panaccione, 2005) e que a atropina (Figura 11) inibe fortemente a eclosão de juvenis de *Heterodera rostochiensis* Stow (Schreiber & Sembdner).

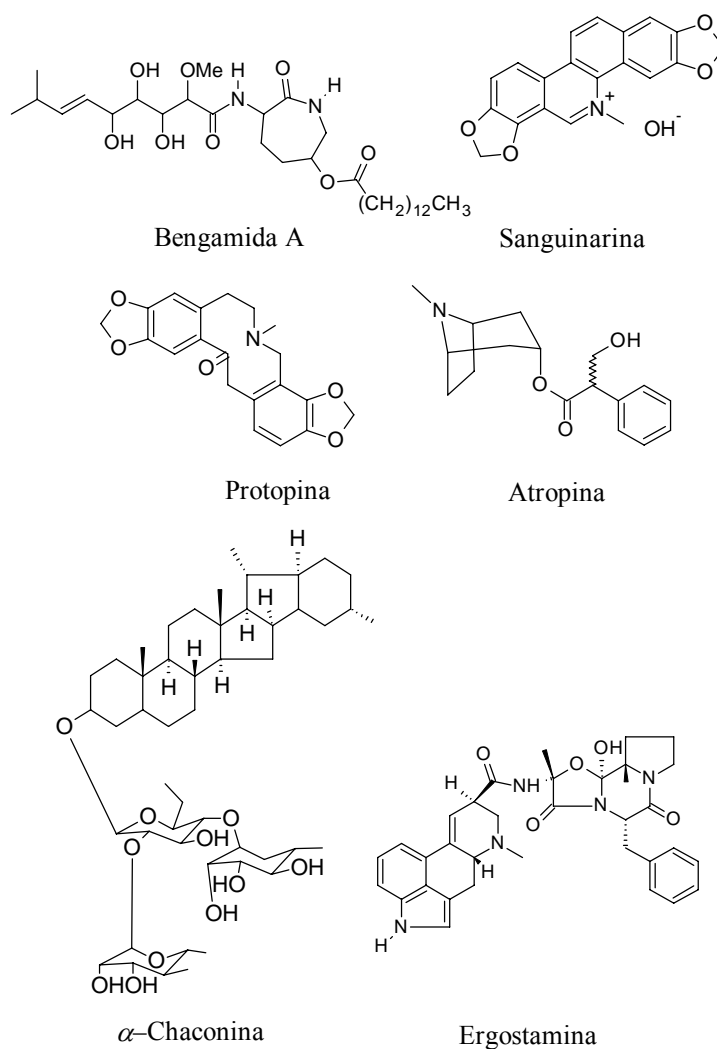


Figura 11 Estruturas de alcaloides com propriedades nematocidas

Além de apresentarem potencial para emprego no controle de nematoides parasitas de plantas, os alcaloides também têm sido estudados para o controle de espécies parasitas de animais e do homem. Satou et al. (2002a), por exemplo, observaram que queleritrina (Tabela 1) e sanguinarina (Figura 8) eram ativos contra o nematoide *Toxocara canis* Wener, um parasita de animais. De

forma análoga, (McDougal; Rico; Vanderveer, 1986) observaram que a bengamida A (Figura 11) atuava contra o nematoide *Nippostrongylus braziliensis* Travassos, enquanto a protopina (Figura 11) era ativa contra *Strongyloides ratti* Sandground, e *Strongyloides venezuelensis* Brumpt (Satou et al., 2002b).

Também é importante mencionar que vários alcaloides possuem forte atividade inibidora da acetilcolinesterase. Para exemplificar, é possível citar eserina, sanguinina, deidroevodiamina, turbinatina e hamaina (Tabela 1; Figura 12) (Houghton; Ren; Howes, 2006). Tal atividade é altamente relevante se levarmos em consideração que uma das formas de ação de substâncias orgânicas contra nematoides consiste em inibir a referida enzima (Opperman & Chang, 1990).

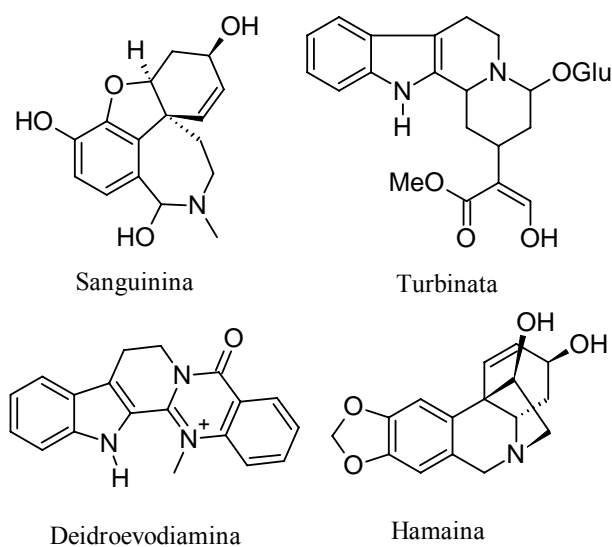


Figura 12 Estruturas de alguns alcaloides inibidores da acetilcolinesterase

Talvez a produção de alcaloides com propriedades nematicidas possa ser simplesmente um acaso em algumas espécies vegetais, mas há indícios de que

isso, na verdade, é parte de um mecanismo de defesa contra fitonematoides. Segundo Voinilo & Ponin (1979), a quantidade de glicoalcaloides é maior em cultivares de batata (*Solanum tuberosum* L.) resistente a nematoide. Ademais, observa-se que, quando expostas aos nematoides, tais cultivares aumentam sensivelmente a produção dos referidos alcaloides, especialmente a do glicoalcaloide  $\alpha$ -chaconina (Figura 11), que tem comprovada atividade nematicida *in vitro* (Allen et al., 1971).

Tais resultados são bastante razoáveis se levarmos em consideração que a principal função dos alcaloides em plantas é a defesa contra diversos organismos (Tingey, 1984). Sabe-se que a produção de vários deles é estimulada pela presença de agentes patogênicos. Além disso, podem ser citadas a ajmalicina e a catarantina (Figura 13), cuja produção é estimulada por fungos (Wink, 1997). Segundo Vázquez-Flota et al. (2004), danos artificiais em plântulas de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don resultaram em um aumento de 100% no conteúdo do alcaloide ajmalicina.

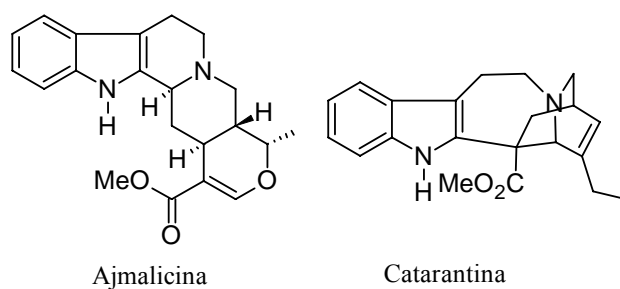


Figura 13 Estruturas de alcaloides cuja produção pelas plantas é estimulada por fungos

Por tudo o que foi exposto, fica claro que averiguar possíveis interações entre as respostas de plantas ao ataque por nematoides e a produção de alcaloides pelas mesmas pode ser de grande importância para o desenvolvimento

de novos métodos de controle desses organismos.

### 2.4.3 Fenóis

Dentre todos os fenóis de origem vegetal, talvez os mais conhecidos pela sociedade em geral sejam os flavonoides, que são sintetizados a partir da via dos fenilpropanoides. São amplamente distribuídos entre as plantas e podem ser encontrados em diversas formas estruturais. A maioria dos flavonoides possui 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental, que é constituído de duas fenilas ligadas por uma cadeia de três átomos de carbono (Simões et al., 2000).

Os fenóis desempenham papel específico na contenção da hipersensibilidade na planta causada pelo patógeno (Dignum; Kerlaer; Verpoorte, 2001). Portanto, vários fenóis apresentam potencial para uso no controle de nematoides parasitas de plantas. Para exemplificar, é possível mencionar o trabalho realizado por Choi et al. (2007), que observaram a atividade nematicida de carvacrol e timol (Figura 14), quando trabalhavam com o nematoide *Bursaphelenchus xylophilus* Steiner e Buhner. De forma análoga, Oka et al. (2000) observaram que o carvacrol e o timol (Figura 14) reduziram a população do nematoide *Meloidogyne javanica* (Treub) em raízes de *Cucumis sativus* L. Ao estudar vários alquilfenóis, Takaishi et al. (2004) observaram que o 3-nonilfenol (Figura 14) apresentava elevada atividade contra o nematoide *B. xylophilus*.

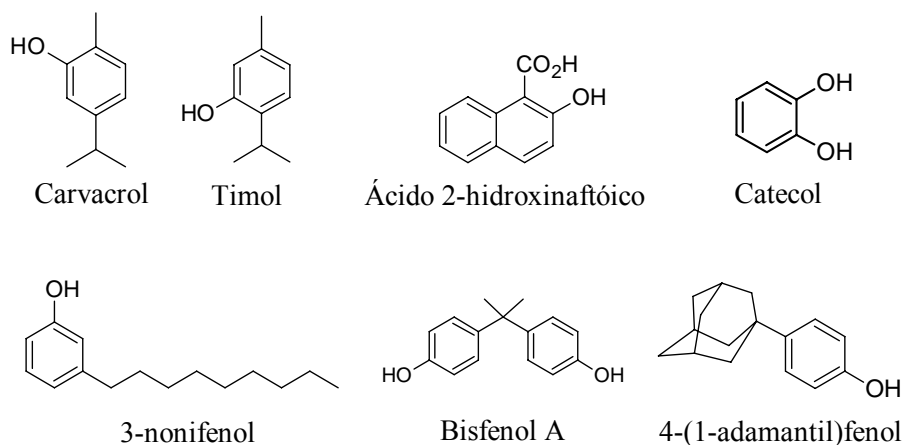
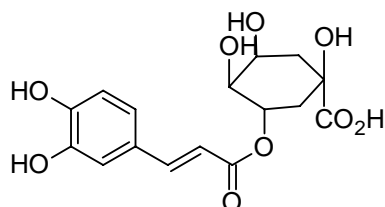


Figura 14 Fenóis com atividade nematocida

Em trabalho recente, Ahemed et al. (2009) verificaram que a concentração de compostos fenólicos totais aumentava nas folhas de *Vigna radiata* (L.) R. Wilczek, quando esta planta era exposta a *M. javanica*. Este resultado sugere que as plantas responderam com estratégias bioquímicas para suportar os efeitos adversos da infecção.

Comportamento análogo pode ser observado com bananeiras inoculadas com *Radopholus similis* Cobb (Valette et al., 1998) e com pimenta (*Capsicum annuum* L.) inoculada com *Meloidogyne arenaria* (Chitwood), *M. incognita* ou *M. javanica*. Neste último caso, acredita-se que o principal fenol associado com a resistência a nematoide seja o ácido clorogênico (Figura 15; Pegard et al., 2005).

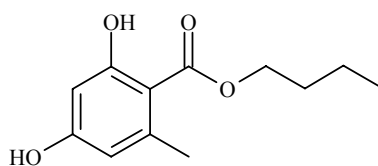


Ácido clorogênico

Figura 15 Fenol de origem vegetal que pode estar associado à resistência de plantas a nematoides

Trabalhando com ovos de *M. incognita*, Balaji et al. (1988) verificaram que catecol (Figura 14) era capaz de inibir totalmente a eclosão de juvenis do segundo estágio do nematoide, na concentração de  $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Ao trabalhar com o mesmo nematoide, (Mahajan; Singh; Bajaj, 1985) observaram que o ácido 2-hidroxinaftoico (Figura 14) também reduzia a eclosão.

Tominaga et al. (2003) verificaram que bisfenol A e 4-(1-adamantil)fenol (Figura 14) eram capazes de afetar a fecundidade do nematoide *Caenorhabditis elegans* Maupas, em concentrações 100 a 10.000 vezes inferiores aos valores obtidos para a sua concentração letal para 50% da população de microrganismo ( $CL_{50}$ ). Em trabalho realizado por Li et al. (2006), observou-se que o 2,4-diidroxi-6-metilbenzoato de butila (Figura 16) era ativo contra o nematoide de vida livre *Panagrellus redivivus* Linne.



2,4-diidroxi-6-metilbenzoato de butila

Figura 16 Fenol com atividade nematicida que foi isolado do fungo *Stereum* sp.

Enfim, os resultados apresentados acima e vários outros disponíveis na literatura (Chitwood, 2002; Shaukat; Siddiqui; Zarina, 2004; Sosa & Tonn, 2008) deixam evidente que os fenóis podem fazer parte do mecanismo de defesa de plantas contra nematoides.

#### 2.4.4 Carboidratos

Os carboidratos ocupam um lugar central no metabolismo das plantas, pois são as primeiras substâncias orgânicas complexas a serem formadas como produtos da fotossíntese. Eles podem ser utilizados para o armazenamento (amido) e o transporte de energia (sacarose), e como blocos estruturais (celulose). Ademais, várias outras classes de substâncias de origem vegetal, como os ácidos nucleicos e os glicosídeos de plantas, possuem carboidratos em suas estruturas (Harborne, 1998; Bowyer & Leegood, 1997; Brownleader; Harborne; Dey, 1997; Avigad & Dey, 1997; Reid, 1997; Nelson & Cox, 2000). Algumas estruturas são apresentadas na Figura 17.

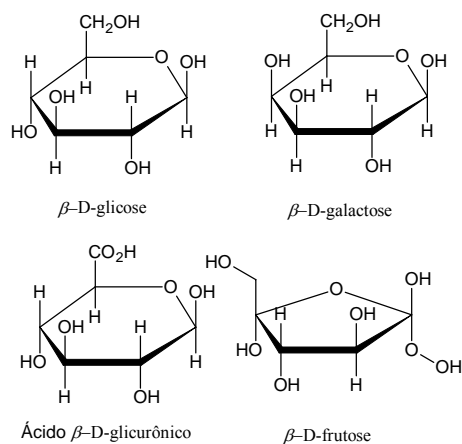


Figura 17 Estruturas de monossacarídeos comumente encontrados em plantas



Uma forma conveniente de classificar os carboidratos consiste em dividi-los em três grupos: monossacarídeos, oligossacarídeos (formados pela condensação de dois ou mais monossacarídeos) e polissacarídeos (longas cadeias de monossacarídeos). Os monossacarídeos geralmente utilizados pelas plantas para a produção de oligossacarídeos, polissacarídeos, ácidos nucleicos ou glicosídeos são: arabinose, deoxiribose, frutose, galactose, glicose, manose, ramnose, ribose e xilose. Também é bem comum a presença de derivados, como o ácido glicurônico e o ácido galacturônico (Harborne, 1998; Bowyer & Leegood, 1997; Brownleader; Harborne; Dey, 1997; Avigad & Dey, 1997; Reid, 1997; Nelson & Cox, 2000).

A união de uma molécula de glicose com uma de frutose resulta na formação da sacarose, que é o principal produto da fixação de CO<sub>2</sub> durante o processo fotossintético. Trata-se de um dissacarídeo não redutor e altamente solúvel em água, que é utilizado pela planta para translocar carbono orgânico dos tecidos fotossintéticos para os não fotossintéticos. Além disso, como a energia liberada durante o rompimento da sua ligação glicosídica (entre a frutose e a glicose) tem o mais alto valor para este tipo de ligação, a sacarose pode ser um excelente modo de conservação de energia para a planta (Avigad & Dey, 1997; Nelson & Cox, 2000).

Apesar da grande importância da sacarose como nutriente para diversos organismos (Avigad & Dey, 1997; Nelson & Cox, 2000), em trabalho recentemente realizado pelo Grupo de Pesquisas em Produtos Naturais da UFPA (Oliveira et al., 2007), observou-se que tal carboidrato era uma das substâncias que conferiam atividade contra o nematoide *M. exigua* ao extrato dos bulbos de cebola. Tal resultado é coerente com o obtido por Roman (1963), segundo o qual, apesar de economicamente inviável, o uso de sacarose permite o controle de *Rotylenchulus reniformis* Linford & Oliveira em tomateiros.

Segundo Del Valle et al. (2006), a infecção de raízes de cafeeiros por *M. exigua* induz ao acúmulo de sacarose nas galhas formadas. Para os autores, esta seria uma forma da planta disponibilizar nutrientes para o nematoide. Porém, os resultados aqui descritos permitem levantar a hipótese de que o acúmulo de carboidratos em raízes infectadas por nematoides pode não ser benéfico a esses fitoparasitas. Eles sugerem uma investigação a respeito de a possibilidade do acúmulo de carboidratos em raízes infectadas estar relacionada a um mecanismo de defesa desencadeado pela planta.

#### **2.4.5 Outras estruturas**

Além das estruturas químicas apresentadas acima, há várias outras substâncias de origem vegetal com comprovada atividade nematicida. Algumas delas são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 Substâncias com propriedades nematicidas isoladas de plantas

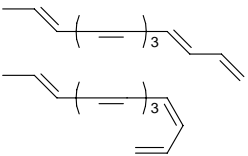
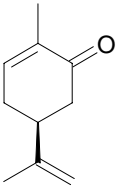
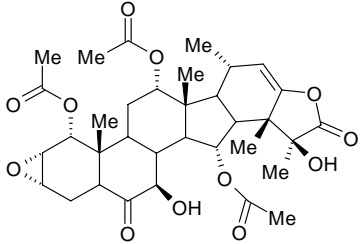
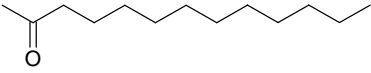
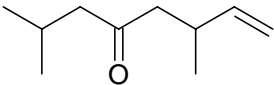
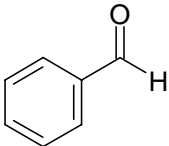
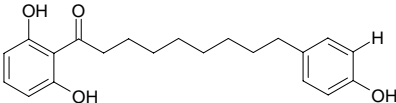
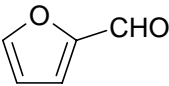
| Nematicida isolado  | Planta de origem                        | Nematoide afetado                                       | Referência                   |
|---|---|---|------------------------------|
|    | <i>Carthamus tinctorius</i> L.          | <i>Aphelencoides besseyi</i> Christie.                  | Kogiso; Wada; Munakata, 1976 |
|    | <i>Ocimum basilicum</i> L.              | <i>Meloidogyne javanica</i> (Treub) Chitwood.           | Oka et al., 2000             |
|   | <i>Tacca</i> sp. L.                     | <i>Meloidogyne incognita</i> (Kofoid & White) Chitwood. | Adam et al., 2001            |
|  | <i>Pilocarpus Microphyllus</i> , Joseph | <i>Meloidogyne incognita</i> (Kofoid & White) Chitwood. | Romero et al., 2006          |

Tabela 2, conclusão

|   |   |   |                                |
|---|---|---|--------------------------------|
|  | <i>Tagetes minuta</i> L.                    | <i>Meloidogyne incognita</i> (Kofoid & White) Chitwood. | ADEKUNLE; ACHARYA; SINGH, 2007 |
|  | <i>Liquidambar Orientalis</i> Mill.         | <i>Bursaphelenchus xylophilus</i> Steiner & Buhner.     | Kim et al., 2008               |
|  | <i>Myristica malabarica</i> (Lam) Rampatri. | <i>Bursaphelenchus xylophilus</i> Steiner & Buhner.     | Choi et al., 2008              |
|  | <i>Melia azedarach</i> L.                   | <i>Meloidogyne incognita</i> (Kofoid & White) Chitwood. | Ntalli et al., 2010            |

No caso específico dos estudos com plantas do gênero *Tacca*, os resultados foram tão promissores que seus autores decidiram patentear as substâncias ativas isoladas, denominadas Tacanolidas, para uso no controle de nematoides (Adam et al., 2001; Tabela 2).

