



ALINE FERREIRA BARROS

**COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS DE
PLANTAS NO CONTROLE DE *Meloidogyne
incognita***

LAVRAS – MG

2014

ALINE FERREIRA BARROS

**COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS DE PLANTAS NO
CONTROLE DE *Meloidogyne incognita***

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

Orientador

Dr. Vicente Paulo Campos

LAVRAS – MG

2014

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

Barros, Aline Ferreira.

Compostos orgânicos voláteis de plantas no controle de
Meloidogyne incognita / Aline Ferreira Barros. – Lavras : UFLA,
2014.

93 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.

Orientador: Vicente Paulo Campos.

Bibliografia.

1. Biofumigação. 2. Nematóide das galhas. 3. Manejo. I.
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 632.65182

ALINE FERREIRA BARROS

**COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS DE PLANTAS NO
CONTROLE DE *Meloidogyne incognita***

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

APROVADA em 18 de fevereiro de 2014

Dr. Eduardo Alves	UFLA
Dr. Flávio Henrique Vasconcelos de Medeiros	UFLA
Dr. Márcio Pozzobon Pedroso	UFLA
Dr. Fernando da Silva Rocha	UFMG

Dr. Vicente Paulo Campos
Orientador

**LAVRAS – MG
2014**

*A Deus,
Aos meus pais Sebastião e Maria das Graças,
Ao meu marido Josimar,
Aos meus irmãos,
A minha sobrinha Alice,
Aos meus avós,
À toda minha família e amigos.*

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me amparar nos momentos difíceis.

À minha família, em especial aos meus pais e meu marido, pelo carinho, paciência e incentivo.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Fitopatologia, pela oportunidade de realização do Programa de Pós-Graduação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

Ao professor Vicente Paulo Campos, pela orientação, paciência e pelos ensinamentos.

Aos professores Edson Ampélio Pozza, Flávio H V Medeiros, Márcio Pozzobon Pedroso, Eduardo Alves, Fernando da Silva Rocha pelas sugestões e informações necessárias à correção deste trabalho.

A todos os professores da UFLA, que participaram da minha formação científica.

À todos os funcionários do DFP, em especial ao grande amigo Tarlei Luiz de Paula.

Aos amigos do laboratório de Nematologia: Júlio, Liliana, Arinaldo, Eduardo, Lilian, Willian, Lívia, Luma, Ana Luíza, Thaisa, Samantha, Felipe, Simone, Guilherme, Tarlei e Cleber, por toda dedicação, companheirismo e ajuda nos experimentos.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Voláteis emitidos por plantas, como na biofumigação com brássicas, reduzem populações de fitopatógenos, porém são poucos os estudos sobre os seus efeitos a fitonematóides. Compostos orgânicos voláteis (COVs) emitidos por várias plantas estudadas neste trabalho causaram imobilidade significativa a juvenis de segundo estágio (J_2) de *M. incognita* (MI), tanto em macerado seco, quanto no macerado aquoso comparados ao controle, com maior imobilidade dos J_2 em macerado seco mesmo nas menores quantidades. Embora os macerados secos e aquosos de nim e mostarda emitiram COVs que causaram imobilidade, reduziram o número de galhas e de ovos em tomateiro causados pelos J_2 a eles expostos, os COVs do macerado seco foram sempre mais danosos aos J_2 . Água destilada exposta aos COVs emitidos por nim e mostarda por 3 dias causaram imobilidade significativa em J_2 quando nela imersos comparados ao controle. A análise por cromatografia gasosa revelou a presença de 58 e 32 COVs emitidos por macerados de nim e mostarda, respectivamente. No macerado de nim predominaram as classes de alcoóis e ésteres. Já no macerado de mostarda ocorreu grande diversidade de classes químicas nos COVs identificados, destacando-se os compostos contendo enxofre (principalmente isotiocianatos) e alcoóis. Macerados secos de nim e mostarda emitiram COVs que causaram imobilidade significativa de J_2 já nos primeiros períodos de exposição. Mortalidade significativa foi observada a partir de 24 horas de exposição aos COVs. Os números de galhas e de ovos de MI resultantes da inoculação em tomateiro dos J_2 expostos aos COVs diminuíram com o aumento do tempo de exposição. Assim confirmaram como efeito nematocida, as avaliações anteriores de imobilidade e mortalidade, a partir de 24 horas de exposição dos J_2 . O processo de biofumigação, em ambiente vedado com plástico, utilizando macerado de nim ou mostarda incorporado ao substrato infestado com ovos de MI resultou na redução linear de galhas com o aumento da quantidade dos macerados, sendo menor que a testemunha na maior quantidade (9,6g). Contudo, o número de ovos já foi significativamente reduzido em comparação à testemunha em quantidades de macerado acima ou igual a 2,4 g. Os J_2 expostos aos COVs emitidos pelo macerado de nim ou mostarda, incorporado ao substrato e retidos na câmara formada na superfície pela cobertura plástica, causaram imobilidade e mortalidade significativa dos J_2 já na

menor quantidade. Esses voláteis seriam perdidos na ausência de cobertura plástica.

Palavras-chave: Biofumigação. COVs de plantas. Controle biológico. Nematóides das galhas.

ABSTRACT

Volatiles emitted by plants, as in biofumigation with brassica reduce populations of plant pathogens, but only a few studies have been done on their effects on plant parasitic nematodes. Volatile organic compounds (VOCs) emitted by various plants studied in this work caused significant immobility on second stage juveniles (J_2) of *M. incognita* (MI) in both dry and aqueous macerate compared to the control, with greater immobility of J_2 in dry macerate even at lower amounts. Also VOCs of dried macerates caused always more damage to J_2 compared to aqueous macerate when J_2 immobility, number of galls and eggs in tomato were evaluated. Distilled water exposed to VOCs emitted by neem and mustard for 3 days caused significant immobility in J_2 when immersed in it compared to the control. Analysis by gas chromatography showed the presence of 58 and 32 VOCs emitted by neem and mustard macerates, respectively. In neem macerate predominated classes of alcohols and esters. In mustard macerates a wide variety of chemical classes were identified especially, the sulfur-containing compounds (mainly isothiocyanates) and alcohols. Dried macerates of neem and mustard emitted VOCs that caused significant J_2 immobility already in the early periods of exposure. Significant J_2 mortality was observed after 24 hours of exposure to VOCs. The number of galls and egg resulting from the inoculation of MI in tomato from J_2 exposed to VOCs decreased with increasing exposure time. Thus confirmed as nematicide effect, previously evaluated as immobility and mortality after 24 hours of exposure of J_2 . The process of biofumigation in sealed plastic environment using neem or mustard macerated incorporated into the substrate infested with eggs of MI resulted in a linear decrease of galls with increasing amount of macerates being lower than the control at the highest amount (9.6g). However, the number of eggs was significantly reduced compared to control at above or equal macerate amount of 2.4 g macerate. The VOCs emitted to the air and held on the surface by the plastic sealing caused significant J_2 immobility and mortality even at the

lowest macerate amount. These volatiles would be lost in the absence of plastic cover.

Keywords: Biofumigation. Plants VOCs. Biological control. Root knot nematode.

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	
1	INTRODUÇÃO	10
2	REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1	Importância econômica e manejo dos fitonematoides	12
2.2	Algumas plantas que possuem moléculas com efeito nematicida	14
2.3	Compostos orgânicos voláteis (COVs) tóxicos a fitonematoides ...	21
3	CONSIDERAÇÕES GERAIS	25
	REFERÊNCIAS	26
	SEGUNDA PARTE – ARTIGOS	35
	ARTIGO 1 Nematicidal activity of volatile organic compounds emitted by <i>Brassica juncea</i>, <i>Azadirachta indica</i>, <i>Canavalia ensiformis</i>, <i>Mucuna pruriens</i> and <i>Cajanus cajan</i> against <i>Meloidogyne incognita</i>	35
	ARTIGO 2 Tempo de exposição de juvenis de segundo estágio a voláteis emitidos por macerados de nim e mostarda e biofumigação contra <i>Meloidogyne incognita</i>	68

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

Os nematoides pertencentes ao gênero *Meloidogyne* Goeldi, 1887, constituem um dos grupos de patógenos de maior importância econômica para a agricultura. Em todo o mundo, são estimadas perdas médias anuais de 12,3% na produtividade das principais culturas (SASSER; FRECKMAN, 1987). Entretanto, existe por parte da sociedade e produtores uma resistência aos métodos empregados no controle desses patógenos. A sociedade (consumidores e compradores) tem restringido o uso de nematicidas de tarja vermelha - perfazendo a maioria dos nematicidas no mercado, os quais são altamente tóxicos ao homem, animais e causa contaminação do meio ambiente.

A possibilidade de resíduo nos alimentos comercializados leva à rejeição da produção pelo comprador, o que gera preocupação para o produtor. O nematicida Nemagon[®] foi retirado do mercado por afetar a reprodução humana (REVISTA ENVÍO, 2005) e o Aldicarb[®], também, foi retirado do mercado em 2012 após várias décadas de comercialização no mercado mundial. Outra preocupação é com a camada de ozônio. Segundo o Protocolo de Montreal, o brometo de metila deveria ter o seu uso eliminado em 2005, nos países desenvolvidos e em 2015, nos países em desenvolvimento, pois esse fumigante acelera o processo de destruição da camada de ozônio da atmosfera, cuja função é proteger a superfície da terra contra a entrada de raios ultravioletas (DUNIWAY, 2002). Após essa data, a previsão de uso será somente nos programas de quarentena. É interessante ressaltar que o governo brasileiro antecipou-se aos prazos estabelecidos pelo Protocolo de Montreal, retirando o brometo de metila do mercado em dezembro de 2006 (MAPA, 2005).

Desta forma, tem aumentado a busca por métodos alternativos para o controle de fitonematoides. O uso de extratos vegetais com propriedades nematicidas representa uma alternativa promissora para o controle desses patógenos. Na literatura são relatados exemplos de diversas plantas com potencial para a produção de nematicidas naturais (MANI; CHITRA, 1989; HUSSAINI et al., 1996; FERRIS; ZHENG, 1999). Substâncias como alcalóides, ácidos graxos, isotiocianatos, glicosídeos cianogênicos, terpenóides, compostos fenólicos e outros são encontradas em algumas espécies de plantas com comprovada ação nematicida (LAZZERI et al., 1993; FERRIS; ZHENG, 1999).