## 2.5 Substâncias orgânicas sintéticas ativas contra nematoides

Existem várias substâncias orgânicas sintéticas com aplicações no controle de doenças de plantas (Bergamin Filho et al., 1995). Como exemplo, pode-se citar o nematicida aldicarbe (Figura 18), pertencente ao grupo dos carbamatos, que tem sido amplamente empregado na agricultura brasileira e mundial para o controle de diversos fitonematoides. Apesar de esta substância reduzir a população de nematoides no solo, o seu acúmulo contribui de forma direta para a contaminação ambiental.

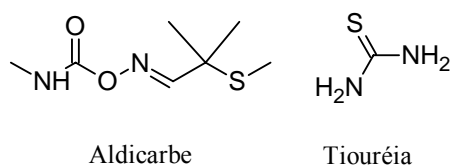


Figura 18 Estrutura do nematicida sintético aldicarbe e da tioureia

Apesar de algumas substâncias sintéticas não possuírem ação direta contra os nematoides, as aplicações das mesmas em plantas pode reduzir a população do nematoide. Como exemplo, pode-se citar a tioureia (Figura 18), que reduz o número de galhas de *M. incognita* em tomateiro, mas não tem ação direta contra os J2 desta espécie (Glazer & Orion, 1984).

Dentre as substâncias orgânicas sintéticas utilizadas em diversas atividades, vale mencionar os tetrazóis, que são compostos heterocíclicos e aromáticos, de cinco membros, contendo quatro átomos de nitrogênio (Figura

19), que pertencem à classe de substâncias denominada genericamente de azol. O núcleo tetrazólico está presente em diversas moléculas de importância farmacológica, como é o caso do losartan, que tem atividade anti-hipersensitiva (Figura 19).

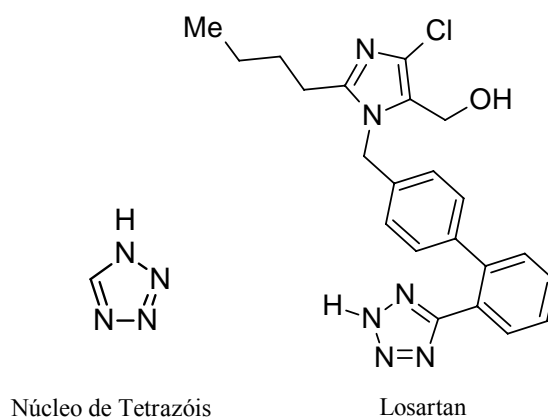
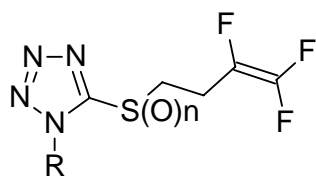


Figura 19 Núcleo fundamental dos tetrazóis e heterociclo nitrogenado farmacologicamente ativo

Especificamente para uso na agricultura, pode-se mencionar a atividade contra *M. incognita* por parte de derivados tetrazólicos com a estrutura geral apresentada na Figura 20. Especialmente quando R corresponde a um grupo alquenila. Neste caso, a substância é ativa na concentração de  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (Watanabe et al., 2003).



Derivados de Tetrazol

\* n = 0, 1 ou 2 átomos de oxigênio

\* Representantes de (R) =  
hidrogênio, alquila, alquenila,  
cicloalquila

Figura 20 Estrutura geral de substâncias tetrazólicas ativas contra nematoides

Outro exemplo de aplicação de estruturas tetrazólicas na agricultura pode ser encontrado no trabalho descrito por Beier et al. (2011), segundo os quais, quando R na estrutura química corresponde a ciclopropiletinil, 5-fenilpent-1-inil, 3-cicloexilprop-1-inil, hex-1-inil, hexilamino ou (pentiloxi)carbonilamino, observa-se o controle do fungo *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, em *Solanum lycopersicum* L., na concentração de 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

Em decorrência dos resultados promissores apresentados pelas estruturas tetrazólicas, observa-se que as mesmas apresentam potencial para o desenvolvimento de novos produtos para aplicação na agricultura (Watanabe et al., 2003).

## REFERÊNCIAS

- ADAM, G. *et al.* Control of pests e.g. nematodes, molluscs or insects, using taccalonolide compounds, some of which extracted from plants of the genus *Tacca*. **Patente número CN1298877-A**, 13 de junho de 2001.
- ADEKUNLE O. K.; ACHARYA R.; SINGH B. Toxicity of pure compounds isolated from *Tagetes minuta* oil to *Meloidogyne incognita*. **Australasian Plant Disease Notes**, Australia, v. 2, n. 1, p. 101-104, Dec. 2007.
- AERTS R. *et al.* Methyl jasmonate vapor increases the developmentally controlled synthesis of alkaloids in *Catharanthus* and *Cinchona* seedlings. **Plant Journal**, Malden v. 5, n. 5, p. 635-43, May 1994.
- AHMED, M. N. *et al.* Physiological changes in leaves of mungbean plants infected with *Meloidogyne javanica*. **Phytopathology Mediterranea**, Firenze, v. 48, n. 2, p. 262-268, 2009.
- ALLEN, E. H.; FELDMESSER, J. Nematicidal activity of  $\alpha$ -chaconine: effect of hydrogen-ion concentration. **Journal of Nematology**, Marceline, v. 3, n. 1, p. 58-61, Jan. 1971.
- ARAB, A.; BENTO, J. M. S. Plant volatiles: new perspectives for research in Brazil. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 35, n.2, p. 151-158, mar. 2006.
- ARIMURA, G. *et al.* Plant-plant interactions mediated by volatiles emitted from plants infested by spider mites. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 29, n. 10, p. 1049-1061, Nov. 2001.
- ARIMURA, G.; KOST, C.; BOLAND, W. Herbivore-induced, indirect plant defences. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1734, n. 1734, p. 91-111, Apr. 2005.
- AVIGAD, G.; DEY, P.M. Carbohydrate metabolism: storage carbohydrates. In: **Plant Biochemistry**. P.M. Dey and J.B. Harborne (Eds), Academic Press: London. p. 143-204. 1997.
- BALAJI, A.; KANNAN, S. Impact of different phenolic compounds on hatchability of *Meloidogyne incognita*. **Geobios**, Jodhpur, v. 15, n. 2-3, p. 143-4, 1988.



BARBOSA, L.C.A. 2004. **Introdução à Química Orgânica**. Editora UFV: Viçosa, 2004. 311 p.

BATE N. J.; ROTHSTEIN S. J. C-6-volatiles derived from the lipoxygenase pathway induce a subset of defense-related genes. **Plant Journal**, Maden, v. 16, n. 5, p. 561–569, Dec. 1998.

BEIER, C. *et al.* Fungicide Hydroximoyl-Tetrazole derivatives. Número da patente: US 2011/0015236 A1, 20 de janeiro de 2011.

BELL, E.A. Nonprotein Amino Acids of Plants: Significance in Medicine, Nutrition, and Agriculture. **Journal Agricola Food Chemistry**, Washington, v. 51, n. 10, p. 2854-2865, May 2003.

BERNASCONI M. L. *et al.* Herbivore-induced emissions of maize volatiles repel the corn leaf aphid, *Rhopalosiphum maidis*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Amsterdam, v. 87, n. 2, p. 133–142, May 1998.

BIJLOO, J. D. The “*Pisum*” test: a simple method for the screening of substances on their therapeutic nematocidal activity. **Nematologica**, Leyden, v. 11, n. 4, p. 643-644, 1965.

BLUM, L. E. B.; CARES, J. E; UESUGI, C. H. Fitopatologia: o estudo das doenças de plantas. Brasília: Otimismo, 1, 250p, 2006.

BOWYER, J.R.; LEEGOOD, R.C. Photosynthesis. In: **Plant Biochemistry**. P.M. Dey and J.B. Harborne (Eds), Academic Press: London. p. 49-110. 1997.

BROWNLEADER, M.D.; HARBORNE, J.B.; DEY, P.M. Carbohydrate metabolism: primary metabolism of monosaccharides. In: **Plant Biochemistry**. P.M. Dey and J.B. Harborne (Eds), Academic Press: London. p. 111-141. 1997.

CAMPOS, V. P. Controle de doenças: doenças causadas por nematoides. In: RIBEIRO DO VALE, F. X.; L. ZAMBOLIM (eds). Controle de doenças de plantas. Viçosa: Editora Universitária, v. 1, p. 141-170, 1997.

CAPORALE L. H. Chemical ecology: a view from the pharmaceutical industry. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 92, n. 1, p. 75–82, Jan. 1995.

CASTRO J. M. C. *et al.* Levantamento de fitonematoides em cafezais do Sul de Minas Gerais. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 32, n. 1, p. 56-64, mar. 2008.

CHEN, H. *et al.* Regulation of Plant Arginase by Wounding, Jasmonate, and the Phytotoxin Coronatine. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 279, n. 40, p. 45998–46007, Oct. 2004.

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

CHITWOOD, D. J. Research on plant-parasitic nematode biology conducted by the United States Department of Agriculture-Agricultural Research Services. **Pest management Science**, Brighton, v. 59, n. 6/7, p. 748-753, June/July 2003.

CHOI, N. H. *et al.* Nematicidal activity of malabaricones isolated from *Myristica malabarica* fruit rinds against *Bursaphelenchus xylophilus*. **Nematology**, Leyden, v. 10, n. 6, p. 801-807, 2008.

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

CONAB. 2011. Companhia Nacional de Abastecimento – Secretaria da Produção e Comercialização/CONAB. **Safra brasileira de café estimada 2010/2011**. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br/spc.htm> > Acesso 20 dezembro de 2010.

COOPER, W. R.; JIA, L.; GOGGIN L. Effects of jasmonate-induced defenses on root-knot nematode infection of resistant and susceptible tomato cultivars. **Journal of Chemical Ecology**, Florida, v. 31, n. 9, p. 1953-1967, Sept. 2005.

COSTA, W. M.; GONÇALVES, W.; FASUOLI. L. C. Produção de café Mundo Novo em porta-enxertos de *Coffea canephora* em áreas infestadas com *Meloidogyne incognita* raça 1. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v.15, n.1, p. 43-50, 1991.

DEL VALLE, E.E. *et al.* Altered sugar partition in coffee (*Coffea arabica* L.) roots due to parasitism by *Meloidogyne* spp. 26° Congresso Brasileiro de Nematologia. Campos dos Goytacazes, UENF, **Resumos**, p.106, 2006.

DIGNUM, M. J. W., KERLAER, J.; VERPOORTE, R. Glucosidase activity and peroxidase stability in crude enzyme extracts from green beans of *vanilla planifolia* andrews. **Phytochemical analysis**, Wolverhampton, v. 12, n. 3, p. 174-179, May/June 2001.

DROPKIN V.H. The necrotic reaction of tomatoes and other hosts resistant to *Meloidogyne*: reversal by temperature. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 59, n. 11, p. 1632-1637, 1969.

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

EISENBACK, J. D. & TRIANTAPHYLLOU, H. H. Root-knot nematode: *Meloidogyne* sp. and races. In: Nickle, W. R. (ed) **Manual of agricultural nematology**. New York, p. 191-274, 1991,

FAHL, J. I. *et al.* Enxertia de *Coffea arabica* sobre progênies de *Coffea canephora* e de *C. congensis* no crescimento, nutrição mineral e produção. **Bragantia**, Campinas, v. 57, n. 2, p. 297-312, 1998.

FARAG, M.A. *et al.* GC-MS SPME profiling of rhizobacterial volatiles reveals prospective inducers of growth promotion and induced systemic resistance in plants. **Phytochemistry**, Washington, v. 67, n. 20, p. 2262-2268, Oct. 2006.

FERRAZ S.; FREITAS L. G. Use of antagonistic plants and natural products. In: Chen ZX, Chen SY & Dickson DW (Eds.) **Nematology –Advances and perspectives**. Wallingford UK. CABI. p. 931-960, 2004.

FERRAZ, S.; MENDES M.L. O nematóide das galhas. Informativo Agropecuário, Belo Horizonte, v.16, n.172, p. 43-45, 1992.

FERRAZ, S. *et al.* Detecção, isolamento, identificação e avaliação in vitro da capacidade predatória de fungos nematófagos de solos brasileiros. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v.16, n.1, p.85-86, 1992.

FILGUEIRA, F. A. R. **Manual de oleicultura**: cultura e comercialização de hortaliças. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, v. 2, p. 357, 2000.

GASOL, E. *et al.* Membrane topology of system xc- light subunit reveals a re-entrant loop with substrate-restrictive. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 279, n. 30, p. 31228-31236, July 2004.

GILBERT, J.C.; MCGUIRRE, D.C. Inheritance of resistance to severe root-knot from *Meloidogyne incognita* in commercial-type tomatoes. **Proceedings of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 68, p. 437-442, 1956.

GLAZER, I.; ORION, D. Influence of urea, hydroxyurea, and thiourea on *Meloidogyne javanica* and infected excised tomato roots in culture. **Journal of Nematology**, Marceline, v. 16, n. 2, p. 30-125, 1984.

HAFEZ, S. L.; P. SUNDARARAJ. Resistant reaction of alfalfa cultivars to the lesion nematode *Pratylenchus penetrans*. Presented at the "39 th Annual meeting of Society of Nematologists" held in Quebec, Canada from June 24-28, 2000. **Abstract** published in the *Journal of Nematology*. 32 : 433, 2000.

HAMMOND, A.C. Leucaena Toxicosis and Its Control in Ruminants. **Journal of Animal Science**, Storrs, v. 73, n. 5, p. 1487-1492, 1995.

HARBORNE, J.B. **Phytochemical Methods. A guide to Modern Techniques of Plant Analysis**. Third Edition, Chapman & Hall: London. 302 p. 1998.

HASHIMOTO T.; YAMADA Y. Alkaloid biogenesis: molecular aspects. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo alto, v. 45, p. 257-285, 1994.

HEDIN, P. A.; CREECH, R. G. Effects of root-knot nematodes on distribution of Amino Acids in Cotton Root Galls. **Office of Agricultural Communications, a unit of the Division of Agriculture, Forestry, and Veterinary Medicine** at Mississippi State University. June, 2001.

HEIL. M.; KOST, C. Priming of indirect defences. **Ecology Letters**, California, v. 9, p. 813-817, 2006.

HOUGHTON, P. J.; REN, Y.; HOWES, M. J. Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. **Natural Products Reports**, Dorcrecht, v. 23, n. 2, p. 181-199, Apr. 2006.

KARSSSEN, G. The Plant-Parasitic Nematode Genus *Meloidogyne* Goeldi, 1892 (Tylenchida) in Europe. Brill Academic Publishers, Boston, MA, 2002.

KEINANEN, M.; OLDHAM, N. J.; BALDWIN, I. T. Rapid HPLC Screening of Jasmonate-Induced Increases in Tobacco Alkaloids, Phenolics, and Diterpene

Glycosides in *Nicotiana attenuate*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 49, n. 8, p. 3553-3558, Aug. 2001.

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

KESSLER, A. *et al.* Priming of plant defense responses in nature by airborne signaling between *Artemisia tridentata* and *Nicotiana attenuate*. **Oecologia**, New York, v. 148, n. 2, p. 280-292, Feb. 2006.

KIM, J. *et al.* Nematicidal activity of plant essential oils and components from coriander (*Coriandrum sativum*), oriental sweetgum (*Liquidambar orientalis*), and Valerian (*Valeriana wallichii*) essential oils against pine wood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 56, n. 16, p. 7316-7320, July 2008.

KIM, H. *et al.* Effect of Methyl Jasmonate on Secondary Metabolites of Sweet Basil (*Ocimum basilicum* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 54, n. 6, p. 2327-2332, Feb. 2006.

KISHIMOTO, K. *et al.* Components of C6-aldehyde-induced resistance in *Arabidopsis thaliana* against a necrotrophic fungal pathogen, *Botrytis cinerea*. **Plant Science**, Shannon, v. 170, n. 4, p. 715-723, Apr. 2006.

KNUDSEN, J.T.; GERSHENZON, J. The chemistry diversity of floral scent. In: *Biology of Floral Scent*. N. Duradeva and E. Pichersky (Eds), CRC Press, Boca Raton, p. 27-52, 2006.

KOENNING S. R. *et al.* Survey of crop losses in response to phytoparasitic nematodes in the United States for 1994. *Journal of Nematology*, Marceline, v. 31, n. 4, p. 587-618, Dec. 1999.

KOGISO, S.; WADA, K.; MUNAKATA, K. Isolation of nematicidal polyacetylenes from *Carthamus tinctorius* L. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 40, n. 10, p. 2085-2089, 1976.

KOST, C.; HEIL, M. Herbivore-induced plant volatiles induce an indirect defence in neighbouring plants. **Journal of Ecology**, Malden, v. 94, n.3, p. 619-628, May 2006.

KUTCHAN T. M.; ZENK M. H. Enzymology and molecular biology of benzophenanthridine alkaloid biosynthesis. **Journal Plant Research**, v. 3, p. 165–73, 1993.

LEA, P.J. Primary Nitrogen Metabolism. In: P.M. Dey and J.B. Harborne (Eds.), **Plant Biochemistry**. Academic Press, London, p.273-314, 1997.

LI, G. *et al.* The chemical constituents of the fungus *Stereum* sp. **Chemistry & Biodiversity**, Weinheim, v. 3, n. 2, p. 210-216, Feb 2006.

LI, Z. *et al.* Chemical Changes and Overexpressed Genes in Sweet Basil (*Ocimum basilicum* L.) upon Methyl Jasmonate Treatment. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 55, n. 3, p. 706-713, Feb 2007.

LICHTENTHALER, H. K. *et al.* Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via a mevalonate independent pathway. **FEBS Letters**, Heidelberg, v. 400, n. 3, p. 271-274, Jan. 1997.

LITVAK M. E.; MONSON R. K. Patterns of induced and constitutive monoterpene production in conifer needles in relation to insect herbivory. **Oecologia**, Marburg, v. 114, n. 4, p. 531–540, May 1998.

LOPES, E. A. *et al.* Efeito dos extratos aquosos de mucuna preta e de manjeriço sobre *Meloidogyne incognita* e *M. javanica*. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v.29, n. 1, p. 67-74, jul. 2005.

MACHADO. A. R. T. *et al.* Influências de substâncias orgânicas voláteis na resistência de feijoeiros ao nematóide das galhas *Meloidogyne incognita*. **XXII Encontro da Sociedade Brasileira de Química** – MG, Belo Horizonte, 06 a 09 de novembro de 2008a.

MAHAJAN, R; SINGH, P; BAJAJ, K. L. Nematocidal activity of some phenolic compounds against *Meloidogyne incognita*. **Revue de Nematologie**, Montrouge Cedex, v. 8, n. 2, p.161-4, 1985.

MARTIN, D. *et al.* Methyl Jasmonate Induces Traumatic Resin Ducts, Terpenoid Resin Biosynthesis, and Terpenoid Accumulation in Developing Xylem of Norway Spruce Stems. **Plant Physiology**, Rockville, v. 129, n. 7, p. 1003–1018, July 2002.

MASHELA, P. W.; SHIMELIS, H. A.; MUDAU, F. N. Comparison of the efficacy of ground wild cucumber fruits, aldicarbe and fenamiphos on suppression of *Meloidogyne incognita* in tomato. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 156, n. 5, p. 264-267, May 2008.

MCDUGAL, P. G.; RICO, J. G.; VANDERVEER, D. Bengamides, heterocyclic anthelmintics from a jaspidae marine sponge. *Journal of Organic Chemistry*, Washington, v. 51, n.23, p. 4494-4497, Nov. 1986.

MEIJER A. H.; VERPOORTE R.; HOGE J. H. C. Regulation of enzymes and genes in terpenoid indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*. **Journal Plant Research (Special Issue)**, v. 3, p. 145-64, 1993.

MITRI C. *et al.* Plant insecticide L-canavanine repels *Drosophila* via the insect orphan GPCR DmX. **PLoS Biology**, v. 7, n. 6, Jun. 2009, doi: 10.1371.

NASU, E. G. C. *et al.* Efeito da manipueira sobre *Meloidogyne incognita* em ensaios *in vitro* e em tomateiros em casa de vegetação. *Tropical Plant Pathology*, Lavras, v. 35, n. 1, p. 32-36, Jan/Feb. 2010.

NELSON D.L.; COX, M.M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. Third Edition. Worth Publishers: New York. 1152 p., 2000.

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

NTALLI, N. G. *et al.* Nematicidal Carboxylic Acids and Aldehydes from *Melia azedarach* Fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 58, n. 21, p. 11390-11394, Nov. 2010.

OKA, Y.; COHEN, Y. Induced resistance to cyst and root-knot nematodes in cereals by DL- $\beta$ -amino-n-butyric acid. **European Journal of Plant Pathology**, London, v. 107, n. 2, p. 219-227, Feb. 2001.

OKA, Y. *et al.* Nematicidal Activity of Essential Oils and Their Components Against the Root-Knot Nematode. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 90, n. 7, p. 710-715, Jul. 2000.

OLIVEIRA D. S. *et al.* Variability of *Meloidogyne exigua* on Coffee in the Zona da Mata of Minas Gerais State, Brazil. **Journal of Nematology**, Marceline, v. 37, n. 3, p. 323-327, Sep. 2005.

OLIVEIRA, D. F. *et al.* Atividade de Carboidrato Purificado a Partir da Cebola (*Allium cepa* L.) e de Carboidratos Comerciais sobre Juvenis de *Meloidogyne exigua* Goeldi. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 31, n. 3, p. 202-209, 2007.

OLIVEIRA, D. F. *et al.* The activity of amino acids produced by *Paenibacillus macerans* and from commercial sources against the root-knot nematode *Meloidogyne exigua*. **European Journal of Plant Pathology**, London, v. 124, n. 1, p. 57-63, 2008.

OPPERMAN, C. H.; CHANG, S. Plant-parasitic nematode acetylcholinesterase inhibition by carbamate and organophosphate nematicides. **Journal of Nematology**, Marceline, v. 22, n. 4, p. 481-8, Oct. 1990.

PANACCIONE, D.G. Origins and significance of ergot alkaloid diversity in fungi. **FEMS Microbiology Letters**, Malden, v. 251, n.1, p. 9–17, Oct. 2005.

PARÉ, P. W. *et al.* Elicitors and priming agents initiate plant defense responses. **Photosynthesis Research**, Dordrecht, v. 85, n. 2, p. 149–159, Aug. 2005.

PARÉ, P. W.; TUMLINSON, J. W. Plant Volatiles as a Defense against Insect Herbivores. **Plant Physiology**, Rockville, v. 121, n. 2, p. 325–331, Oct. 1999.

PEGARD, A. *et al.* Histological Characterization of Resistance to Different Root-Knot Nematode Species Related to Phenolics Accumulation in *Capsicum annum*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 95, n. 2, p. 158-165, June 2005.

PERRY, R.N.; MAULE, A.G. Physiological and Biochemical Basis Behaviour. In: Gauler, R., Bilgrami, L. (Editores). **Nematode Behaviour**. New Jersey, CABI Publishing, p. 197-238, 2004.

PIMENTEL, M. S.; PEIXOTO, A. R.; PAZ, C. D. Potencial de controle biológico de *Meloidogyne* utilizando fungos nematófagos e bactérias em cafeeiros. **Coffee Science**, Lavras, v. 4, n. 1, p. 84-92, jan/jun. 2009.

REID, J.S.G. Carbohydrate metabolism: structural carbohydrates. In: **Plant Biochemistry**. P.M. Dey and J.B. Harborne (Eds), Academic Press: London. p. 205-236. 1997.



RIBEIRO, R. C. F. *et al.* Levantamento de espécies de *Monacrosporium* predadoras de nematoides em diversas regiões brasileiras. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 23, n. 2, p. 41-47, 1999.

ROCHA, M. E. N.; SANTOS, C. L. O uso comercial e popular de eucalipto *Eucalyptus Globulus Labill* – Myrtaceae. **Saúde & Ambiente em Revista**, Duque de Caxias, v. 2, n. 2, p. 23-34, Jul/Dez. 2007.

RODA, A.L.; BALDWIN, I.T. Molecular technology reveals how the induced direct defenses of plants work. **Basic and Applied Ecology**, Jena, v. 4, n. 1, p. 15–26, 2003.

RODRIGUEZ-SAONA C. *et al.* Exogenous methyl jasmonate induces volatile emissions in cotton plants. **Journal of Chemical Ecology**, Tampa, v. 27, n. 3, p. 679–695, March 2001.

ROMAN, J. Sugar, an effective but expensive nematocide. **Journal Agriculture of the University of Puerto Rico**, v. 47, p. 54-5, 1963.

ROMERO, N. R. *et al.* Nematicidal activity of the essential oils from *Pilocarpus microphyllus* (Rutaceae) samples. **Natural Product Communications**, Ohio, v. 1, p. 469-473, 2006.

ROSE U. S. R. *et al.* Volatile semiochemicals released from undamaged cotton leaves – A systemic response of living plants to caterpillar damage. **Plant Physiology**, Rockville, v. 111, n. 2, p. 487–495, June 1996.

ROSENTHAL, G. A. L-Canavanine: a higher plant insecticidal allelochemical. **Amino Acids**, Vienna, v. 21, n. 3, p. 319-330, 2001.

ROSSI, M. *et al.* The nematode resistance gene *Mi* of tomato confers resistance against the potato aphid. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 95, p. 9750-9754, Aug. 1998.

ROZAN, P.; KUO, Y.; LAMBEIN, F. Free Amino Acids Present in Commercially Available Seedlings Sold for Human Consumption. A Potential Hazard for Consumers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 48, n. 3, p. 716-723, Mar. 2000.

RYU, C. *et al.* Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 134, n. 2, p. 1017-1026, Mar. 2004.

RYU, C. *et al.* Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 100, n. 8, p. 4927–4932, Apr. 2003.

SANGSTER, N. C.; SONG, J.; DEMELER, J. Resistance as a tool for discovering and understanding targets in parasite neuromusculature. **Parasitology**, New York, v.131, p.179-190, 2005.

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

SASSER, J. N.; CARTER, E. D. S. **An Advanced Treatise on Meloidogyne: biology and control**. Raleigh: United States Agency for International Development, 1985, v. 1, 150p.

SATOU, T. *et al.* Inhibitory Effect of Isoquinoline Alkaloids on Movement of Second-Stage Larvae of *Toxocara canis*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, Toyo, v. 25, n. 12, p. 1651-1654, Dec. 2002a.

SATOU, T. *et al.* Assay of nematocidal activity of isoquinoline alkaloids using third-stage larvae of *Strongyloides ratti* and *S. venezuelensis*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 104, n.2, p. 131–138, Mar. 2002b.

SCHREIBER, K.; SEMBDNER, G. The specific action of several Solanaceae alkaloids on the potato nematodes, *Heterodera rostochiensis*. **Planta Medica**, Antwerp, v. 8, p. 107-13, 1960.

SHAUKAT, S. S.; SIDDIQUI, I. A. ; ZARINA, B. Effects of some common weeds from Pakistan on plant-parasitic nematodes *in vitro* and population densities and survival of *Meloidogyne incognita* in okra and brinjal. **Nematologia Mediterrânea**, Bari, v. 32, p. 111-115, 2004.

SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. 2<sup>a</sup> Edição, Editora da UFSC, 821 p., 2000.

SOSA, M.E.; TONN, C.E. Plant secondary metabolites from Argentinean semiarid lands: bioactivity against insects. **Phytochemical Reviews**, Leiden, v. 7, n. 1, p. 3–24, Jan. 2008.

STARR, J.L.; BRIDGE, J.; COOK, R. Plant Resistance to Parasitic Nematodes. Cambridge: CABI, 2002. 288 p.

TAKAISHI, K. *et al.* Synthesis and antinematodal activity of 3-n-alkylphenols. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, Tokyo, v. 68, n. 11, p. 2398-2400, Nov. 2004.

TALAVERA, M.; MIZUKUBO, T. Effects of DL-methionine on hatching and activity of *Meloidogyne incognita* eggs and juveniles. **Pest Management Science**, Chichester, v. 61, n. 4, p. 413-416, Nov. 2005.

THODEN, T. C.; BOPPRÉ, M.; HALLMANN, J. Pyrrolizidine alkaloids of *Chromolaena odorata* act as nematocidal agents and reduce infection of lettuce roots by *Meloidogyne incognita*. **Nematology**, Leyden, v. 9, n. 3, p. 343-349, 2007.

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

TINGEY, W. M. Glycoalkaloids as pest resistance factors. **American Potato Journal**, Aberdeen, v. 61, n. 3, p. 157-167, Mar. 1984.

TOMINAGA, N. *et al.* A multi-generation sublethal assay of phenols using the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Journal of Healthy Science**, London, v. 49, n. 6, p. 459-463, 2003.

TSAI, B. Y.; VAN GUNDY, S. D. Comparison of anhydrobiotic ability of the citrus nematode with other plant parasitic nematodes. Proceedings of the International Society of Citriculture 2, 983-992, 1988.

VALETTE C. *et al.* Histochemical and cytochemical investigations of phenols in roots of banana infected by the burrowing nematode *Radopholus similis*. **Phytopathology**, Palo Alto, v. 88, n. 11, p. 1141-1147, Nov. 1998.

VÁZQUEZ-FLOTA F. *et al.* Alkaloid metabolism in wounded *Catharanthus roseus* seedlings. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 42, n. 7-8, p. 623-628, Jul-Aug 2004.

VOINILO, V. A.; PONIN, I. Y. Role of glycoalkaloids and phytoalexins in the resistance of potatoes to nematodes. **Seryya Biyalagichnykh Navuk**, Navuk Belarusi, v. 4, p. 73-75, 1979.

WATANABE, Y. *et al.* Nematicidal Tetrazole-containing trifluorbutenes. **Patente número** C07D 257/04, 24 de dezembro de 2003.

WEISSBECKER B.; VAN LOON J. J. A.; DICKE M. Electroantennogram responses of a predator, *Perillus bioculatus*, and its prey, *Leptinotarsa decemlineata*, to plant volatiles. **Journal of Chemical Ecology**, Florida, v. 25, n. 10, p. 2313–2325, Oct. 1999.

WINK, M. Plant secondary metabolites from higher plants: biochemistry, function and biotechnology. In: **Biochemistry of Plant Secondary Metabolism, Annual Plant Reviews**, ed. MWink. Sheffield: Sheffield Academic, v. 2, p. 1–16, 1999.

WINK, M. Special nitrogen Metabolism. In: P.M. DEY AND J.B. HARBORNE (Eds.). **Plant Biochemistry**. London: Academic, 1997, p. 439-486.

ZHAO, X.; SCHMITT, M.; HAWES, C. M. Species dependent effects of border cell and root tip exudates on nematodes behavior. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 90, n. 1, p. 1239-1245, Nov. 2000.

## SEGUNDA PARTE

### ARTIGO 1

#### Substâncias orgânicas voláteis no controle de *Meloidogyne exigua* em *Coffea arabica*

#### 1 RESUMO

Substâncias orgânicas voláteis no controle de *Meloidogyne exigua* em *Coffea arabica*

Com a finalidade de contribuir para o desenvolvimento de novos métodos de controle de fitonematoides, no presente trabalho se estudaram os efeitos de substâncias orgânicas voláteis (SOV) sobre *Meloidogyne exigua* em raízes de cafeeiro. Observaram-se reduções na população do nematoide quando as plantas foram pulverizadas nas partes aéreas com combinações de jasmona + jasmonato de metila (1), (Z)-hex-3-en-1-ol + (E)-hex-3-en-1-ol + (Z)-hex-2-en-1-ol + (E)-hex-2-enal (2), acetato de (E)-hex-2-enila + acetato de hexila (3), *meso*-butano-2,3-diol + butano-1,2-diol + butano-1,3-diol + butano-1,4-diol (4), 3-hidroxibutan-2-ona + 4-hidroxibutan-2-ona (5) ou acetato de linalila + nerolidol (6). Embora ainda não se saiba o mecanismo de ação dessas substâncias, observou-se que elas alteram as quantidades de alcaloides, carboidratos, fenóis e aminoácidos nas raízes das plantas. Novos estudos serão realizados com vistas a elucidar os mecanismos de ação de tais SOV e a aperfeiçoar a metodologia desenvolvida.

**Palavra-chave:** nematoides, cafeeiro, indução de resitência.

## 2 ABSTRACT

In order to contribute to the development of new methods of controlling nematodes, the present research aimed to study the effects of volatile organic substances (VOS's) on *Meloidogyne exigua* in coffee roots. We observed reductions in the nematode populations when plants were sprayed with combinations of methyl jasmonate + jasmone (1), (Z)-hex-3-en-1-ol + (E)-hex-3-en-1-ol + (Z)-hex-2-en-1-ol + (E)-hex-2-enal (2), (E)-hex-2-enyl acetate + hexyl acetate (3), meso-butane-2,3-diol + butane-1,2-diol + butane-1,3-diol + butane-1,4-diol (4), 3-hydroxybutan-2-one + 4-hydroxybutan-2-one (5), or linalyl acetate + nerolidol (6). Although the mechanisms of action of these substances are unknown, it was observed that they alter the quantities of alkaloids, carbohydrates, phenols and amino acids in plant roots. These VOS's have potential for controlling nematodes in coffee plants and will be subjected to further studies aiming to elucidate their mechanisms of action and to improve the developed methodology.

Keyword: nematodes, coffee plants, induction of resistance.

### 3 INTRODUÇÃO

Dentre os vários parasitas de plantas, podem-se citar os nematoides do gênero *Meloidogyne* spp., que são responsáveis por perdas na agricultura mundial da ordem de 125 bilhões de dólares por ano (Chitwood, 2003). A principal forma de controle desses fitoparasitas consiste na utilização de nematicidas sintéticos, tóxicos ao ambiente. Em decorrência disso, existe grande demanda pelo desenvolvimento de novos produtos (Dong & Zhang, 2006), com a finalidade de minimizar os efeitos adversos ao ambiente. Para tanto, as substâncias orgânicas voláteis (SOV) de origem vegetal surgem como uma alternativa promissora, já que há vários dados na literatura sobre o uso de tais substâncias na defesa de plantas contra pragas e doenças (Rose et al., 1996; Paré e Tumlinson, 1999; Roda e Baldwin, 2003; Paré *et al.*, 2005;; Arimura; Kost; Boland, 2005).

Uma das rotas geralmente ativadas para a produção de SOV em plantas é a do jasmonato de metila (Rodriguez-Saona et al., 2001), que é uma substância capaz de ativar genes de defesa da planta (Bate & Rothstein, 1998). Sabe-se, por exemplo, que *Solanum lycopersicum* L., ao ser exposta ao jasmonato de metila, promove a síntese da proteína Lepr-5, que pode desempenhar um papel importante na resposta a estresses abióticos, além de estar envolvida na defesa da planta contra patógenos (Ren et al., 2011). Verificou-se, também, que as plantas de *Avena sativa* L., expostas ao jasmonato de metila, têm maior resistência aos nematoides *Heterodera Avenae* Wollenweber, e *Pratylenchus neglectus* (Rensch) Filipjev & Schuurmans Stekhoven, (Soriano et al., 2004). Aparentemente, em parte, isso se deve ao aumento na produção de um glicosídeo em plantas de aveia.

Sabendo do potencial das SOV para a proteção de plantas contra pragas e doenças, Heil & Kost (2006) expuseram *Phaseolus lunatus* L. a misturas de

acetato de (Z)-hex-3-enila,  $\beta$ -ocimeno, (R)-(-)-linalool, (3E)-4,8-dimetilnona-1,3,7-trieno, salicilato de metila, (Z)-jasmona,  $\beta$ -cariofileno e (3E, 7E)-4,8,12-trimetiltrideca-1,3,7,11-tetraeno, que são SOV de origem vegetal (Heil & Kost, 2006). Em seguida, fizeram danos artificiais na planta e avaliaram as respostas do seu sistema de defesa, o que permitiu observar que os indivíduos submetidos à referida mistura de substâncias voláteis tinham apresentado resposta de 180% superior à daqueles sem qualquer exposição.

Diante do grande potencial das SOV para o controle de pragas e doenças, e da escassez de trabalhos com estas substâncias para a redução populacional de fitonematoides, objetivou-se, com este trabalho, investigar em plantas de café (*Coffea arabica*) suscetíveis a nematoides, o efeito de combinações de SOV na população de *Meloidogyne exigua* Goeldi e na produção de metabólitos secundários nas raízes.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Substâncias orgânicas voláteis (SOV) comerciais

Foram adquiridas (Sigma Aldrich) e, sem qualquer tratamento posterior, dissolvidas em solução aquosa de Tween 80 ( $10 \text{ g.L}^{-1}$ ) até as concentrações desejadas, formando seis conjuntos: jasmona (pureza: 90%) + jasmonato de metila (pureza: 95%) (tratamento 1 e 7), (Z)-hex-3-en-1-ol (pureza: 97%) + (E)-hex-3-en-1-ol (pureza: 98%) + (Z)-hex-2-en-1-ol (pureza: 95%) + (E)-hex-2-enal (pureza: 98%) (tratamento 2 e 8), acetato de (E)-hex-2-enila (pureza: 99%) + acetato de hexila (pureza: 99%) (tratamento 3 e 9), *meso*-butano-2,3 diol (pureza: 97%) + butano-1,2-diol (pureza: 98%) + butano-1,3-diol (pureza: 93%) + butano-1,4-diol (pureza: 99%) (tratamento 4 e 10), 3-hidroxiutan-2-ona (pureza: 96%) + 4-hidroxiutan-2-ona (pureza: 95%) (tratamento 5 e 11),



acetato de linalila (pureza: 97%) + nerolidol (pureza: 98%) (tratamento 6 e 12). Estas substâncias foram escolhidas para o presente trabalho por serem capazes de aumentar a resistência de plantas a outras doenças e insetos (Martin et al., 2002; Ryu et al., 2003; Ryu et al., 2004; Kost & Heil, 2006; Kishimoto et al., 2006). Quanto às combinações das SOV, elas foram realizadas de acordo com as suas semelhanças estruturais, visando à redução do número de tratamentos.