Contudo, as moléculas voláteis produzidas por plantas poderiam aumentar a toxicidade de extratos a fitonematoides além de servirem como modelo para a síntese de moléculas potenciais como nematicidas no mercado. Os nematicidas voláteis não deixam resíduos nos alimentos e são eficazes nematotóxicos em períodos de curta exposição ao produto. Sabe-se que as plantas podem produzir mais de 1700 compostos orgânicos voláteis (COVs), para se defender dos animais e micro-organismos patogênicos (KNUDSEN; GERSHENZON, 2006), entretanto, pouco se sabe sobre a toxicidade dos COVs de plantas a fitonematoides. Objetivou-se, neste trabalho avaliar a toxicidade dos compostos orgânicos voláteis emitidos por várias plantas a *Meloidogyne incognita*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Importância econômica e manejo dos fitonematoides

Os nematoides constituem o grupo de animais multicelulares mais abundantes em número de indivíduos no universo, estimado em um milhão de espécies (VIGLIERCHIO, 1991). Nesse grupo, os fitonematoides, causam perdas anuais de cerca de 100 bilhões de dólares em todo o mundo, sendo 70% dos danos causados pelos fitonematoides atribuídos aos nematoides de galhas (SASSER; FRECKMAN, 1987).

Os fitonematoides estão entre os patógenos de plantas de maior dificuldade de controle. O manejo desses patógenos tem sido realizado pela utilização, entre outras práticas, de plantas resistentes, rotação de cultura, práticas culturais, além do controle químico.

O controle químico de fitonematoides tem sua recomendação restrita, devido à inexistência de produtos eficazes e de baixo custo que não agridem a saúde humana e o meio ambiente. Além disto, há carência de registro de nematicidas em muitas culturas e mesmo alguns produtos sintéticos estão sendo proibidos mundialmente, como o brometo de metila, o qual, pertence a classe I das substâncias destruidoras do ozônio da estratosfera (THOMAS, 1996; DUNIWAY, 2002), além de ser altamente tóxico e reduzir a biodiversidade do solo (LOPEZ-PEREZ et al., 2003). Devido a estas desvantagens, muitos pesquisadores têm tentado desenvolver estratégias para o controle dos fitonematoides baseadas em substâncias fitoquímicas (CHITWOOD, 2002). Sendo assim, uma alternativa para a substituição dos fumigantes sintéticos é o uso de extratos vegetais que podem ser utilizados como biopesticida ou material orgânico incorporado ao substrato (AKHTAR; ALAM, 1993). Algumas plantas, como por exemplo, espécies de *Brassicas* produzem substâncias voláteis, que

podem atuar no controle de patógenos (OJAGHIAN et al., 2012). A utilização de compostos voláteis, tais como os isotiocianatos, resultantes da hidrólise dos glucosinolatos, é uma prática conhecida como biofumigação e visa o controle de patógenos do solo (BROWN; MORRA, 2005).

As plantas produzem uma grande diversidade de compostos orgânicos, que fazem parte do grupo dos metabólitos secundários. Essas substâncias, algumas já identificadas, tais como, terpenóides, derivados do ácido graxo, benzenóides, fenilpropanóides, nitrogênio além de vários compostos contendo enxofre (KNUDSEN; TOLLSTEN; BERGSTROM, 1993) não possuem função direta no crescimento e desenvolvimento da planta, porém, apresentam atividade de fitoproteção, atração de polinizadores e adaptação ambiental (TAIZ; ZEIGER, 2004) sendo muitas destas substâncias voláteis.

Um total de 1700 compostos orgânicos voláteis (COVs) tem sido isolado de mais de 90 famílias de plantas, os quais podem ser obtidos de folhas, flores, frutos e raízes (KNUDSEN; GERSHENZON, 2006). Alguns desses metabólitos provenientes de várias espécies de plantas já foram testados quanto sua atividade nematicida. Como exemplo, pode-se citar o composto curcubitin, encontrado na semente de abóbora. Esse composto é responsável pelos efeitos anti-helmínticos dessa semente (GIARETTA et al., 2009). Também o composto α -tertienil produzido por *Tagetes erecta* apresenta atividade nematicida (WANG; HOOKS; PLOEG, 2007), dentre outros compostos produzidos por plantas com atividade nematicida.

A purificação e a caracterização bioquímica dos ingredientes ativos dos extratos vegetais, de maneira a obter o composto majoritário e responsável por conferir a sua ação sobre o nematóide, é de suma importância, pois pode permitir o desenvolvimento de compostos nematicidas, ou servir como modelos para o desenvolvimento sintético dessas moléculas. É importante considerar, também, que a maioria dos fitoquímicos causa menor impacto ambiental e

representa um menor risco à saúde humana se comparado com os nematicidas químicos. Por outro lado, iniciar estudos com voláteis de plantas tóxicos a fitonematoides não só possibilitaria avanços científicos nessa área como também criaria novos meios ou técnicas para a manipulação desses compostos no campo agrícola.