#### **4.2 Obtenção do inóculo do nematoide**

Raízes de cafeeiros (*Coffea arabica* L. cv. Catuaí 144) cultivados em casa de vegetação e infestados com *M. exigua* Goeldi foram lavadas cuidadosamente e cortadas em pedaços de 1,0 cm. Em seguida, foram trituradas em liquidificador por 40 segundos, em solução de hipoclorito de sódio a 0,5% ( $\text{g.g}^{-1}$ ), seguindo-se a técnica de Hussey e Barker (1973). Os ovos retidos na peneira de 500 mesh foram recolhidos e colocados em câmara de eclosão, formada com tela de 35  $\mu\text{m}$ , colocada em um funil de vidro (Dunn, 1969). Os juvenis do segundo estágio (J2) foram recolhidos depois de 48 e 72 horas, tendo sido descartada a primeira coleta de 24 horas.

#### **4.3 Efeito *in vivo* das substâncias orgânicas voláteis (SOV) sobre *Meloidogyne exigua***

Para a realização do teste *in vivo*, mudas de cafeeiro (*Coffea arabica* L. cv. Catuaí 144) com três pares de folhas foram adquiridas e transplantadas para vasos plásticos de 3 L contendo uma mistura estéril de areia e solo, na proporção de 1:1 (v/v). Após 15 dias em uma casa de vegetação, as partes aéreas das plantas foram borrifadas até o ponto de escorrimento com soluções dos seis conjuntos de SOV descritos no item 4.1, em final de tarde. Para cada conjunto

foram empregadas duas soluções: uma na qual cada substância se encontrava na concentração de  $0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$  e outra na qual a concentração de cada substância era de  $1,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ . Após dois dias, aplicaram-se 10 mL de suspensões aquosas contendo 3.000 J2 de *M. exigua* no substrato de cada muda. Decorridos cinco dias, realizou-se outra aplicação foliar das SOV, conforme descrito acima.

O experimento foi instalado em delineamento em blocos casualizados, empregando-se três repetições para cada tratamento, sendo utilizada solução de Tween 80 a  $10 \text{ g.L}^{-1}$  como controle. Cada parcela foi representada por três plantas. Cento e dez dias após a inoculação dos J2 em cafeeiros, cortaram-se as partes aéreas das plantas e retiraram-se os sistemas radiculares do solo, para que os mesmos pudessem ser lavados com água, secos com papel toalha e pesados. Em seguida, as galhas foram contadas e se cortaram os sistemas radiculares em pedaços de aproximadamente 1,0 cm para a extração de ovos pela técnica de Hussey & Barker (1973) e contagem dos mesmos pelo emprego de um microscópio com objetiva de lente invertida. Os valores foram divididos pela massa da raiz fresca e, em seguida, converteram-se os resultados obtidos em logaritmos (Log Y) antes dos cálculos estatísticos.

#### **4.4 Efeito *in vitro* das substâncias orgânicas voláteis (SOV) sobre *Meloidogyne exigua***

Para a realização do experimento *in vitro*, que foi adaptado do método descrito por (Amaral; Oliveira; Oliveira, 2003), empregaram-se soluções em Tween 80 a  $10 \text{ g.L}^{-1}$  das combinações de SOV descritas no item 4.1, com cada uma das substâncias em três concentrações diferentes: 0,5, 1,0 e  $2,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ . Aliquotas ( $100 \mu\text{L}$ ) das soluções de combinações de SOV e  $20 \mu\text{L}$  de uma suspensão aquosa contendo aproximadamente 25 J2 foram colocadas em cavidades de  $350 \mu\text{L}$  de uma placa de polipropileno com 96 cavidades. Após 48

horas, adicionou-se uma gota de solução de NaOH a  $1 \text{ mol.L}^{-1}$  ao conteúdo de cada cavidade e, em seguida, contaram-se os nematoides. Aqueles retos e imóveis foram considerados mortos, enquanto os retorcidos e móveis foram considerados vivos. Realizaram-se quatro repetições, sendo utilizada como controle a solução de Tween 80 a  $10 \text{ g.L}^{-1}$ . Os valores obtidos foram transformados em percentagem de J2 mortos antes da realização dos cálculos estatísticos.

#### **4.5 Influência das substâncias orgânicas voláteis (SOV) na produção metabólita das plantas**

Mudas de cafeeiro foram preparadas e borrifadas com as SOV, conforme descrito no item 4.3. Passados quatro dias, as partes aéreas das plantas foram cortadas e os sistemas radiculares foram cuidadosamente retirados do substrato, lavados com água, liofilizados até peso constante, moídos com grau e pistilo e guardados em freezer, a  $-10^{\circ}\text{C}$ , durante 20 dias, até o momento das análises dos metabólitos. O experimento foi instalado em delineamento em blocos casualizados, com quatro repetições, sendo cada repetição composta por uma planta.

#### **4.6 Atividade *in vitro* de extratos das raízes de plantas expostas às SOV**

Alíquotas (250 mg) de cada sistema radicular seco e moído conforme descrito no item 4.5, foram mantidos em 10 mL de metanol, durante 24 horas. A seguir, as misturas foram filtradas em algodão e submeteram-se os resíduos a mais quatro extrações com 10 mL de metanol. Os líquidos das cinco extrações foram combinados e concentrados até *secura* em evaporador rotatório e liofilizadora. Solubilizaram-se alíquotas de 5% das massas dos extratos obtidos,

em 1,0 mL de solução aquosa de Tween 80 a  $10 \text{ g.L}^{-1}$ , para serem submetidas ao teste de mortalidade de J2 de *M. exigua*, que foi realizado conforme descrito no item 4.4.

#### **4.7 Quantificação de aminoácidos e carboidratos hidrosolúveis**

Conforme descrito por Passos (1996), as raízes secas e moídas (250 mg) de cada um dos sistemas radiculares (item 4.5) foram submetidas a duas extrações, com tempo de 10 minutos cada, com 20 mL de uma solução de metanol/clorofórmio/água (MCA) na proporção de 12:5:3 (v/v/v). Após filtrações em algodão, as fases líquidas de ambas as extrações foram combinadas e misturadas em um funil de decantação com 30 mL de clorofórmio e 60 mL de água. Agitaram-se as misturas obtidas e, em seguida, separaram-se por decantação as fases aquosas, que foram concentradas até *secura* em evaporador rotatório e liofilizadora. Posteriormente, cada uma das amostras foi solubilizada em água destilada até que o volume total fosse de 25 mL, obtendo-se, assim, a solução padrão “A” para a dosagem de aminoácidos e carboidratos hidrosolúveis.

Para a quantificação de aminoácidos, transferiram-se, em triplicata, para os tubos de ensaio, alíquotas de 0,5 mL de cada solução padrão “A” e 1,0 mL de solução de ninidrina, que foi previamente preparada (25 mL de NaOAc.3H<sub>2</sub>O a  $1,36 \text{ g.mL}^{-1}$  (pH 5,5), 20 mL de ácido acético glacial, 75 mL de éter monometílico de etinoglicol, 0,2 g de ninidrina e 30 mg de hidrindantina). Os tubos foram agitados para a obtenção de soluções homogêneas e, em seguida, mantidos em banho-maria, a 100°C, por 15 minutos. Adicionaram-se 3,0 mL de etanol/água (1:1) a cada tubo, que foi deixado na bancada para resfriar. Realizaram-se, então, leituras das absorvâncias das soluções resultantes em um espectrofotômetro Spectrum SP1105, a 570 nm, em cubetas de vidro. As

concentrações de aminoácidos totais foram determinadas pelas comparações dos valores obtidos com aqueles provenientes de uma curva analítica resultante do emprego de L-leucina (pureza: 98,5%), nas concentrações de 0, 40, 60, 80, 100, 120, 160, 180, 200, 250, e 300,0  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

Para a quantificação dos carboidratos hidrosolúveis, colocaram-se, em triplicata, 1,0 mL de cada solução principal, 0,5 mL de solução aquosa de fenol a 5% ( $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) e 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado em cada tubo de ensaio. Após 10 minutos em repouso, aqueceram-se os tubos em banho-maria, a 30°C, por 15 minutos. A seguir, realizaram-se leituras das absorvâncias em 490 nm. A concentração de carboidratos em cada tubo foi obtida pela comparação com valores de uma curva analítica construída pelo emprego da D-glicose nas concentrações de 0, 1, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120 e 140  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

Quanto à quantificação da sacarose, transferiu-se 1,0 mL de cada solução padrão "A" para tubos de ensaio em triplicata, para ser liofilizada e redissolvida em 0,1 mL de água. Adicionou-se 0,1 mL de KOH a 30% ( $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) ao conteúdo de cada tubo, que foi mantido em banho, a 100°C, por 10 minutos. Após resfriamento até a temperatura ambiente, adicionaram-se 5 mL de solução de antrona (600 mg de antrona anidra, 270 mL de ácido sulfúrico concentrado e 30 mL de água) ao conteúdo de cada tubo, que foi mantido em banho, a 40°C, por 10-15 minutos. A seguir, realizaram-se as leituras de absorvância em 620 nm. As concentrações foram obtidas por comparação com uma curva analítica construída com o uso de sacarose, nas concentrações 0, 1, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160 e 200  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

#### **4.8 Quantificação de fenóis totais**

Com o objetivo de quantificar fenóis totais (AOAC, 1960), colocaram-se, em balão fundo redondo, 200 mg de cada sistema radicular seco e moído

(item 4.5) e 12,5 mL de metanol/água (1:1). Em seguida, acoplou-se um condensador de refluxo ao balão. Após refluxo durante 15 minutos, cada mistura foi filtrada e repetiu-se tal processo de extração duas vezes. Combinaram-se os filtrados e completou-se o volume de cada solução para 25 mL com água destilada. Em cada tubo de ensaio, foram colocados, em triplicata, 20  $\mu\text{L}$  de cada solução resultante, 1,68 mL de água, 100  $\mu\text{L}$  do reagente de Folin Dennis [2,5 g de tungstato de sódio di-idratado ( $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), 0,5 g de ácido fosfomolibdico, 1,25 mL de ácido fosfórico concentrado e água para completar o volume até 25 mL] e 200  $\mu\text{L}$  de solução aquosa de carbonato de sódio a 2,0% ( $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ). Em seguida, fizeram-se leituras das absorvâncias em 720 nm e converteram-se os valores obtidos em concentração de fenóis por comparação com curva analítica obtida pelo emprego do ácido tânico em concentração de 0, 3, 7, 11, 15 e 19  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ .

#### **4.9 Quantificação de alcaloides totais**

Seguindo a metodologia descrita por Sreevidya e Mehrotra (2003) para a análise de alcaloides, 500 mg de cada sistema radicular seco e moído (item 4.5) foram submetidos a três extrações (10 minutos cada), com 10 mL de solução aquosa de ácido acético a 2 % (v/v). As soluções obtidas foram combinadas e retiraram-se três alíquotas de 5 mL da solução final para serem misturadas com 2,0 mL do reagente de Dragendorff [0,8 g de  $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$ , 40 mL de água destilada, 10 mL de ácido acético glacial, 8,0 g de KI e 20 mL de água destilada], em tubos de ensaio. Centrifugaram-se as misturas obtidas e se descartaram os sobrenadantes. Após lavagem com etanol (2 x 4 mL), os resíduos foram tratados com 2,0 mL de solução aquosa de sulfeto de sódio a 1% ( $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) e centrifugaram-se as misturas. Os sobrenadantes foram novamente descartados, enquanto os resíduos foram dissolvidos com 2,0 mL de  $\text{HNO}_3$  concentrado,

sendo as soluções obtidas diluídas até 10 mL com água destilada. Misturou-se 1,0 mL de cada solução obtida com 5,0 mL de solução aquosa de tiourea a 3% ( $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) e se fizeram leituras das absorvâncias em 435 nm. Converteram-se os valores em concentrações de alcaloides totais por comparação com curva analítica proveniente do uso de brucina nas concentrações de 0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 e 500  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

#### **4.10 Análise por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN $^1\text{H}$ )**

Aliquotas (13,33 mg) de cada extrato seco em liofilizadora, conforme descrito no item 4.5, foram dissolvidos em 250  $\mu\text{L}$  de solução tampão de fosfato a 50  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  (Mallinckodt Baker S. A.) em água deuterada ( $\text{D}_2\text{O}$ ) (Cambridge Isotope Laboratory),  $\text{pH} = 7,5$ , contendo 0,5  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  de 2,2-dimetil-2-silapentano-5-sulfonato de sódio (DSS) (CIL – Cambridge Isotope Laboratory) como referência interna. Os espectros de hidrogênio foram obtidos em espectrômetro Varian AS 500 (500 MHz), com tempo de aquisição de 4 segundos, acúmulo de 32 varreduras e pulso de  $90^\circ$ . Para a identificação e a quantificação dos metabólitos, utilizou-se o programa Chenomx Suite 6.0 (Chenomx INC., Edmonton, Canadá). Além do banco de dados do programa, empregaram-se também aqueles disponíveis no Biological Magnetic Resonance Data Bank (<http://www.bmrb.wisc.edu>) e Colmar Suite of Web Servers (<http://spinportal.magnet.fsu.edu>).

#### **4.11 Análise 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 (Sistema para análises Estatísticas, Versão 5.1, UFLA, Lavras, 2006). Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  também foram convertidos, nos intervalos de 0,02 a 4,50 ppm e 5,00 a 9,98 ppm, em uma tabela de área versus intervalo de 0,04 ppm, para que pudessem ser submetidos à análise de componentes principais (PCA) pelo emprego do *software* Pirouette 3.11 (Infometrix, Inc., Woodinville, WA).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Efeitos das substâncias orgânicas voláteis (SOV) sobre *Meloidogyne exigua* em *Coffea arabica*

Foram observadas diminuições nos números de galhas por massa de raiz de plantas de café, quando se empregaram as combinações de jasmona + jasmonato de metila (tratamento 7), (Z)-hex-3-en-1-ol + (E)-hex-3-en-1-ol + (Z)-hex-2-en-1-ol + (E)-hex-2-enal (tratamento 2 e 8), acetato de (E)-hex-2-enila + acetato de hexila (tratamento 3 e 9), *meso*-butano-2,3-diol + butano-1,2-diol + butano-1,3-diol + butano-1,4-diol (tratamento 4) e 3-hidroxiбутан-2-ona + 4-hidroxiбутан-2-ona (tratamento 5 e 11), quando se comparam os valores com aqueles obtidos para o controle (Tratamento 13). Observou-se, também, redução no número de ovos nas massas de raízes de café, em decorrência do uso de jasmona + jasmonato de metila (tratamento 7), (Z)-hex-3-en-1-ol + (E)-hex-3-en-1-ol + (Z)-hex-2-en-1-ol + (E)-hex-2-enal (tratamento 8), acetato de (E)-hex-2-enila + acetato de hexila (tratamento 3 e 9), *meso*-butano-2,3-diol + butano-1,2-diol + butano-1,3-diol + butano-1,4-diol (tratamento 4), 3-hidroxiбутан-2-ona + 4-hidroxiбутан-2-ona (tratamento 5) e acetato de linalila + nerolidol (tratamento 12) (Tabela 1). Nenhum dos tratamentos com as SOV afetou significativamente a massa de raiz das plantas.



Tabela 1 Efeitos da pulverização de combinações de substâncias orgânicas voláteis na parte aérea de mudas de cafeeiros sobre a massa de raiz e sobre a população de *Meloidogyne exigua* nas raízes das plantas

| Tratamento | Substâncias orgânicas voláteis (concentração de cada substância)   | Massa de raiz (g) | Número de ovos por massa de raiz (g <sup>-1</sup> ) | Número de galhas por massa de raiz (g <sup>-1</sup> ) |
|------------|--|-------------------|---|---|
| 1          | Jasmona + jasmonato de metila (0,5 mmol.L <sup>-1</sup> )  | 19,3 a            | 163,3 c   | 12,3 b  |
| 2          | (Z)-hex-3-en-1-ol + (E)-hex-3-en-1-ol + (Z)-hex-2-en-1-ol + (E)-hex-2-enal (0,5 mmol.L <sup>-1</sup> )         | 23,0 a            | 80,3 c  | 8,0 a   |
| 3          | Acetato de (E)-hex-2-enila + acetato de hexila (0,5 mmol.L <sup>-1</sup> )                                     | 22,0 a            | 4,0 a   | 3,3 a   |
| 4          | <i>meso</i> -butano-2,3-diol + butano-1,2-diol + butano-1,3-diol + butano-1,4-diol (0,5 mmol.L <sup>-1</sup> ) | 23,6 a            | 9,6 a   | 4,6 a   |
| 5          | 3-hidroxiutan-2-ona + 4-hidroxiutan-2-ona (0,5 mmol.L <sup>-1</sup> )  | 23,0 a            | 26,3 b  | 4,0 a   |
| 6          | Acetato de linalila + nerolidol (0,5 mmol.L <sup>-1</sup> )  | 25,0 a            | 75,3 c  | 16,0 b  |
| 7          | Jasmona + jasmonato de metila (1,0 mmol.L <sup>-1</sup> )  | 19,3 a            | 27,6 b  | 6,0 a   |
| 8          | (Z)-hex-3-en-1-ol + (E)-hex-3-en-1-ol + (Z)-hex-2-en-1-ol + (E)-hex-2-enal (1,0 mmol.L <sup>-1</sup> )         | 16,6 a            | 15,0 a  | 7,0 a   |
| 9          | Acetato de (E)-hex-2-enila + acetato de hexila (1,0 mmol.L <sup>-1</sup> )                                     | 17,0 a            | 20,3 b  | 7,0 a   |
| 10         | <i>meso</i> -butano-2,3-diol + butano-1,2-diol + butano-1,3-diol + butano-1,4-diol (1,0 mmol.L <sup>-1</sup> ) | 22,0 a            | 48,3 c  | 11,6 b  |
| 11         | 3-hidroxiutan-2-ona + 4-hidroxiutan-2-ona (1,0 mmol.L <sup>-1</sup> )  | 20,6 a            | 35,0 c  | 10,3 b  |
| 12         | Acetato de linalila + nerolidol (1,0 mmol.L <sup>-1</sup> )  | 21,3 a            | 26,3 b  | 12,0 b  |
| 13         | Tween 80 (controle)  | 25,6 a            | 100,0 c   | 25,6 b  |

\* Valores seguidos pela mesma letra, em cada coluna, não diferem entre si, pelo teste de Scott e Knott ( $P \leq 0,05$ )

### **5.2 Efeito *in vitro* das substâncias orgânicas voláteis (SOV) em *Meloidogyne exigua***

Na menor concentração empregada (0,5 mmol.L<sup>-1</sup>), nenhuma das combinações de SOV afetou a mortalidade dos juvenis do segundo estágio (J2) de *M. exigua*, quando comparadas à testemunha (Tween 80). Nas outras concentrações (1,0 e 2,5 mmol.L<sup>-1</sup>), apenas as combinações de jasmona + jasmonato de metila e (Z)-hex-3-en-1-ol + (E)-hex-3-en-1-ol + (Z)-hex-2-en-1-ol + (E)-hex-2-enal aumentaram a mortalidade de J2. Observaram-se maiores mortalidades dos juvenis do segundo estágio (J2) de *M. exigua* com os aumentos nas concentrações de tais SOV (Tabela 2).

### **5.3 Efeito de substâncias orgânicas voláteis (SOV) na produção de metabólitos em raízes de *Coffea arabica***

Várias foram as modificações na produção de metabólitos das plantas tratadas com as SOV (Figura 1 e 2). Por exemplo, em todas as raízes de plantas tratadas com as SOV na concentração de 0,5 mmol.L<sup>-1</sup> (tratamentos de 1 a 6), se observaram concentrações de alcaloides menores que aquela nas raízes das plantas tratadas com o controle (Tween 80). Na concentração de 1,0 mmol.L<sup>-1</sup> (tratamentos de 7 a 12), a excessão da combinação de jasmona + jasmonato de metila (tratamento 7), que também diminuiu a concentração de alcaloides, não se observaram variações nas concentrações de tais metabólitos. Quanto às concentrações de aminoácidos, todos os tratamentos proporcionaram valores estatisticamente iguais ou um pouco inferiores ao observado para a testemunha (Figura 1). O menor de todos os valores foi obtido para as plantas pulverizadas com 3-hidroxiбутан-2-ona + 4-hidroxiбутан-2-ona, na concentração de 1,0 mmol.L<sup>-1</sup> (tratamento 11).

Tabela 2 Mortalidade de juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne exigua* expostos a combinações de substâncias orgânicas voláteis

| Substâncias orgânicas voláteis   | J2 mortos (%)            |                          |                          |
|--|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
|  | 0,5 mmol.L <sup>-1</sup> | 1,0 mmol.L <sup>-1</sup> | 2,5 mmol.L <sup>-1</sup> |
| Jasmona + jasmonato de metila  | 19,0 a                   | 21,6 a                   | 41,5 b                   |
| (Z)-hex-3-en-1-ol + (E)-hex-3-en-1-ol + (Z)-hex-2-en-1-ol + (E)-hex-2-enal         | 23,3 a                   | 48,9 b                   | 91,9 c                   |
| Acetato de (E)-hex-2-enila + acetato de hexila                                     | 19,4 a                   | 16,1 a                   | 16,7 a                   |
| <i>meso</i> -butano-2,3-diol + butano-1,2-diol + butano-1,3-diol + butano-1,4-diol | 19,9 a                   | 16,1 a                   | 21,5 a                   |
| 3-hidroxiбутан-2-ona + 4-hidroxiбутан-2-ona  | 23,1 a                   | 19,9 a                   | 12,6 a                   |
| Acetato de linalila + nerolidol  | 22,5 a                   | 29,7 a                   | 21,1 a                   |
| Tween 80 (controle)  | 5,3 a                    | 5,3 a                    | 5,3 a                    |

\* Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Scott & Knott ( $P \leq 0,05$ )

\*Obs: Concentração de cada substância na combinação de substâncias orgânicas voláteis

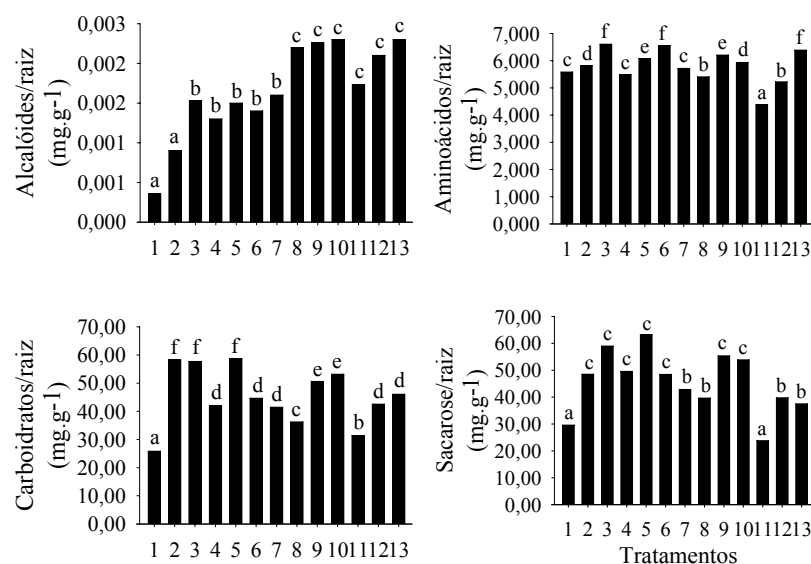
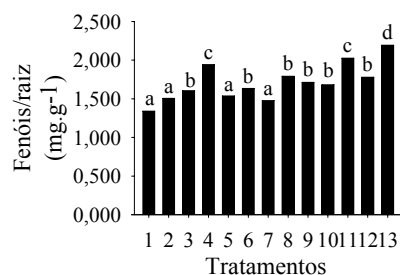


Figura 1 Concentrações de alcaloides, aminoácidos, carboidratos, sacarose e fenóis, nas raízes de *Coffea arabica* cuja parte aérea foi pulverizada com soluções das combinações de jasmona + jasmonato de metila (1 e 7), (Z)-hex-3-en-1-ol + (E)-hex-3-en-1-ol + (Z)-hex-2-en-1-ol + (E)-hex-2-enal (2 e 8), acetato de (E)-hex-2-enila + acetato de hexila (3 e 9), *meso*-butano-2,3-diol + butano-1,2-diol + butano-1,3-diol + butano-1,4-diol (4 e 10), 3-hidroxiбутан-2-ona + 4-hidroxiбутан-2-ona (5 e 11) ou acetato de linalila + nerolidol (6 e 12). Como controle, foi empregado Tween 80 (13). Nos tratamentos de 1 a 6, cada substância se encontrava na concentração de 0,5 mmol.L<sup>-1</sup>, enquanto nos tratamentos de 7 a 12 cada substância foi empregada na concentração de 1,0 mmol.L<sup>-1</sup>. Barras com as mesmas letras em cada gráfico não diferem entre si, pelo teste de Scott & Knott ( $P \leq 0,05$ )

(...continua...)



Enquanto as concentrações de carboidratos totais e sacarose variaram bastante para as plantas expostas às combinações de SOV, todos os tratamentos reduziram as concentrações de fenóis totais em relação ao observado para Tween 80 (Figura 1).

As análises por RMN <sup>1</sup>H permitiram a identificação e a quantificação de dez metabólitos (Figura 2). As concentrações do ácido málico, asparagina, (Z)-hex-3-en-1-ol, trigonelina e colina foram sempre iguais ou inferiores às observadas para o Tween 80 (controle), enquanto, nos casos do ácido aspártico, ácido corísmico e ácido clorogênico, as concentrações foram sempre menores que a observada para o controle. Já para o ácido cítrico e a alanina, observaram-se concentrações menores, iguais ou superiores à do controle.

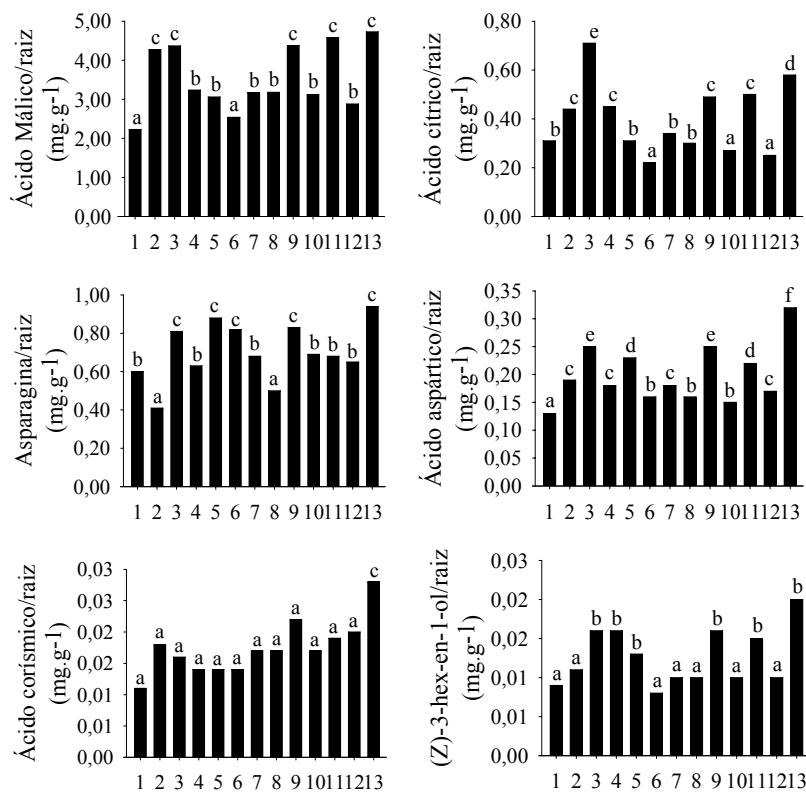
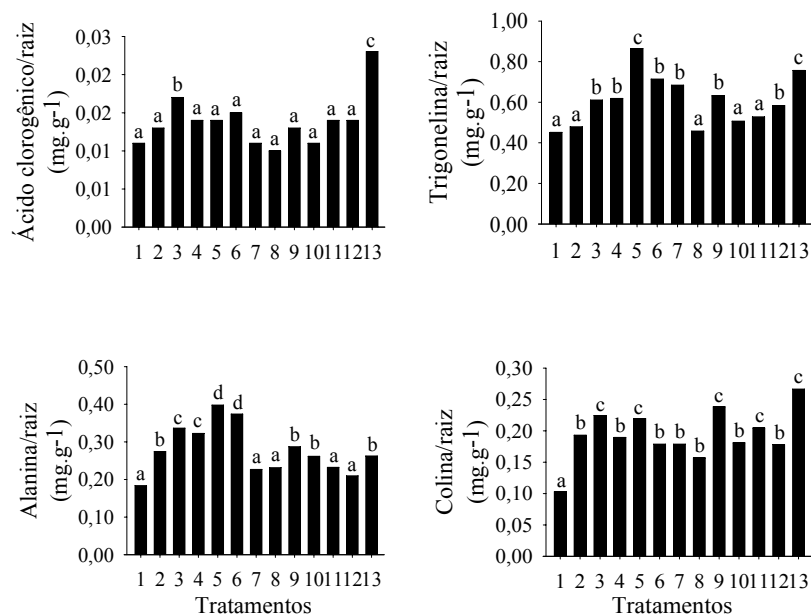


Figura 2 Metabólitos identificados e quantificados nas raízes de cafeeiro (*Coffea arabica*) com o uso da espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio. As plantas foram pulverizadas com combinações de jasmona + jasmonato de metila (1 e 7), (Z)-hex-3-en-1-ol + (E)-hex-3-en-1-ol + (Z)-hex-2-en-1-ol + (E)-hex-2-enal (2 e 8), acetato de (E)-hex-2-enila + acetato de hexila (3 e 9), *meso*-butano-2,3-diol + butano-1,2-diol + butano-1,3-diol + butano-1,4-diol (4 e 10), 3-hidroxiбутан-2-ona + 4-hidroxiбутан-2-ona (5 e 11) ou acetato de linalila + nerolidol (6 e 12). Como controle foi empregado Tween 80 (13). Nos tratamentos de 1 a 6, cada substância se encontrava na concentração de 0,5 mmol.L<sup>-1</sup>, enquanto nos tratamentos de 7 a 12 cada substância foi empregada na concentração de 1,0 mmol.L<sup>-1</sup>. Barras com as mesmas letras, em cada gráfico, não diferem entre si, pelo teste de Scott & Knott ( $P \leq 0,05$ )

(...continua...)



De acordo com a análise de componentes principais dos espectros de RMN <sup>1</sup>H, 99,9% da variância para os extratos das raízes de cafeeiros pode ser explicada por doze componentes, sendo os dois primeiros responsáveis por 87,8% da referida variância (Figura 3). Dentre as diferenças observadas, as mais significativas parecem as correspondentes aos tratamentos 1, 2 e 7, que se mostraram mais distantes do controle (tratamento 13).

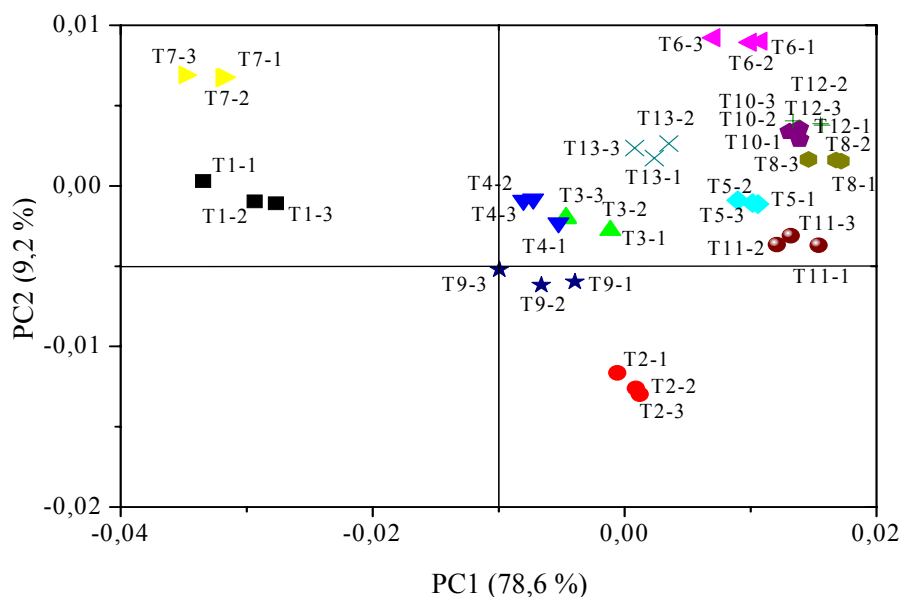


Figura 3 Escores das análises de componentes principais dos espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio dos extratos das raízes de *Coffea arabica* (Tx.y, sendo “x” correspondente ao tratamento e “y”, o número de repetição). As plantas foram pulverizadas com combinações de jasmona + jasmonato de metila (tratamentos 1 e 7), (Z)-hex-3-en-1-ol + (E)-hex-3-en-1-ol + (Z)-hex-2-en-1-ol + (E)-hex-2-enal (tratamentos 2 e 8), acetato de (E)-hex-2-enila + acetato de hexila (tratamentos 3 e 9), *meso*-butano-2,3-diol + butano-1,2-diol + butano-1,3-diol + butano-1,4-diol (tratamentos 4 e 10), 3-hidroxiбутан-2-ona + 4-hidroxiбутан-2-ona (tratamentos 5 e 11), acetato de linalila + nerolidol (tratamentos 6 e 12). Como controle foi empregado Tween 80 (tratamento 13). Nas combinações de 1 a 6, cada substância foi empregada na concentração de 0,5 mmol.L<sup>-1</sup>, enquanto, nas combinações de 7 a 12, cada substância estava na concentração de 1,0 mmol.L<sup>-1</sup>.



#### **5.4 Atividade *in vitro* de extratos de raízes tratadas com SOV contra *Meloidogyne exigua***

Embora os extratos de plantas expostas aos tratamentos 3, 7, 12 e 13 (controle) não tenham influenciado na mortalidade *in vitro* de J2 de *Meloidogyne exigua*, todos os outros tratamentos aumentaram a porcentagem de J2 mortos (Tabela 3). Dentre os extratos mais ativos contra o nematoide se encontram aqueles provenientes da pulverização das plantas com as combinações de acetato de (E)-hex-2-enila + acetato de hexila (tratamento 9) e *meso*-butano-2,3-diol + butano-1,2-diol + butano-1,3-diol + butano-1,4-diol (tratamento 4 e 10).

Tabela 3 Mortalidade de juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne exigua* expostos a extratos de raízes de café pulverizadas com as combinações de substâncias orgânicas voláteis

| Tratamento | Substâncias orgânicas voláteis   | J2 mortos (%)            |                          |
|------------|--|--------------------------|--------------------------|
|            |  | 0,5 mmol.L <sup>-1</sup> | 1,0 mmol.L <sup>-1</sup> |
| 1          | Jasmona + jasmonato de metila  | 19,3 b                   | 1,78 a                   |
| 2          | (Z)-hex-3-en-1-ol + (E)-hex-3-en-1-ol + (Z)-hex-2-en-1-ol + (E)-hex-2-enal         | 14,5 b                   | 10,14 b                  |
| 3          | Acetato de (E)-hex-2-enila + acetato de hexila                                     | 2,7 a                    | 47,69 d                  |
| 4          | <i>meso</i> -butano-2,3-diol + butano-1,2-diol + butano-1,3-diol + butano-1,4-diol | 34,2 c                   | 28,88 c                  |
| 5          | 3-hidroxiбутан-2-ona + 4-hidroxiбутан-2-ona  | 17,7 b                   | 10,62 b                  |
| 6          | Acetato de linalila + nerolidol  | 13,1 b                   | 2,08 a                   |
| 7          | Tween 80 (controle)  | 0,0 a                    | 0,0 a                    |
| 8          | Tween 80 (controle do teste “ <i>in vitro</i> ”)                                   | 0,0 a                    | 0,0 a                    |

\* Barras com a mesma letra ou número não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott & Knott ( $P \leq 0,05$ )

\*Obs: Concentração de cada substância na combinação de substâncias orgânicas voláteis

## 6 DISCUSSÃO

Os melhores resultados no teste *in vivo* foram observados para a combinação de acetato de hexila + acetato de (E)-hex-2-enila (Tratamentos 3 e 9), que reduziu a população do nematoide em ambas as concentrações empregadas (Tabela 1). Aparentemente, tal resultado está de acordo com a maior produção de acetato hexila por parte de plantas de *Vaccinium corymbosum* (L.) Highbush expostas à herbivoria por *Lymatria dispar* L. (Rodrigues-Saona et al., 2009), o que sugere a utilização de tal substância como parte do sistema de defesa da planta. Quanto ao acetato de (E)-hex-2-enila, há dados na literatura que deixam evidente a capacidade deste éster para ativar as defesas vegetais (Kost & Heil, 2006; Ruther & Kleier, 2005; Engelberth et al., 2004). Logo, parece razoável supor que a combinação dessas substâncias tenha reduzido a população do nematoide no presente estudo.

Uma vez claro o potencial da combinação de acetato de hexila + acetato de (E)-hex-2-enila para uso na redução da população de *M. exigua* em cafeeiros, fez-se necessário entender a forma de ação destas substâncias. Como havia dados na literatura sobre a possibilidade de ação direta de SOV contra pragas e doenças (Kim et al., 2006; Ibraim; Traboulsi; El-Haj, 2006), inicialmente, buscou-se verificar se a referida combinação teria atividade *in vitro* contra J2 do nematoide. Como se observa na Tabela 2, nenhuma atividade foi detectada, mesmo quando as substâncias foram utilizadas em concentração de  $2,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ , o que sugere que a forma de ação destas substâncias seja realmente por meio da indução de resistência das plantas.

Para investigar melhor a forma de ação da combinação de SOV referente aos tratamentos 3 e 9, extratos de plantas expostas a tais substâncias foram submetidos a testes *in vitro* de mortalidade de J2 de *M. exigua*, o que permitiu observar que, quando na concentração de  $0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$  (tratamento 3), tais SOV

não acarretaram qualquer aumento na atividade nematicida dos extratos correspondentes (Figura 4). Como houve redução no número de galhas por massa de raiz (Tabela 1), talvez o tratamento 3 tenha causado aumento na concentração de sacarose nas raízes (Figura 1), bloqueando a ação de citocininas, que são importantes para a formação do sítio de alimentação do nematoide (Ikeda et al., 1999; Lohar et al., 2004). Outra possibilidade seria a indução da produção de alguma substância que pudesse interferir na reprodução do nematoide (Cooper; Jia; Goggin, 2005), já que o número de ovos por galhas foi menor que o observado para o controle (Tabela 1).