2.2 Algumas plantas que possuem moléculas com atividade nematicida

- Brássicas

Espécies de brássicas possuem constituintes químicos, já isolados, com efeito nematicida, dentre elas destaca-se a mostarda (*Brassica rapa*; *B. nigra*; *B. juncea*), o repolho (*Brassica oleracea* var. *capitata*), o brócolis (*B. oleracea* var. *italica*) e a couve (*B. oleracea* var. *acephala*). Estudo com centenas de espécies da família Brassicaceae indica que praticamente todas as espécies são capazes de produzir glucosinolatos (KJAER, 1976).

Entretanto, os glucosinolatos não são biologicamente ativos, mas são precursores para a formação de isotiocianatos, tiocianatos, nitrilas, oxazolidinethiones, sendo que os isotiocianatos (ITCs) são os mais importantes, por serem mais tóxicos. Os ITCs são compostos voláteis resultantes da reação de hidrólise dos glucosinolatos pela enzima mirosinase (BROWN; MORRA, 2005). A enzima só entra em contato com seu substrato (glucosinolato) se o tecido da planta é interrompido como resultado de um ferimento causado por inseto ou ataque de patógenos (REDOVNIKOVIC et al., 2008).

Os tipos de glucosinolatos são variáveis entre espécies de plantas. Por exemplo, em sementes de mostarda predomina o glucosinolato alila e em sementes de repolho predomina os glucosinolatos 2-hidroxi-but-3-enil e alila

(SANG et al., 1984). Sang et al. (1984) demonstraram, em seu trabalho, uma variação dos glucosinolatos em diferentes tecidos (raiz, folha e semente) dentro de uma mesma espécie de planta. Segundo, Redovnikovic et al. (2008) o padrão de glucosinolatos difere entre espécies, bem como entre e dentro de plantas individuais, dependendo do estágio de desenvolvimento, tecido e fotoperíodo.

Cerca de 120 glucosinolatos já foram identificados, porém, as plantas contêm somente alguns desses compostos em grandes quantidades (REDOVNIKOVIC et al., 2008). Os glucosinolatos apresentam em comum uma fração β -D-tioglucose, um sulfato ligado através de uma ligação C = N, e um grupo lateral (designado R), o que distingue um glucosinolato de outro (BROWN; MORRA, 2005). Pequenas diferenças estruturais na cadeia lateral dos glucosinolatos provocam profundas diferenças no efeito nematicida, confirmando que a atividade biológica é função não somente da concentração do produto da hidrólise dos glucosinolatos, mas também da propriedade química da cadeia lateral R (LAZZERI; TACCONI; PALMIERI, 1993).

Zasada e Ferris (2003) estudaram o efeito de diferentes ITCs em *M. javanica* e *Tylenchulus semipenetrans*, e concluíram que os ITCs provenientes de brássicas, 2-feniletil, alil e benzil isotiocianato apresentaram elevada atividade nematicida. Em outro estudo, Buskov et al. (2002) avaliaram a mortalidade de *Globodera rostochiensis* a oito glucosinolatos com e sem a enzima mirosinase, e observaram 100% de mortalidade apenas quando utilizou-se a enzima ativa (phenethylglucosinolate, pH 6,5) a 1 mg/mL após 16 horas de exposição do nematoide e nenhum efeito foi observado na ausência da enzima mirosinase. Os mesmos autores verificaram resultado similar com a mesma concentração de benzil- e prop-2-enilglucosinolatos em soluções contendo mirosinase, porém, no tempo de exposição de 24 e 40 horas, respectivamente. Contudo, o efeito volátil da substância não foi testado neste trabalho.

Afim de controlar *M. javanica* em plantas de tomate em casa de vegetação, foi realizada a biofumigação do solo com brócolis, couve-flor e mostarda. A biofumigação diminuiu tanto o número de galhas, como o número de ovos presentes nas raízes do tomateiro (NEVES et al., 2007). Neste mesmo trabalho, também, foi observado que a incorporação de brássicas, mesmo em solo sem a presença do nematoide, promoveu um ganho de massa das plantas. A biofumigação “in vitro”, utilizando espécies de brassicas, foi realizada por Ojaghian et al. (2012) com efeito satisfatório para o fungo *Sclerotinia sclerotiorum*. Lord et al. (2011) observaram que a biofumigação do solo com tecido verde de brassica para controle de *Globodera pallida* foi mais eficiente em solo com cobertura plástica, do que em solo sem a cobertura.

- Nim - *Azadirachta indica*

Durante séculos, produtores rurais indianos usaram a árvore indiana chamada de nim (*Azadirachta indica* A. Juss) para controlar insetos e várias formulações de inseticidas estão disponíveis no mercado (CHIWOOD, 2002). Vários produtos ou resíduos dessa planta, tais como extratos, óleos, tortas e pós das sementes, têm se mostrado eficazes para o controle de várias espécies de nematóides, quando incorporados ao solo (AKHTAR; MAHMOOD, 1996; JAVED et al., 2007; RITZINGER et al., 2004;).

Os compostos bioativos presentes no nim podem ser encontrados em toda a planta. No entanto, aqueles presentes nas sementes e folhas são os que possuem compostos mais concentrados e acessíveis (LEE et al., 1988; MARTINEZ, 2002b). Diversos compostos são encontrados no nim, e esses possuem diferentes modos de ação (AKHTAR, 2000). Em geral os compostos bioativos pertencem à classe dos produtos naturais conhecidos por triterpenos, mais especificamente limonóides. Pelo menos 9 dos limonóides de nim têm

demonstrado habilidade em interromper o desenvolvimento de pragas agrícolas. Dentre esses, o mais estudado e mais eficiente é o limonóide ou tetranortriterpenóide azadiractina (MOSSINI; KEMMELMEIER, 2005).

Em estudo “in vitro”, realizado por Javed et al. (2008b), o extrato foliar aquoso de nim a 10% e a torta de nim causaram 83% e 85% de imobilidade e 35% e 28% de mortalidade, respectivamente, em juvenis de segundo estágio (J₂) de *M. javanica*. Já em experimento de casa de vegetação, o extrato reduziu a invasão pelo nematoide em plantas de tomate, porém, nenhum efeito foi observado no desenvolvimento do nematoide. A redução dos nematoides em raízes de tomateiro, devido ao nim, também, foi relatada em estudo realizado por Javed et al. (2008a), onde constataram a presença de 27% de J₂ de *M. javanica*, em raízes de tomateiro tratadas com torta de nim, enquanto naquelas tratadas apenas com água, foi de 56% de J₂ no interior das raízes. Segundo Javed et al. (2007), isso sugere que os metabolitos produzidos pelo nim são absorvidos pelas raízes e impedem a penetração de J₂.

Extrato de sementes de nim concentrado aumentou a mortalidade de J₂ do nematoide do cisto da soja (*Heterodera glycines*), com crescimento exponencialmente das doses do produto, atingindo a mortalidade máxima em 73,5 mg.L⁻¹ do extrato. Esse efeito foi atribuído a sete tetranortriterpenoides: azadiractina H, azadiractina A, azadiractina B, desacetilnimbin, desacetilsalannin, nimbin e salannin (SILVA et al., 2008).

Em experimento conduzido em casa de vegetação, utilizando diferentes concentrações de torta de nim incorporada no solo sobre *M. javanica* em tomateiros, observou-se que a redução no número de galhas e de ovos do nematoide foi diretamente relacionada com o aumento da quantidade de torta de nim incorporada ao solo (LOPES et al., 2008).

Zeringue e Bhatnagar (1994) identificaram os COVs emitidos por folhas de nim e verificaram que os principais compostos encontrados foram alcoóis,

aldeídos, cetonas, hidrocarbonetos, além de compostos variados incluindo os terpenos, estireno, compostos contendo enxofre e 2,5-di-hidro-furano. Os autores observaram, também, que os voláteis produzidos pelo nim causaram uma redução de 90% na produção de aflotoxina produzida pelo fungo *Aspergillus parasiticus* e 51% na biomassa do fungo. Porém, nenhum estudo foi realizado com fitonematoides.

Vale ressaltar que, em nenhum dos trabalhos citados acima, os COVs tóxicos emitidos por nim foram estudados contra fitonematoides.

- Feijão-de-porco - *Canavalia ensiformis*

O feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis* D.C.) é uma leguminosa amplamente distribuída no Brasil e em outros países tropicais. Essa planta é uma fonte natural de lectinas, sendo que as sementes dela provenientes possuem aproximadamente 2-3% de lectinas (ALVARES, 1989). A partir das sementes de *C. ensiformis* se obtém a Concaivalina A, a qual pode ser utilizada para a proteção de plantas (CAVADA et al., 1993). As lectinas são capazes de interferir na atração e migração dos nematoides em direção ao hospedeiro, bloqueando o sistema quimiorreceptor dos nematoides, impossibilitando ou reduzindo sua capacidade de iniciar o processo de infecção (ZUCKERMAN, 1983; MARBANMENDOZA et al., 1987). Estudo realizado por Silva, Souza e Cutrim (2002) com sementes de feijão-de-porco trituradas para o controle de *M. incognita* em tomateiro, os autores observaram que o índice de galhas e massa de ovos foi proporcional à dosagem aplicada. Nesse ensaio foi observada uma redução de 48% no número de galhas e 64% nas massas de ovos usando uma concentração de 10 g de semente triturada/Kg de solo. Resultado semelhante foi obtido, quando o feijão-de-porco foi usado como adubo verde em vasos contendo solo infestado com o fitonematoide *Tubixaba tuxaua* e cultivado com

plantas de milho. Nesse ensaio, foi observada uma redução populacional de 63% (FURLANETTO et al., 2008). Neste mesmo trabalho, em condições de campo, foi observada uma redução populacional de apenas 7% do fitonematoide *Tubixaba tuxaua*, utilizando, também o feijão-de-porco como adubo verde. Gardiano et al. (2009) verificaram que o extrato aquoso de folhas de feijão-de-porco contribuiu para o aumento da altura das plantas de tomate em casa de vegetação, porém, não foi observada a redução do número de ovos e galhas nas raízes das plantas de tomate, a qual foi inoculada com *M. javanica*. Também, não se estudou o efeito dos COVs produzidos por órgãos macerados dessa planta.