No entanto, quando a concentração da combinação de acetato de hexila + acetato de (E)-hex-2-enila foi elevada para  $1,0 \text{ mmol.L}^{-1}$  (Tratamento 9), observou-se um resultado totalmente diferente no teste *in vitro* com o extrato da planta, pois a mortalidade dos J2 subiu para 47%. Aparentemente, houve uma alteração no mecanismo de ação com o aumento das concentrações destas SOV, já que o tratamento 9 claramente passou a induzir a produção de substâncias nematicidas. Como este aumento na produção de substâncias nematicidas não foi acompanhado de redução na população do nematoide em relação ao tratamento 3 (Tabela 1), talvez tenha havido, de alguma forma, redução na produção de substâncias que estariam agindo por meio de outros mecanismos contra o nematoide. Tal possibilidade encontra certo respaldo nas diferenças metabólicas nas raízes de plantas expostas a tais tratamentos (Figura 1 e 2). Observa-se, por exemplo, que a concentração de alcaloides nas raízes das plantas expostas ao tratamento 9 é maior que naquelas expostas ao tratamento 3.

Este é um resultado razoável se levarmos em consideração que há relatos na literatura sobre a atividade nematicida por parte de alcaloides (Chitwood, 2002). Além disso, tais substâncias são comumente utilizadas para que as plantas em geral possam defender-se de outras doenças ou de insetos herbívoros (Simons et al., 2006; Keeling & Bohlmann, 2006). No entanto, não se pode

deixar de mencionar que as concentrações de alcaloides observadas para o tratamento 9 e o controle são estatisticamente iguais (Figura 1), o que pode, em princípio, ter dois significados: 1) a concentração de alcaloides não tem qualquer relação com a diferença entre as mortalidades de J2 expostos aos extratos de plantas (Figura 4) ou 2) a planta exposta ao tratamento 9 produziu a mesma quantidade total de alcaloides, mas aumentou a produção daqueles que são diretamente ativos contra o nematoide.

Uma situação inversa é observada para a produção de aminoácidos, já que, neste caso, a planta exposta ao tratamento 3 teve concentrações destas substâncias que eram estatisticamente iguais ao controle (Tween 80), enquanto aquela exposta ao tratamento 9 teve valores menores (Figura 1). Este é um resultado contrário ao esperado, já que, segundo dados da literatura, as plantas produzem mais de 900 aminoácidos (Bell, 2003), sendo vários deles diretamente utilizados pelas plantas contra agentes patogênicos (Rosenthal et al., 2001), inclusive contra nematoides (Oliveira et al., 2009). Logo, era de se esperar que a planta exposta ao tratamento 9 tivesse maior produção de aminoácidos.

É interessante observar que, no controle (Tween 80), as concentrações de carboidratos solúveis totais e de sacarose foram inferiores às das plantas expostas aos tratamentos 3 e 9, tendo, neste último tratamento, a concentração de carboidratos solúveis totais sido menor (Figura 1). Este pode ser um resultado bastante interessante, se for levado em consideração que a elevação da concentração de tais substâncias em tecidos vegetais pode causar a superexpressão de genes relacionados ao mecanismo de defesa de plantas, como é o caso daqueles responsáveis pela biosíntese de inibidores de proteinases e da chalcona sintase (Johnson & Ryan, 1990; Tsukaya et al., 1991).

Quanto aos fenóis, ambos os tratamentos, 3 e 9, apresentaram valores inferiores aos da testemunha (Figura 1), o que foi um resultado inesperado principalmente para o tratamento 9, já que há vários dados na literatura sobre a

atividade de fenóis contra nematoides (Choi et al., 2007; Takaishi et al., 2004). No caso específico de tomateiros, sabe-se que a cultivar Nemadoro, que é resistente a nematoides, produz mais fenóis quando em contato com o nematoide que cultivares suscetíveis (Machado et al., 2008). Até mesmo o ácido clorogênico, que é um fenol considerado ativo contra nematoides (Bacetty et al., 2009), teve sua concentração reduzida nas plantas expostas aos tratamentos 3 e 9 (Figura 2).

A concentração do ácido cítrico foi maior nas raízes das plantas submetidas ao tratamento 3 (Figura 2). Como esta substância já se mostrou ativa *in vitro* contra *Meloidogyne incognita* e *Rotylenchulus reniformis* (Zuckerman; Matheny; Acosta, 1994), acredita-se que tenha contribuído para a redução da população de *M. exigua* em raízes de cafeeiro expostas ao tratamento 3. Quanto às demais substâncias quantificadas por RMN de  $^1\text{H}$  nos extratos de raízes expostas aos tratamentos 3 e 9, elas apresentaram valores estatisticamente iguais aos da testemunha (Figura 2).

A redução na população de nematoides também foi bem significativa nas plantas tratadas com a combinação de *meso*-butano-2,3-diol + butano-1,2-diol + butano-1,3-diol + butano-1,4-diol, quando as substâncias se encontravam na concentração de  $0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$  (tratamento 4; Tabela 1). Tal resultado parece estar em consonância com o fato de se observar que o butano-2,3-diol, produzido por *Bacillus* spp., é capaz de ativar vários genes relacionados ao sistema de defesa de *Arabidopsis* sp. (Ryu et al., 2003; Ryu et al., 2004; Farag et al., 2006). Entretanto, quando a concentração destas mesmas substâncias foi elevada para  $1,0 \text{ mmol.L}^{-1}$  (tratamento 10), não se observou qualquer redução na população do nematoide. De forma análoga ao observado com os tratamentos 3 e 9, parece que variações pequenas nas quantidades de tais SOV podem acarretar grandes alterações nas respostas das plantas.

Com a finalidade de entender como tais substâncias (tratamento 4) estariam agindo, expuseram-se os J2 do nematoide aos extratos oriundos de plantas submetidas ao tratamento 4, o que permitiu observar que o valor de J2 mortos era estatisticamente maior que o da testemunha (Figura 4). Logo, as SOV presentes no tratamento 4 deveriam estar induzindo a planta a produzir substâncias com atividades nematocidas que, em princípio, seriam as responsáveis pela redução na população do nematoide. Entretanto, observou-se também que o tratamento 10, que não havia reduzido a população do nematoide nas raízes de cafeeiros (Tabela 1), acarretou percentagem de J2 mortos estatisticamente igual à observada para o tratamento 4, o que sugere que produzir substâncias nematocidas não seja suficiente para o controle do nematoide. Aparentemente, é necessário também que as substâncias produzidas entrem em contato com tal parasita, o que talvez não esteja ocorrendo, no caso das plantas expostas ao tratamento 10. Tal proposta encontra certa sustentação no trabalho realizado por Rocha et al. (2005), no qual se observa que exsudatos de plantas suscetíveis a nematoide aumentam a mortalidade de J2 de *Meloidogyne* spp. *in vitro*, o que significa que plantas suscetíveis a nematoide também possuem substâncias com propriedades nematocidas em suas raízes.

Embora as concentrações de sacarose tenham sido estatisticamente iguais para os tratamentos 3, 4, 9 e 10, a concentração de carboidratos solúveis totais foi bem menor para o tratamento 4, o que vai contra a sugestão apresentada para o tratamento 3 e 9, de que a elevação da concentração destes carboidratos poderia causar a ativação de genes de resistência da planta.

As concentrações de alcaloides para os tratamentos 4 e 10 também se mostraram estatisticamente iguais às observadas para os tratamentos 3 e 9, respectivamente (Figura 1). Logo, talvez a produção de alcaloides não esteja correlacionada com a redução da população do nematoide nas raízes de cafeeiros. Entretanto, talvez a diminuição da concentração de alcaloides possa

ser um indício de que a planta esteja reduzindo a produção de citocininas, que são de fundamental importância para o desenvolvimento do nematoide (Dropkin et al., 1969). Em relação às outras análises realizadas (Figura 1 e 2), verificou-se que as alterações metabólicas não podiam ser correlacionadas com a redução na população do nematoide que foi causada pelo tratamento 4 (Tabela 1).

Quanto à combinação de (Z)-hex-3-en-1-ol + (E)-hex-3-en-1-ol + (Z)-hex-2-en-1-ol + (E)-hex-2-enal (tratamento 2 e 8), observou-se que a redução da população do nematoide parecia correlacionar-se com o aumento da concentração das SOV pulverizadas na planta. Aparentemente, tais resultados estão de acordo com a indução de vários genes de defesa em *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh por (E)-hex-2-enal (Bate & Rothstein, 1998). Sabe-se também que as plantas de *A. thaliana* expostas a (E)-hex-2-enal, (Z)-hex-3-enal ou (Z)-hex-3-enol têm maior resistência ao fungo *Botrytis cinerea* (Kishimoto et al., 2005). No teste *in vitro*, verificou-se que, dentre todas as combinações de SOV, a correspondente aos tratamentos 2 e 8 eram as mais ativas contra J2 de *M. exigua* (Tabela 2), o que sugeria a possibilidade de estas substâncias terem translocado das folhas para as raízes, para atuarem diretamente contra os nematoides. No entanto, apesar da maior eficiência do tratamento 8 em relação ao de número 2 (Tabela 1), as percentagens de J2 de *M. exigua* mortos após exposição aos extratos das plantas eram estatisticamente iguais para ambos os tratamentos (Tabela 2). Logo, se estiver havendo translocação, provavelmente ela não está ocorrendo de forma a fazer com que a concentração das SOV pulverizadas seja proporcional à quantidade delas em contato com o nematode nas raízes das plantas. Além disso, observa-se claramente que a concentração de (Z)-hex-3-en-1-ol, um dos componentes dos tratamentos 2 e 8, é menor nas plantas expostas a tais tratamentos que nas outras plantas (Figura 2), o que também sugere que translocação das folhas para as raízes não seja a forma de ação destes tratamentos.



Dentre as variações percentuais nas concentrações dos metabólitos avaliados nas raízes das plantas expostas aos tratamentos 2 e 8, a mais expressiva diz respeito à quantidade total de alcaloides, que foi 41% maior no último tratamento. Avaliando apenas tal resultado, poder-se-ia pensar que os alcaloides teriam agido contra os nematoides, pois, como já dito anteriormente, estas substâncias podem apresentar atividade nematicida (Chitwood, 2002). No entanto, tal resultado não é coerente com o fato de os extratos das raízes das plantas expostas aos tratamentos 2 e 8 ocasionarem o mesmo número de J2 mortos (Figura 4) e com o fato de a concentração de alcaloides presentes nas raízes das plantas expostas ao tratamento 8 ser estatisticamente igual à observada na testemunha (Tween 80) e em outros tratamentos que não reduziram a população do nematoide na planta (Tabela 1).

Embora com menor eficiência no geral, a combinação de 3-hidroxiбутан-2-ona + 4-hidroxiбутан-2-ona (Tratamentos 5 e 11) também reduziu a população de nematoides (Tabela 1), o que parece de acordo com relatos sobre a capacidade da 3-hidroxiбутанона e análogos poderem ativar vários genes do sistema de defesa de *Arabidopsis* sp. (Ryu et al., 2003; Ryu et al., 2004; Farag et al., 2006). Aparentemente, estas substâncias não agiram diretamente contra o nematoide nas plantas, já que não afetaram a mortalidade de J2 de *M. exigua* no teste *in vitro* (Tabela 2). Como os extratos das raízes das plantas expostas a tais tratamentos aumentaram a mortalidade dos J2 *in vitro* (Figura 4), talvez estejam induzindo a produção de substâncias nematicidas pela planta.

As concentrações de carboidratos e sacarose foram superiores ao controle (Tween 80) nas raízes de plantas expostas ao tratamento 5, o que parece de acordo com o trabalho de Oliveira et al. (2007), segundo os quais a sacarose era uma das substâncias que conferiam atividade contra *M. exigua* aos extratos de bulbos de cebola (*Allium cepa*). Vale mencionar também que o tratamento 5

ocasionou aumento na concentração da trigonelina, o que pode induzir genes de defesa de plantas (Kraska & Schoenbeck, 1992).

Embora o tratamento 12 tenha reduzido a população de nematoides, parece improvável, a ação nematicida, uma vez que tal substâncias apresentaram pouco efeito sobre a mortalidade de J2 nos testes *in vitro* (Figura 4; Tabela 2), estes resultados divergem de alguns trabalhos da literatura, em exemplo podemos citar o linalool que é estruturalmente similar ao acetato de linalila, foi ativo contra *Meloidogyne incognita* quando na concentração de 1,0 mg.l<sup>-1</sup> (Ibraim; Traboulsi; El-Haj, 2006).

Com isso leva a pensar que o mecanismo de ação baseado na produção de compostos ativos contra *M. incognita*, nas plantas pulverizadas com as SOV's, parecia mais provável que atividade direta sobre os nematóides por essas substâncias, um estudo das alterações nas quantidades de alguns metabolitos presentes nas raízes de cafeeiro. Buscou-se averiguar a concentração de carboidratos e sacarose em cada planta, já que na literatura se encontram alguns dados de substâncias dessa classe com atividade contra nematoides (Oliveira et al., 2007), o tratamento (6) aumentou a produção de sacarose da planta, sugerindo que este carboidrato não pode estar relacionado com o modo de ação do presente tratamento. Embora o mesmo comportamento não foi observada para plantas de café pulverizadas para o tratamento (12), sugerindo que este carboidrato não se correlaciona a resistência da planta a nematoide.

De fato, observou-se que as plantas de café pulverizadas com acetato de linalila + nerolidol (6), apresentaram níveis de alanina superiores ao observado para o controle (Tween 80). No entanto, como este comportamento observado em plantas de café, não causaram redução na população de nematoide nas raízes de cafeeiro, acredita-se não ser possível fazer uma correlação entre a quantidade de alanina nas raízes das plantas e o modo de ação das SOV's (tratamento 6 e 12).

O uso da RMN também permitiu identificar o ácido clorogênico, que pode estar relacionada à resistência de plantas a nematoides (Hung; Rohde, 1973; Pegard et al., 2005). Como no presente estudo a concentração deste fenólico foi inferior ou igual a das plantas controle (Figura 2), acredita-se que tal substância não esteja relacionada com o mecanismo de ação das SOV's.

Quanto ao tratamento 7, que também reduziu a população do nematoide, a falta de atividade direta contra o nematoide por parte das SOV e do extrato das plantas expostas a tais substâncias, ele está de acordo com a capacidade do jasmonato de metila ativar genes de defesas em plantas (Bate & Rothstein, 1998).

## 7 CONCLUSÃO

A aplicação foliar de acetato de (E)-hex-2-enila + acetato de hexila (tratamento 3 e 9), *meso*-butano-2,3-diol + butano-1,2-diol + butano-1,3-diol + butano-1,4-diol (tratamento 4 e 8), 3-hidroxiбутан-2-ona + 4-hidroxiбутан-2-ona (tratamento 5), jasmona + jasmonato de metila (tratamento 7), ou de acetato de linalila + nerolidol (tratamento 12), reduziu a população de *M. exigua* nas raízes de cafeeiros, tendo os tratamentos 3, 4 e 8 sido os mais eficientes. Em nenhum dos casos se observou qualquer sinal de atividade fitotóxica por parte de tais tratamentos, o que os torna promissores para uso pelos cafeicultores para o controle do referido nematoide. Embora o mecanismo de ação de tais substâncias não tenha sido elucidado, os resultados obtidos sugerem que estejam induzindo as plantas a realizarem alterações metabólicas que possam afetar o desenvolvimento do parasita. Ademais, os resultados obtidos certamente motivarão a realização de novos experimentos com vistas a compreender melhor o mecanismo de ação de tais substâncias e a aperfeiçoar a metodologia desenvolvida

## 8 REFERÊNCIAS

AMARAL, D. R.; OLIVEIRA, F. E. R.; OLIVEIRA, D. F. Purification of two substances from bulbs of onion with nematicidal activity against *Meloidogyne exigua* Goeldi. **Nematology**, Leyden, v. 5, n. 6, p. 859-864, 2003.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analylis**. 5a ed. Washington, D.C., **A.O.A.C.**, 1960. p. 264-265.

ARIMURA, G.; KOST, C.; BOLAND, W. Herbivore-induced, indirect plant defences. **Biochimica et Biophysica Acta**, **Amsterdam**, v. 1734, n. 2, p. 91–111, Feb. 2005.

BACETTY, A. A. *et al.* Toxicity of endophyte-infected tall fescue alkaloids and grass metabolites on *Pratylenchus scribneri*, **Phytopathology**, Saint Paul, v. 99, p. 1336-1345, Dec. 2009.

BATE, N. J.; ROTHSTEIN, S. J. C-6 volatiles derived from lipoxygenase pathway induce a subset of defense-related genes. **Plant Journal**, Malden, v. 16, n. 5, p. 561-569, Dec. 1998.

BELL, E. A. Nonprotein Amino Acids of Plants: Significance in Medicine, Nutrition, and Agriculture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, v. 51, n. 10, p. 2854-2865, May 2003.

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

CHITWOOD, D. J. Research on plant-parasitic nematode biology conducted by the United States Department of Agriculture-Agricultural Research Services. **Pest management Science**, Brighton, v. 59, n. 6/7, p. 748-753, June/July 2003.

CHOI, I. *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, 2007.

COOPER, W. R.; JIA, L.; GOGGIN L. Effects of jasmonate-induced defenses on root-knot nematode infection of resistant and susceptible tomato cultivars. **Journal of Chemical Ecology**, Tampa, v. 31, n. 9, p. 1953-1967, Sept. 2005.

DONG, L. Q.; ZHANG, K. Q. Microbial control of plant-parasitic nematodes: a five-party interaction. **Plant and Soil**, Crawley, v. 288, n. 1-2, p. 31-45, Oct. 2006.

DROPKIN V.H. The necrotic reaction of tomatoes and other hosts resistant to *Meloidogyne*: reversal by temperature. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 59, n. 11, p. 1632-1637, 1969.

DUNN R. A. Extraction of cysts of *Heterodera* species from soils by centrifugation of high-density solutions. **Journal of Nematology**, Marceline, v. 1, n. 1, p. 7-17, Jan. 1969.

ENGELBERTH, J. *et al.* Airborne signals prime plants against herbivore attack. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 101, n. 6, p. 1781–1785, Feb. 2004.

FARAG, M. A. *et al.* GC–MS SPME profiling of rhizobacterial volatiles reveals prospective inducers of growth promotion and induced systemic resistance in plants. **Phytochemistry**, Washington, v. 67, n. 20, p. 2262–2268, Oct. 2006.

HEIL, M.; KOST, C. Priming of indirect defences. **Ecology Letters**, California, v. 9, p. 813–817, 2006.

HUNG, C.; ROHDE, R. A. Phenol accumulation related to resistance in tomato to infection by root-knot and lesion nematodes. **Journal of Nematology**, Marceline, v. 5, n.4, p. 253-258, Oct. 1973.

HUSSEY, R.S.; BAKER, K.R. “A Comparison of Methods for Collecting Inocula of *Meloidogyne* spp Including a New Technique”. **Plant Disease Reporter** 57(12), 1025-1028, 1973

IBRAIM, S. K.; TRABOULSI, A. F.; EL-HAJ, S. Effect of essential oils and plant extracts on hatching, migration and mortality of *Meloidogyne incognita*. **Phytopathologia Mediterranea**, Bologna, v. 45, n. 3, p. 238-246, 2006.

IKEDA, Y. *et al.* Sucrose and cytokinin modulation of WPK4, a gene encoding a SNF1-related protein kinase from Wheat1. **Plant Physiology**, Rockville, v. 121, n. 11, p. 813-820, Nov. 1999.

JOHNSON, R.; RYAN, C. A. Wound-inducible potato inhibitor II genes: enhancement of expression by sucrose. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 14, n. 4, p. 527-536, Apr. 1990.

KEELING, C. I.; BOHLMANN, K. J. Genes, enzymes and chemicals of terpenoid diversity in the constitutive and induced defence of conifers against insects and pathogens. **New Phytologist**, v. 170, n. 4, p. 657-675, June 2006.

KIM, H. *et al.* Effect of methyl jasmonate on secondary metabolites of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 54, n. 6, p. 2327-2332, Feb. 2006.

KISHIMOTO, K. *et al.* Components of C6-aldehyde-induced resistance in *Arabidopsis thaliana* against a necrotrophic fungal pathogen, *Botrytis cinerea*. **Plant Science**, Shannon, v. 170, n. 4, p. 715-723, Apr. 2006.

KISHIMOTO, K. *et al.* Volatile C6-aldehydes and Allo-ocimene Activate Defense Genes and Induce Resistance against *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell Physiology**, Kyoto, v. 46, n. 6, p. 1093-1102, May 2005.

KOST, C.; HEIL, M. Herbivore-induced plant volatiles induce an indirect defence in neighbouring plants. **Journal of Ecology**, Malden, v. 94, n. 3, p. 619-628, May 2006.

KRASKA, T.; SCHOENBECK, F. Resistance induction in plants by trigonelline and possible mechanisms. **Hung. Biochem. Soc.**, Budapest, Hung, 3rd, p. 163-8, 1992.

LOHAR, D. P. *et al.* Cytokinins play opposite roles in lateral root formation, and nematode and Rhizobial symbioses. **Plant Journal**, Malden, v. 38, n. 2, p. 203-214, Apr. 2004.

MACHADO, A. R. T. *et al.* Teores de fenóis totais em raízes de tomateiros infectados pelo nematóide *Meloidogyne incognita*. **XXII Encontro da Sociedade Brasileira de Química** – MG, Belo Horizonte, 06 a 09 de novembro de 2008.

MARTIN, D. *et al.* Methyl Jasmonate Induces Traumatic Resin Ducts, Terpenoid Resin Biosynthesis, and Terpenoid Accumulation in Developing Xylem of Norway Spruce Stems. **Plant Physiology**, Rockville, v. 129, n. 3, p. 1003-1018, July 2002.

OLIVEIRA, D. F. *et al.* The activity of amino acids produced by *Paenibacillus* macerans and from commercial sources against the root-knot nematode *Meloidogyne exigua*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 124, n.1, p. 57-63, May 2009.

OLIVEIRA, D. F. *et al.* Atividade de Carboidrato Purificado a Partir da Cebola (*Allium cepa* L.) e de Carboidratos Comerciais sobre Juvenis de *Meloidogyne exigua* Goeldi. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 31, n. 3, p. 202-209, 2007.

PARÉ, P. W. *et al.* Elicitors and priming agents initiate plant defense responses. **Photosynthesis Research**, Dordrecht, v. 85, n. 2, p. 149–159, 2005.

PARÉ, P. W.; TUMLINSON, J. W. Plant Volatiles as a Defense against Insect Herbivores. **Plant Physiology**, Rockville, v. 121, n. 2, p. 325–331, Oct. 1999.

PASSOS, L. P. **Métodos analíticos e laboratoriais em fisiologia vegetal**. Coronel Pacheco: EMBRAPA-CNPGL, 1996. 223 p.

PEGARD, A. *et al.* Histological Characterization of Resistance to Different Root-Knot Nematode Species Related to Phenolics Accumulation in *Capsicum annuum*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 95, n. 2, p. 158-165, June 2005.

REN, X. *et al.* Molecular cloning of a PR-5 like protein gene from cherry tomato and analysis of the response of this gene to abiotic stresses. **Molecular Biology Reports**, v. 38, n. 2, p. 801-807, 2011.

ROCHA, F. S. *et al.* Ação de exsudatos radiculares de plantas na eclosão, motilidade, mortalidade e penetração de juvenis de *Meloidogyne incognita*. **Summa phytopathologica**, Jaboticabal, v. 31, n. 2, p. 187-193, 2005.

RODA, A. L.; BALDWIN, I. T. Molecular technology reveals how the induced direct defenses of plants work. **Basic and Applied Ecology**, Jena, v. 4, n. 1, p. 15–26, 2003.

RODRIGUEZ-SAONA C. *et al.* Exogenous methyl jasmonate induces volatile emissions in cotton plants. **Journal of Chemical Ecology**, Tampa, v. 27, n. 3, p. 679–695, March 2001.

ROSE U. S. R. *et al.* Volatile semiochemicals released from undamaged cotton leaves – A systemic response of living plants to caterpillar damage. **Plant Physiology**, Rockville, v. 111, n. 2, p. 487–495, June 1996.

ROSENTHAL, G. A. L-Canavanine: a higher plant insecticidal allelochemical. **Amino Acids**, Vienna, v. 21, n. 3, p. 319-330, 2001.

RUTHER, J.; KLEIER, S. Plant-plant signaling: ethylene synergizes volatile emission in *Zea mays* induced by exposure to (Z)-3-Hexen-1-ol. **Journal of Chemical Ecology**, Tampa, v. 31, n. 9, p. 2217-2222, Sept. 2005.

RYU, C. *et al.* Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 134, n. 2, p. 1017-1026, Mar. 2004.

RYU, C. *et al.* Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 100, n. 8, p. 4927-4932, Apr. 2003.

SCOTT A. J.; KNOTT M. A. A cluster analyses method for grouping means in the analyses of variance. **Biometrics, Malden**, v. 30, n. 4, p. 502-12, Sept. 1974.

SIMONS, V. *et al.* Dual effects of plant steroidal alkaloids on *Saccharomyces cerevisiae*. **American Society for Microbiology**, v. 50, n. 8, p. 2732-2740, Aug. 2006.

SORIANO, I. R. *et al.* Inducible flavone in Oats (*Avena sativa*) is a novel defense against plant-parasitic nematodes. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 94, n. 11, p. 1207-1214, Nov. 2004.

SREEVIDYA, N.; MEHROTRA, S. Spectrophotometric method for estimation of alkaloids precipitable with Dragendorff's reagent in plant materials. **Journal of AOAC International**, v. 86, n. 6, p. 1124-1127, 2003.

TAKAISHI, K. *et al.* Synthesis and antinematodal activity of 3-n-alkylphenols. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, Tokyo, v. 68, n. 11, p. 2398-2400, Nov. 2004.

TSUKAYA, H. *et al.* Sugar-dependent expression of the CHS-A gene for chalcone synthase from petunia in transgenic *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 97, n. 4, p. 1414-1421, Dec. 1991.

ZUCKERMAN B. M.; MATHENY M.; ACOSTA N. Control of plant-parasitic nematodes by a nematocidal strain of *Aspergillus niger*. **J. Chem. Ecol.** v. 20, p. 33-43, 1994.



## ARTIGO 2

### Efeito *in vitro* e *in vivo* de substâncias orgânicas sobre *Meloidogyne* spp.

#### 1 RESUMO

Efeito *in vitro* e *in vivo* de substâncias orgânicas sobre *Meloidogyne* spp.

Com a finalidade de contribuir para o desenvolvimento de novos produtos para o controle de fitonematoides, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de estudar o efeito de substâncias orgânicas pré-selecionadas sobre *Meloidogyne exigua*, *M. incognita* e *M. javanica*. Dentre as substâncias avaliadas em testes *in vitro*, realizados com ovos e juvenis de segundo estágio (J2) dos nematoides, o cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (A) e o ácido pícrico (B) se destacaram, com concentrações letais contra 50% dos J2 de *M. incognita* (CL<sub>50</sub>) iguais a 133 µg.mL<sup>-1</sup> e 327 µg.mL<sup>-1</sup>, respectivamente, enquanto, nas mesmas condições, a CL<sub>50</sub> do nematicida comercial aldicarbe (C) era de 16 µg.ml<sup>-1</sup>. Quando aplicado em mudas de alface (*Lactuca sativa*) ou de soja (*Glycine max*), “A” reduziu a população de *M. incognita* nas raízes das plantas, embora não tenha sido tão eficiente quanto “C”, “B” se mostrou fitotóxico nos experimentos realizados com as mesmas espécies vegetais, o que impossibilitou avaliar a sua ação sobre a população do nematoide nas raízes das plantas. Estudos futuros deverão ser realizados com vistas a obter substâncias estruturalmente parecidas com o cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio, que possam ser mais eficientes no controle de *Meloidogyne* spp.

**Palavras-chave:** Fitonematoides, nematicida, tetrazol.

## 2 ABSTRACT

Aiming to contribute to the development of new products for controlling nematodes, this work studied the effect of pre-selected organic substances on *Meloidogyne exigua*, *M. incognita* and *M. javanica*. Among the substances evaluated *in vitro* against eggs and second stage juveniles (J2) of these nematodes, 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (A) and picric acid (B) stood out, with lethal concentrations against 50 % of *M. incognita* J2 (LC<sub>50</sub>) equal to 133 µg.ml<sup>-1</sup> and 327 µg.ml<sup>-1</sup>, respectively, while under the same conditions, the LC<sub>50</sub> of the commercial nematicide aldicarb (C) was 16 µg.ml<sup>-1</sup>. When sprayed on lettuce (*Lactuca sativa*) and soybean (*Glycine max*) seedlings, “A” reduced the population of *M. incognita* in the roots, although not as efficient as “C”. “B” was phytotoxic in the experiment conducted with the same plants species, being impossible to assess its effects on the nematode populations in the plant roots. Future studies should be conducted in order to obtain substances structurally similar to the 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, which can be more efficient for the control of *Meloidogyne* spp.

Keywords: Plant-parasitic nematodes, nematicide, tetrazole.

### 3 INTRODUÇÃO

Dentre os nematoides parasitas de plantas, se destacam os pertencentes ao gênero *Meloidogyne*, que contribuem para perdas anuais na agricultura da ordem de US\$ 125 bilhões (Chitwood, 2003). Como os métodos atualmente disponíveis para o controle destes fitoparasitas apresentam aspectos negativos, como custo elevado e danos ao ambiente, existe uma considerável demanda por novos produtos que possam minimizar os referidos aspectos negativos (Dong & Zhang, 2006). Em decorrência, vários trabalhos têm sido realizados em nosso grupo de pesquisas, com vistas a contribuir para contornar tais problemas, o que permitiu observar que alguns produtos pareciam apresentar alguma atividade contra *Meloidogyne* spp. Para dar continuidade a tal trabalho, buscou-se realizar testes *in vitro* com juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood, *M. exigua* Goeldi e *M. javanica* (Treub). Em seguida, utilizando-se soja e alface como modelos, avaliaram-se as influências das substâncias mais ativas *in vitro* sobre a população de *M. incognita* nas raízes de tais plantas.

### 4 MATERIAL E MÉTODOS

#### 4.1 Obtenção de ovos e juvenis de segundo estágio (J2) dos nematoides

Raízes de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L. Cv Kada), infestadas com *M. incognita* (Kofoid & White) Chitwood ou *M. javanica* (Treub) Chitwood, e de cafeeiro (*Coffea arabica* L. cv Mundo novo), infestadas com *M. exigua* (Goeldi), foram lavadas e cortadas em pedaços de 1,0 cm. Em seguida, foram trituradas em liquidificador, por 40 segundos, em solução de hipoclorito de sódio a 0,5% (g.g<sup>-1</sup>), seguindo-se a técnica de Hussey & Barker (1973),

modificada por Boneti & Ferraz (1981). A seguir, filtraram-se as misturas e os ovos retidos em peneira de 0,025 mm foram lavados com água destilada, sendo uma parte dos mesmos separada para os testes de eclosão. Outra parte dos ovos foi colocada em funil de Baermann (Dunn, 1969), no qual os juvenis do segundo estágio (J2) dos nematoides eclodiram e foram coletados após 48 e 72 horas, sem aqueles J2 obtidos durante as primeiras 24 horas, que foram descartados.

#### **4.2 Substâncias orgânicas comerciais**

Para a realização dos testes *in vitro* de eclosão e de mortalidade de J2 dos nematoides, as substâncias orgânicas, obtidas de fontes comerciais, foram dissolvidas em solução aquosa de Tween<sup>®</sup> 80 a 0,01 g.mL<sup>-1</sup> até atingirem a concentração de 500 µg.L<sup>-1</sup>. Empregaram-se: cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (>99,0%, Merck, Germany), ácido pícrico (ACS, Mast, Brasil), ácido tartárico (ACS, CRQ, Brasil), edathamil (>99,0%, Riedel), ácido ascórbico (ACS, Vetec, Brasil), ácido gálico (ACS, Merck, Germany), vermelho de fenol (ACS, Merck, Germany), azul de metileno (ACS, Merck, Germany), ácido cítrico (99,5%, Proquimios, Brasil), circlegrow (ACS, MP Biomedical, United States), azul brilhante de comassie (ACS, Merck, Germany), cetremide (98,0%, Proquimios, Brasil), ácido nicotínico (98,0%, Sigma, Brasil), tioureia (99,0%, Synth, Brasil), curcumina (ACS, Fluka, USA), verde de bromocresol (ACS, Merck, Germany) e tartarato de potássio e sódio (99,0%, Proquimios, Brasil).

#### **4.3 Teste *in vitro* de mortalidade de juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita*, *M. exigua* e *M. javanica***

Para a realização do experimento *in vitro*, que foi adaptado do método descrito por (Amaral; Oliveira; Oliveira, 2003), as soluções das substâncias

orgânicas (100 µL), obtidas conforme mencionado acima, foram colocadas em cada célula de 350 µL de uma placa de polipropileno com 96 células. Em seguida, colocaram-se 20 µL de uma suspensão aquosa contendo cerca de 25 J2 de *M. incognita*, *M. exigua* ou *M. javanica*, em cada célula, fazendo com que a concentração final de cada substância na cada cavidade fosse de 416,66 µg.mL<sup>-1</sup>. Depois de 48 horas a 28°C, no escuro, uma gota de NaOH a 1,0 mol.L<sup>-1</sup> foi adicionada ao conteúdo de cada célula e os nematoides foram contados. Aqueles que se mexiam ou que passaram os seus corpos de uma conformação em linha reta para ondulada ou em forma de gancho até 3 mm após a adição do NaOH foram considerados vivos, enquanto os demais foram considerados mortos. O experimento foi realizado com quatro repetições, utilizando-se solução aquosa de Tween<sup>®</sup> 80 a 0,01 g.mL<sup>-1</sup> como controle. Os valores foram transformados em porcentagem antes das análises estatísticas.

#### **4.4 Teste *in vitro* de eclosão de juvenis do segundo estágio (J2) dos nematoides**

As soluções das substâncias (200 µL), preparadas conforme descrito no item 4.2, foram colocadas em cada célula de 350 µL de uma placa de polipropileno de 96 células. Em seguida, colocaram-se 100 µL de uma suspensão aquosa contendo cerca de 25 ovos de *M. incognita*, *M. exigua* ou *M. javanica*, em cada cavidade, fazendo com que a concentração final de cada substância fosse de 333,33 µg.mL<sup>-1</sup>. Depois de 15 dias, os J2 eclodidos foram contados. O experimento foi realizado com cinco repetições, utilizando-se solução aquosa de Tween<sup>®</sup> 80 a 0,01 g.mL<sup>-1</sup> como controle. Os valores foram transformados em porcentagem antes das análises estatísticas.

#### **4.5 Determinação das concentrações letais das substâncias orgânicas para 50% dos juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne incognita* (CL<sub>50</sub>)**

As soluções de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (208, 146, 117, 83  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e de ácido pícrico (333, 317, 292, 250  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) em Tween<sup>®</sup> 80 a 10  $\text{g.L}^{-1}$ , e soluções aquosas de aldicarbe (33, 17, 8  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), foram submetidas ao teste *in vitro* de mortalidade de J2 de *M. incognita*, conforme descrito anteriormente. Para tanto, empregou-se a solução de Tween<sup>®</sup> 80 a 10  $\text{g.L}^{-1}$  como controle. Os valores de J2 mortos foram convertidos para percentagem, para serem corrigidos pela fórmula de Abbott (1957): valor correto =  $100 \times [(\text{tratamento} - \text{controle}) / (100 - \text{controle})]$ . A seguir, foram submetidos à análise de probit pelo programa estatístico SAEG (Sistema para análises Estatísticas, Versão 9.1: Fundação Arthur Bernardes, UFV, Viçosa, 2007).

#### **4.6 Efeitos das substâncias orgânicas sobre *Meloidogyne incognita* em alface e soja**

Sementes de alface (*Lactuca sativa* L. cv. Regina 500) e soja (*Glycine max* L. cv. BRS-MT Pintado), previamente desinfestadas com solução de hipoclorito de sódio a 1,0 % ( $\text{g.g}^{-1}$ ), foram semeadas em vasos plásticos de um litro contendo mistura esterilizada de solo e areia, na proporção de 1:1 (v/v). Após 20 dias em casa de vegetação, quando as mudas estavam com três pares de folhas, os vasos foram infestados pela aplicação no solo de 10 ml de suspensões de ovos contendo 5.000 e 3.000 ovos de *M. incognita* para as plantas de alface e soja, respectivamente. Logo em seguida, adicionaram-se ao solo 10 ml de solução de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio ou de ácido pícrico, solubilizados em Tween<sup>®</sup> 80 a 0,01  $\text{g.mL}^{-1}$ , nas concentrações de 2.060  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , 4.150

$\mu\text{g.mL}^{-1}$  e  $8.310 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , ou  $5.110 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ,  $10.220 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e  $20.440 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectivamente.

Para o cálculo das concentrações (C) das substâncias, se empregou a seguinte fórmula:  $C = \beta \times [(CL_{50} \text{ substância} \times 500) / CL_{50} \text{ aldicarbe}]$ .  $\beta$  correspondeu a um fator de correção que variou entre 1, 2 e 3. Empregaram-se 10 ml de aldicarbe a  $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e 10 ml de Tween<sup>®</sup> 80 a  $0,01 \text{ g.mL}^{-1}$ , como controle positivo e negativo, respectivamente. Passados 30 dias (para plantas de alface) ou 40 dias (para plantas de soja) após as aplicações das substâncias orgânicas, a parte aérea de cada planta foi removida, seca por 48 horas em estufa ventilada a  $40^{\circ}\text{C}$ , e pesada. As raízes foram cuidadosamente retiradas do substrato, lavadas com água e secas em toalha de papel e pesadas. Contaram-se as galhas em cada sistema radicular que, em seguida, foi cortado em pedaços de 1,0 cm para a extração de ovos de acordo com a técnica de Hussey & Barker (1973). Os ovos foram contados em cada suspensão resultante pela utilização de um microscópio invertido. Este experimento foi conduzido em delineamento em blocos casualizados, empregando-se cinco repetições. Os números de galhas e de ovos foram divididos pelas massas das raízes e os resultados de tal operação foram convertidos de acordo com a seguinte fórmula antes de serem submetidos aos cálculos estatísticos:  $X = \sqrt{Y + 1}$ , sendo X referente ao valor transformado, enquanto Y é o valor do tratamento.