- Mucuna – *Mucuna* spp.

O gênero *Mucuna* possui mais de 100 espécies descritas, sendo que a espécie mais conhecida no Brasil é a mucuna preta, conhecida como *M. aterrima* ou *M. pruriens*. Em estudo realizado por Osei et al. (2010) observou-se que após o cultivo de *M. pruriens* houve um aumento significativo no nível de carbono orgânico, nitrogênio e matéria orgânica no solo e, segundo o autor isso ocorreu devido à elevada biomassa e alta taxa de mineralização da leguminosa. Ainda, neste mesmo trabalho foi observado que *M. pruriens* foi efetiva em suprimir populações de *M. incognita* e *M. arenaria*.

A mucuna preta comportou-se como hospedeira desfavorável a *M. incognita* raça 4 (TENENTE; LORDELLO, 1987). Entretanto, Choudhury e Choudhury (1991), estudaram diversas espécies de leguminosas e constataram que todas as mucunas foram suscetíveis a *M. javanica*. Em rotação com o quiabeiro cv. Santa Cruz 47, diversas cultivares de mucunas testadas foram hospedeiras desfavoráveis a *M. incognita* e suscetíveis a *M. javanica* (RESENDE; FERRAZ, 1986).

A aplicação foliar dos extratos de folhas e sementes de mucuna preta promoveu a redução de 26,5% e 29,7%, respectivamente, no número de galhas de tomateiros inoculados com *M. incognita*. Sugere-se, neste mesmo trabalho, que existam substâncias na mucuna preta, que apresentam ação nematicida sistêmica. Desta forma, fazem-se necessários estudos posteriores, para demonstrar qual delas atua de forma sistêmica e se tais compostos são liberados via exsudatos radiculares (LOPES et al., 2005).

Nogueira et al. (1996) isolaram da parte aérea da mucuna-preta, o álcool triacontan-1-ol, e o tetracosanoato de triacontila, um éster de cadeia longa, os quais, através de testes biológicos, apresentaram atividade nematicida. Apesar de essas substâncias terem sido isoladas das espécies de *Mucuna*, elas não têm função reconhecida pelos pesquisadores até o momento. Barcelos (1997) isolou várias substâncias com efeito nematicida de extratos de caule e raiz de *Mucuna*, porém os compostos mais ativos, na concentração de 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foram β -sitosterol + estigmasterol (74,4% de mortalidade de J₂ de *M. incognita* raça 3), um álcool não identificado (69,7%), KNO₃ + NaNO₃ (68,3%), L-dopa (64,4%) e CP(1)4-R (56,6%).

Alguns compostos foram isolados a partir de *Mucuna cinerea* e foram testadas contra os nematoides *Meloidogyne incognita* e *Heterodera glycines*, sendo que os mais eficientes foram a prunetina e genisteína, que causaram 70% e 57%, respectivamente, de mortalidade de *M. incognita* na concentração de 50 $\mu\text{l/mL}$. Nenhum efeito significativo dos compostos testados foi observado para *H. glycines* (DEMUNER et al., 2003).

Ainda não foram estudados os efeitos tóxicos de COVs produzidos por macerados dos tecidos dessa planta a fitonematoides.

- Guandu - *Cajanus cajan*

O guandu é uma leguminosa encontrada com frequência em todo o Brasil e com utilização bastante diversificada, podendo ser utilizada como planta melhoradora de solos, na recuperação de áreas degradadas, como planta fitorremediadora, na renovação de pastagens, na alimentação de animais domésticos e da pecuária, na alimentação humana e no manejo de nematoides (AZEVEDO; RIBEIRO; AZEVEDO, 2007).

A atividade nematicida do extrato aquoso de *Cajanus cajan* (guandu) a *M. exigua* foi verificada em ensaio in vitro (AMARAL et al., 2002, 2009). Porém, o efeito tóxico a fitonematoides de COVs emitidos pelo guandu ainda não foi estudado.

2.3 Compostos orgânicos voláteis (COVs) tóxicos a fitonematoides

Segundo definição de Dudareva et al. (2006) os COVs em sua maioria são líquidos lipofílicos que, sob alta pressão de vapor, são capazes de atravessar membranas e se dispersar rapidamente pelo movimento da solução aquosa e pelo fluxo em massa de água no solo. Os COVs compreendem uma grande variedade de moléculas a base de carbono.

A grande maioria dos estudos que examinam o efluxo dos COVs provenientes de ecossistemas terrestres tem focado na produção de tais substâncias pelas plantas (KESSELMEIER; STAUDT, 1999). Contudo, no solo, os COVs são produzidos principalmente por fungos e bactérias (ISIDOROV; JDANOVA, 2002; LEFF; FIERER, 2008). Vários aspectos das interações entre micro-organismos têm sido estudadas por muitos anos, entretanto, a toxicidade dos COVs a micro-organismos tem sido enfatizada apenas recentemente (CAMPOS; PINHO; FREIRE, 2010). Os efeitos tóxicos dos COVs produzidos

por fungos, bactérias, bem como o efeito direto de COV produzido no solo pela sua microflora aos fitonematoides, foram demonstrados nos últimos anos.