#### 4.7 Análise estatística

Os valores obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), empregando-se o programa computacional SISVAR (Sistema para análises Estatísticas, Versão 5.1, UFLA, Lavras, 2006), por meio do qual, logo em seguida, compararam-se as médias segundo o teste de Scott & Knott (1974), a 5% de probabilidade.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Mortalidade e eclosão *in vitro* de juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita*, *M. exigua* e *M. javanica*

Dentre as 17 substâncias testadas contra J2 de *M. incognita*, apenas o ácido pícrico e o cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio se mostraram promissores para o emprego no controle de nematoides fitoparasitas, com valores de 96,7% e 91,8% de J2 mortos, respectivamente (Tabela 1). A mortalidade causada por estas substâncias também foi elevada para *M. exigua* e *M. javanica*, o que corroborou o resultado obtido com *M. incognita*. Quanto às outras substâncias testadas contra *M. incognita*, a exceção do ácido tartárico, que causou morte de 35,1% dos J2, todas as outras acarretaram a obtenção de valores próximos ou estatisticamente iguais aos da testemunha (Tween 80). Dentre as substâncias inativas ou pouco ativas contra J2 de *M. incognita*, a maior parte também se mostrou inativa contra J2 de outros nematoides. No entanto, o circlegrow causou 61,2% de mortalidade de J2 de *M. exigua*, enquanto o edathamil matou 56,1% e 52,5% dos J2 de *M. exigua* e *M. javanica*, respectivamente.

No teste de eclosão se observou que o cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio também foi muito ativo contra todas as espécies de *Meloidogyne* estudadas (Tabela 1), o que confirmou a ação desta substância contra nematoides que tinha sido observada no teste de mortalidade de J2 (Tabela 1). Quanto ao ácido pícrico, observou-se forte ação inibidora da eclosão nos testes com *M. incognita* e *M. javanica*. Também se observou coerência entre os resultados de ambos os testes, quando se compararam os valores para o edathamil, que se mostrou ativo contra *M. exigua* e *M. javanica*, nos testes de mortalidade e de eclosão dos J2. Dentre as outras substâncias, observou-se que algumas tinham forte influência sobre a eclosão de J2, embora os valores no teste de mortalidade de J2 tivessem



sido iguais ou próximos do observado para a testemunha. Este foi o caso, por exemplo, do azul de metileno, que não teve qualquer influência sobre a mortalidade de J2 das três espécies nematoides, mas reduziu a eclosão de J2 de *M. javanica* para valores estatisticamente iguais ao observado para o ácido pícrico. O circlegrow também teve pouca ou nenhuma influência sobre a mortalidade de J2 de *M. incognita* e *M. javanica*, mas foi muito ativo sobre a eclosão de J2 destas mesmas espécies de nematoide.

Tabela 1 Influências de substâncias orgânicas, na concentração de 416,6 µg.mL<sup>-1</sup>, sobre a mortalidade e eclosão de juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita*, *M. exigua* e *M. javanica*

| Tratamentos | Substâncias orgânicas               | J2 mortos (%)       |                  |                    | J2 eclodidos (%)    |                  |                    |
|-------------|-------------------------------------|---------------------|------------------|--------------------|---------------------|------------------|--------------------|
|             |                                     | <i>M. incognita</i> | <i>M. exigua</i> | <i>M. javanica</i> | <i>M. incognita</i> | <i>M. exigua</i> | <i>M. javanica</i> |
| 1           | Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio | 91,9 a              | 99,1 a           | 83,5 a             | 3,9 a               | 8,7 a            | 3,2 a              |
| 2           | Ácido pícrico                       | 96,7 a              | 100,0 a          | 91,0 a             | 0,7 a               | 45,7 b           | 1,2 a              |
| 3           | Ácido tartárico                     | 35,1 b              | -                | -                  | -                   | -                | -                  |
| 4           | Edathamil                           | 10,7 c              | 56,1 b           | 52,5 b             | 63,2 d              | 30,1 a           | 10,2 a             |
| 5           | Ácido ascórbico                     | 9,9 c               | -                | -                  | 25,2 b              | -                | -                  |
| 6           | Ácido gálico                        | 7,1 c               | -                | -                  | -                   | -                | -                  |
| 7           | Vermelho de fenol                   | 6,5 c               | -                | -                  | -                   | -                | -                  |
| 8           | Azul de metileno                    | 5,8 c               | 2,7 d            | 10,7 c             | -                   | -                | 9,6 a              |
| 9           | Ácido cítrico                       | 5,4 c               | 24,3 c           | 22,0 c             | -                   | 41,6 b           | 39,0 b             |
| 10          | Circlegrow                          | 4,2 c               | 61,2 b           | 18,2 c             | 2,4 a               | 24,4 a           | 7,52 a             |
| 11          | Azul brilhante de Comassie          | 4,2 c               | 3,5 d            | 1,7 c              | -                   | -                | 32,2 b             |
| 12          | Cetremide                           | 2,9 d               | 6,7 d            | 8,0 c              | -                   | 42,0 b           | 21,7 a             |
| 13          | Ácido nicotínico                    | 1,1 d               | 11,4 d           | 7,6 c              | -                   | 52,1 b           | 41,8 b             |
| 14          | Tioureia                            | 0,6 d               | -                | -                  | -                   | -                | -                  |
| 15          | Curcumina                           | 0,0 d               | -                | -                  | -                   | -                | -                  |
| 16          | Verde de bromocresol                | 0,0 d               | 20,2 c           | 11,0 c             | 45,9 c              | 43,7 b           | 34,1 b             |
| 17          | Tartarato de potássio e sódio       | 0,0 d               | 0,9 d            | 6,6 c              | -                   | 50,3 b           | 31,8 b             |
| 18          | Tween 80 a 0,01 g.ml <sup>-1</sup>  | 0,0 d               | 0,7 d            | 6,6 c              | 68,5 d              | 38,4 b           | 52,4 c             |
|             | C.V. (%)                            | 30,3                | 17,7             | 36,8               | 13,9                | 37,5             | 43,6               |

\*As médias seguidas da mesma letra, em cada coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott ( $P \leq 0,05$ )

- Não foi avaliado

Por se mostrarem os mais ativos tanto no teste de mortalidade quanto no de eclosão de J2 para as três espécies de nematoide, o cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio e o ácido pícrico foram novamente submetidos ao teste de mortalidade de J2 de *M. incognita* em diferentes concentrações. Com isso, observou-se que apresentavam concentrações letais contra 50% da população do nematoide (CL<sub>50</sub>) de 133,23 µg.ml<sup>-1</sup> e 327,78 µg.ml<sup>-1</sup>, respectivamente. Nas mesmas condições, o nematicida comercial aldicarbe apresentou CL<sub>50</sub> de 16,5 µg.ml<sup>-1</sup>.

## **5.2 Efeito das substâncias orgânicas sobre *Meloidogyne incognita* em alface e soja**

Por serem os produtos mais ativos *in vitro* contra todos os nematoides estudados, o cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio e o ácido pícrico foram empregados no experimento *in vivo*. Nas duas menores concentrações observou-se que a primeira substância reduziu a população de *M. incognita* em plantas de alface e soja (Tabela 2). No entanto, à exceção do número de ovos por raiz para a planta de alface tratada com o cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio na concentração de 4150 µg.ml<sup>-1</sup>, a população do nematoide foi sempre superior à observada em plantas tratadas com aldicarbe a 500 µg.ml<sup>-1</sup>. Na maior concentração (8300 µg.ml<sup>-1</sup>) estudada, o cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio se mostrou muito tóxico às plantas, o que inviabilizou a condução do experimento. Quanto ao ácido pícrico, foi observada intensa atividade fitotóxica em todas as concentrações utilizadas, o que acarretou a morte das plantas.

Tabela 2 Número de galhas e ovos de *Meloidogyne incognita* em raízes de *Lactuca sativa* e *Glycine max* tratadas com substâncias orgânicas e inoculadas com ovos do nematoide

| Tratamentos | Substâncias orgânicas   | <i>L. sativa</i>               |                              | <i>G. Max</i>                  |                              |
|-------------|---|--------------------------------|------------------------------|--------------------------------|------------------------------|
|             |   | Galhas/raiz (g <sup>-1</sup> ) | Ovos/raiz (g <sup>-1</sup> ) | Galhas/raiz (g <sup>-1</sup> ) | Ovos/raiz (g <sup>-1</sup> ) |
| 1           | Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (2060 µg.ml <sup>-1</sup> ) | 241,0 c                        | 1883,6 b                     | 61,6 c                         | 66,8 c                       |
| 2           | Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (4150 µg.ml <sup>-1</sup> ) | 121,2 b                        | 304,8 a                      | 16,4 b                         | 34,4 b                       |
| 3           | Aldicarbe (500 µg.ml <sup>-1</sup> )                            | 4,6 a                          | 44,4 a                       | 1,4 a                          | 0,0 a                        |
| 4           | Tween <sup>®</sup> 80 (0,01 g.ml <sup>-1</sup> )                | 333,4 d                        | 1916,6 b                     | 78,8 d                         | 61,8 c                       |
|             | C. V. (%)   | 17,5                           | 42,8                         | 32,1                           | 39,8                         |

\* As médias seguidas das mesmas letras em cada coluna não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott ( $P \leq 0,05$ )

## 6 DISCUSSÃO

Os testes *in vitro* e *in vivo* confirmaram a ação nematicida preliminarmente observada para o cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (Figura 1; Tabela 1 e 2), para o qual não se havia descrito qualquer atividade nematicida na literatura. No entanto, é importante mencionar que Hurwitz & Mc Carthy (1986) e Mustakallio & Aho (1955) haviam mencionado a ação biocida desta substância, quando em elevada concentração. Talvez o seu mecanismo de ação se baseie na inibição da biossíntese de esteróis, o que possibilita a ausência de ergosterol e, consecutivamente, o aumento de compostos intermediários que, por sua vez, promovem uma desorganização da estrutura celular. Em caso de doses elevadas se observam danos diretos sobre a membrana, assim como alterações morfológicas das células de fungos (Hewitt, 1998). Estas alterações se caracterizam por inchamento das células, vacuolização excessiva, septação incompleta, aparecimento de vesículas entre as membranas e a parede celular e a formação de inclusões membranosas das células fúngicas (Forcelini, 1994; Tomlin, 2002).

O cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (Figura 1) se enquadra no grupo dos tetrazóis, que são compostos heterocíclicos aromáticos de cinco membros, contendo quatro átomos de nitrogênio (Figura 1), pertencentes à classe de substâncias denominada genericamente de azol. O núcleo tetrazólico está presente em diversas moléculas de importância farmacológica, o que pode ser exemplificado pela atividade anti-hipersensitiva do losartan (Roth; Kleemann; Beisswenger, 1996; Gilman et al., 1991).

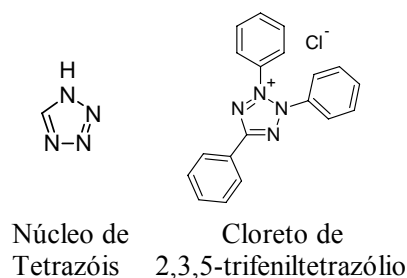


Figura 1 Núcleo fundamental dos tetrazóis e estrutura do cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio

Como os tetrazóis apresentam enorme diversidade estrutural (Beier et al., 2011; Watanabe et al., 2003) e demonstram baixa toxicidade ao ser humano (Gilman et al., 1991), acredita-se que seja possível chegar a estruturas com maior atividade nematicida e menor efeito fitotóxico, tendo o cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio como modelo inicial. Afinal, no único estudo sobre o uso de tetrazóis para controle de fitonematoides, observou-se que as substâncias eram ativas contra *M. incognita* na concentração de  $10 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  (Watanabe et al., 2003)

O ácido pícrico proporcionou resultados nos testes *in vitro* que variaram de acordo com a espécie de *Meloidogyne* empregada. Apesar de inibir a eclosão de J2 de *M. incognita* e *M. javanica*, tal substância não teve qualquer efeito sobre a eclosão de J2 de *M. exigua* (Tabela 1). Trata-se de um resultado parecido com o observado por Clarke & Shepherd (1967), segundo os quais o ácido pícrico pode inibir a eclosão de *Heterodera rostochiensis*, mas não tem qualquer efeito sobre a eclosão de *H. schachtii* e *H. tabacum*.

Quanto ao edathamil, que se trata de um composto à base de cálcio, com grande aplicação como quelante de metais pesados, alguns trabalhos relatam sua utilização como nematicida quando complexado a cloreto de zinco (Tefft et al., 1984). Dentre os poucos trabalhos relatados na literatura sobre o efeito de edathamil em nematoides, pode-se citar o desenvolvido por Singh et al. (1980), que verificaram a atividade inibitória da isoenzima fosfatase de *Setaria cervi*,

que se trata de um nematoide parasita de animais, quando o mesmo era exposto ao edathamil na concentração de 10 mmol.L<sup>-1</sup>. Apesar de não ter sido observada atividade por parte do edathamil contra *M. incognita*, verificou-se que ovos e J2 de *M. exigua* e *M. Javanica* foram afetados por tal produto (Tabela 1). Não foram encontrados dados que possam ser utilizados para explicar as variações ocorridas na atividade do edathamil contra os nematoides empregados neste trabalho.

O circlegrow, que é um meio de cultura utilizado no cultivo de *Escherichia coli* (Lombardi; Harakava; Colariccio, 2010), inibiu a eclosão de J2 de *M. exigua*, mas se mostrou inativo em todos os outros testes *in vitro* realizados. De forma análoga ao edathamil, também não há dados para explicar as variações ocorridas.

Quanto ao ácido tartárico, a falta de atividade nematicida no presente trabalho está de acordo com o trabalho de Peterdi et al. (1984), segundo os quais esta substância era inativa contra J2 de *M. incognita* mesmo em concentração duas vezes maior que a empregada no presente trabalho.

Apesar da mortalidade de J2 de *M. incognita* expostos à solução do ácido gálico não ter sido elevada no presente trabalho, o resultado está de acordo com a ação desta substância sobre *Caenorhabditis elegans*, que foi descrita por Abdel-Aty (2007), e com a atividade nematicida contra J2 de *M. incognita*, descrita por (Sultana; Akhter; Khatoon, 2010).

Quanto às demais substâncias, elas mostraram-se inativas contra os nematoides. No entanto, vale mencionar que, apesar da ausência de atividade nematicida, segundo dados da literatura, a tioureia é capaz de reduzir a população de *M. javanica* nas raízes de plantas (Glazer & Orion, 1984).

## 7 CONCLUSÃO

Dentre as substâncias orgânicas testadas, o cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio foi o que se mostrou com maior potencial para o desenvolvimento de novos produtos para o controle de *Meloidogyne* spp. Logo, novos estudos serão realizados, com vistas a desenvolver tetrazóis mais eficientes no controle destes fitoparasitas.

## 8 REFERÊNCIAS

ABDEL-ATY; AHMED, S. Pesticide Chemistry Department, Faculty of Agriculture, Alexandria University, Egypt. Alexandria Science Exchange Journal, Society for Soil and Water Research v. 28, n. 1, p. 1-8, 2007.

AMARAL D. R.; OLIVEIRA F. E. R.; OLIVEIRA D. F. Purification of two substances from bulbs of onion with nematicidal activity against *Meloidogyne exigua* Goeldi. **Nematology**, Leyden, v. 5, n. 6, p. 859-864, 2003.

BEIER, C. *et al.* Fungicide Hydroximoyl-Tetrazole derivatives. **Número da patente: US 2011/0015236 A1**, 20 de janeiro de 2011.

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

CHITWOOD, D. J. Research on plant-parasitic nematode biology conducted by the United States Department of Agriculture-Agricultural Research Services. **Pest management Science**, Brighton, v. 59, n. 6/7, p. 748-753, June/July 2003.

CLARKE, A. J.; SHEPHERD, A. M. Flavianic acid as a hatching agent for Heterodera cruciferae and other cyst nematodes. **Nature London**, London, v. 213, n. 5074, p. 419-420, Jan. 1967.

DONG, L. Q.; ZHANG, K. Q. Microbial control of plant-parasitic nematodes: a five-party interaction. **Plant and Soil**, Crawley, v. 288, n. 1-2, p. 31-45, Oct. 2006.



DUNN R. A. Extraction of cysts of *Heterodera* species from soils by centrifugation of high-density solutions. **Journal of Nematology**, Marceline, v. 1, n. 1, p. 7-17, Jan. 1969.

FORCELINI, C. A. Fungicida inibidores da síntese de esteróis. I. triazoles. **RAPP**, v. 2, p. 355-335, 1994.

GILMAM, A. G. *et al.* **Goodman & Gilman - As Bases Farmacológicas da Terapêutica**, 8ª ed., Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 1991.

GLAZER, I.; ORION, D. Influence of urea, hydroxyurea, and thiourea on *Meloidogyne javanica* and infected excised tomato roots in culture. **Journal of Nematology**, Marceline, v. 16, n. 2, p. 125-130, Apr.1984.

HEWITT, H.G. **Fungicides in Crop Protection**. Wallingford, UK, CAB International, 221 p, 1998.

HURWITZ, C. N.; MC CARTHY, T. J. 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a novel tool in germicide dynamics. **Journal Pharmaceutical Sciences**, Malden, v. 75, n. 9, p. 912-916, Sept. 1986.

HUSSEY R. S, BAKER 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.

LOMBARDI, R.; HAKAKAVA, R.; COLARICCIO, A. Clonagem e purificação de fragmento da proteína capsial de *Banana streak OL vírus*. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 45, n. 8, p. 811-817, 2010.

MUSTAKALLIO, K. K.; AHOS, E. O. Tetrazolium reduction test for milk. **Science**, Washington, v. 122, p. 971-972, 1955.

PETERDI, A. S.; ISTVAN, V. R. Nematocidal and insecticidal composition. European Patent Application, **Patente número Application: EP 83-306552 19831027**. Priority: HU 82-3437 19821027, 40 p., 1984.

ROTH, H. J.; KLEEMANN, A.; BEISSWENGER, T. *Pharmaceutical Chemistry Drug Synthesis*, Chichester: Ellis Harwood, 1988; Tavares, W. (1996). **Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Antiinfecciosos**, Atheneu: Belo Horizonte, 1988.

SAEG: sistema para análises: versão 9.1. (2007). Viçosa, MG: Fundação Arthur Bernardes. Disponível em: <http://www.ufv.br/saeg/>. Acesso em: 15 março 2010.

SCOTT A. J.; KNOTT M. A. A cluster analyses method for grouping means in the analyses of variance. **Biometrics, Malden**, v. 30, n. 4, p. 502-12, Sept. 1974.

SINGH, K.; SHARMA, S. Alakaline phosphomonoesterases in *Setaria cervi* (Rudolfi, 1819). **Indian Journal of Parasitology**, v. 4, n. 2, p. 227-231, 1980.

SULTANA, N.; AKHTER, M.; KHATOON, Z. Nematicidal natural products from the aerial parts of *Rubus niveus*. **Natural Product Research**, v. 24, n. 5, p. 407-415, 2010.

TEFFT, P. M.; BONE, L. W. Zinc-mediated hatching of eggs of soybean cyst nematode, *Heterodera glycines*. **Journal of Chemical Ecology**, Tampa, v. 10, n. 2, p. 361-372, Feb. 1984.

TOMLIN, C. D. S. The pesticide manual: a world compendium. Surrey, Uk: British Crop Protection Council, 12 ed., 1 - CD-ROM, 2002.

WATANABE, Y. *et al.* Nematicidal Tetrazole-containing trifluorbutenes. **Patente número C07D 257/04**, 24 de dezembro de 2003.