Devido à natureza dos compostos voláteis estes devem ser estudados em ambientes fechados. Gu et al. (2007) estudaram, em placas com três compartimentos, COVs produzidos por 200 isolados de bactérias e observaram que 74,5% e 82,5% desses isolados exibiam atividade nematicida a *Panagrellus redivivus* e *Bursaphelenchus xylophilus*, respectivamente. Neste estudo, foram identificadas nove moléculas orgânicas voláteis que exibiram 100% de atividade nematicida a ambos nematoides, sendo elas: fenol, 2-octanol, benzaldeído, benzeno-acetaldeído, decanol, 2-nonanona, 2-undecanona, ciclohexeno e dimetil-dissulfeto. Huang et al. (2010), também, utilizando placas de Petri com três compartimentos, demonstraram a atividade nematicida dos COVs produzidos por *Bacillus megaterium* YMF3.25. Após 24 horas de exposição dos J₂ de *M. incognita* aos COVs produzidos pela bactéria foi possível obter 100% de mortalidade dos J₂ e a eclosão foi 100% inibida após seis dias de incubação. Foi realizada a caracterização desses compostos voláteis através da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Os compostos que apresentaram elevada atividade nematicida contra ovos e J₂ de *M. incognita*, na concentração de 0,5 mmol, foram benzeno-acetaldeído, 2-nonanona, decanol, 2-undecanona e dimetil dissulfeto. Freire et al. (2012) observaram que dois isolados de *Fusarium oxysporum* e um isolado de *F. solani* emitiram COVs, que causaram a mortalidade de 88 a 96% dos J₂ de *M. incognita*. A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas permitiu identificar 38 COVs produzidos pelo isolado 21 de *F. oxysporum*. Já Botelho, (2010) estudou os efeitos tóxicos diretos de COVs no solo aos J₂ de *M. exigua*, bem como aos COVs produzidos pelos componentes da microflora da rizosfera cafeeira. Para isso foi utilizado tubo SUPELCOTMSPME com tampa rosqueada metálica, revestida internamente por uma película em silicone ligando a tampa metálica ao

frasco, garantindo total vedação. Em seu trabalho, constatou-se que COVs tóxicos a J_2 de *M. exigua* foram produzidos em diferentes tempos de vedação de tubo SUPELCO® com solo. Além disso, altas atividades nematicidas foram demonstradas pelos COVs produzidos por *Fusarium oxysporum*, *Penicillium* sp., *Syncephalastrum* sp. e pelo inóculo 12 (não identificado), isoladas da rizosfera cafeeira.

Sabe-se que as plantas produzem uma diversidade enorme de compostos de baixo peso molecular conhecidos como metabólitos secundários (PICHERSKY; GANG, 2000), sendo que mais de 1% desses metabólitos são moléculas lipofílicas com baixo ponto de ebulição e alta pressão de vapor à temperatura ambiente (DUDAREVA; PICHERSKY, 2008). Os terpenoides, fenilpropanóides, benzenóides, derivados de ácidos graxos e derivados de aminoácidos são os principais representantes desses metabólitos (DUDAREVA; PICHERSKY, 2008). Em resposta ao ataque de herbívoros, as plantas emitem diversos voláteis que podem conter mais de 200 compostos diferentes (DICKE; VAN LOON, 2000). Segundo Dudareva et al. (2006), os compostos voláteis de plantas promovem a comunicação e interação com o ambiente circundante. Apesar dessa diversidade dos COVs produzidos por plantas, são poucos os trabalhos na literatura, indicando efeito tóxico deles a fitonematoides. Nos itens acima, percebe-se que a grande maioria dos estudos com substâncias produzidas por plantas tóxicas a fitonematoides advêm de uma metodologia na qual não se utilizam ambientes hermeticamente fechados e, conseqüentemente, não demonstra a atividade nematicida dos COVs produzidos por tais plantas. Apenas para as plantas pertencentes à família brassicaceae é encontrada uma ampla gama de trabalhos onde se utiliza da biofumigação do solo com espécies de brássicas para o controle de fitonematoides. Também para o alho foi realizado um trabalho onde se utilizaram tubos Supelco para avaliar o efeito tóxico de COVs, produzidos a partir de extrato aquoso e extrato seco de alho a

M. incognita (CARLI, 2011). Neste trabalho, observou-se que a eclosão de J₂ foi reduzida por COVs liberados, tanto pelo macerado a seco, como pelo macerado aquoso, porém, os voláteis foram mais tóxicos no macerado de alho a seco. Sendo assim, percebe-se a grande importância do estudo do efeito tóxico dos COVs produzidos por plantas para controle de nematoides parasitas de plantas.

3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Uma grande quantidade de moléculas de origem vegetal, com potencial no controle de nematoides parasitas de plantas, tem sido relatada na literatura. Essas moléculas podem ter efeito nematicida, nematostático, ovicida ou de repelência. Entretanto, muitas vezes, não se sabe ao certo qual composto é responsável por controlar o fitonematoide. Na maioria das plantas estudadas, os COVs não foram avaliados, pois com as técnicas empregadas os mesmos são perdidos. Grandes avanços podem ser alcançados na obtenção de nematicidas voláteis produzidos por plantas. Esses nematicidas podem apresentar uma série de vantagens para o produtor, como menor efeito residual, baixa toxicidade ao homem e ao ambiente. O maior desafio é despertar no setor industrial o seu interesse para se trabalhar com compostos voláteis (fumigantes), a fim de disponibilizá-los para os agricultores e obter produtos para o consumo com menos riscos à saúde e ao meio ambiente.

REFERÊNCIAS

AKHTAR, M. Nematicidal Potential of the Neem Tree *Azadirachta indica* (A. Juss). **Integrated Pest Management Reviews**, Heidelberg, v.5, p. 57-66, Dec. 2000.

AKHTAR, M.; ALAM, M.M. Utilization of waste materials in nematode control: a review. **Bioresource Technology**, Essex, v.45, n.1, p. 1-7, 1993.

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

ALVARES, N.G. **La rotación con leguminosas como alternativa para reducir el daño causado por fitopatógenos del suelo y elevar la productividad del agro ecosistema maíz en el trópico húmedo**. 1989. Disertación (Master) - Colégio de Pos-Graduados, Montecillo, 1989.

AMARAL, D.R. et al. Efeito de alguns extratos vegetais na eclosão, mobilidade, mortalidade e patogenicidade de *Meloidogyne exigua* do cafeeiro. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v.26, n.1, p. 43-48, mar. 2002.

AMARAL, D.R. et al. Effect of plant and fungous metabolites on *Meloidogyne exigua*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, p. 1861-1865, mar. 2009.

AZEVEDO, R.L.; RIBEIRO, G.T.; AZEVEDO, C.L.L. Feijão Guandu: uma planta multiuso. **Revista da FAPES**, Aracaju, v. 3, n. 2, p. 81-86, jul./dez. 2007.

BARCELOS, F.F. **Isolamento e avaliação da atividade nematocida de constituintes químicos de *Mucuna aterrima***. 1997. 93 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1997.

BOTELHO, A.O. **Fatores envolvidos na supressividade de *Meloidogyne exigua* em cafeeiro**: nova técnica para análise de compostos voláteis tóxicos a

fitonematoide. 2010. 98 p. (Doutorando em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Instrução Normativa nº 19**, de 7 de julho de 2005. Regulamenta a aplicação do tratamento fitossanitário com fins quarentenários por fumigação com Brometo de Metila, em regime de início de trânsito como descrito no art. 1º, § 8º, da Instrução Normativa Conjunta nº 01, de 14 de fevereiro de 2003. Brasília, 2005. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=12412>>. Acesso em: 18 ago. 2011.

BROWN, J.; MORRA, M. J. **Glucosinolate-containing seed meal as a soil amendment to control plant pests 2000-2002**. Washington: National Renewable Energy Laboratory Subcontract Report NREL/SR, 2005. 95 p.

BUSKOV, S. et al. Effects of intact glucosinolates and products produced from glucosinolates in myrosinase-catalyzed hydrolysis on the potato cyst nematode (*Globodera rostochiensis* cv. Woll). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 50, n. 4, p. 690-695, Feb. 2002.

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

CARLI, M.C. **Compostos orgânicos voláteis e em extrato aquoso de alho no controle de *Meloidogyne incognita***. 2011. 52 p. (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

CAVADA, B.S. et al. Primary structures and functions of plants lectins. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Campinas, v. 5, n. 2, p. 193-201, 1993.

CHITWOOD, D.J. Phytochemical based strategies for nematode control. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 40, n. 5, p. 221-249, Sept. 2002.

CHOUDHURY, M.M.; CHOUDHURY, E.N. **Adubação verde e cobertura morta do solo em áreas irrigadas do submédio São Francisco: III.**, Controle dos nematóides das galhas. Petrolina: EMBRAPA-CPATSA, 1991. 3 p. (EMBRAPA-CPATSA. Comunicado Técnico, 45).

DEMUNER, A.J. et al. Isolation and nematocidal activity evaluation of chemical constituents from *Mucuna cinerea* against *Meloidogyne incognita* and *Heterodera glycines*. **Quimica Nova**, São Paulo, v. 26, n. 3, p. 335-339, maio/jun. 2003.

DICKE, M.; LOON, J.J.A. van. Multitrophic effects of herbivore-induced plant volatiles in an evolutionary context. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 97, n. 3, p. 237-249, Dec. 2000.

DUDAREVA, 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.

DUDAREVA, N.; PICHERSKY, E. Metabolic engineering of plant volatiles. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 19, p. 181-189, Feb. 2008.

DUNIWAY, J.M. Status of chemical alternatives to methyl bromide for pre-plant fumigation of soil. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 92, n. 12, p. 1337-1343, Dec. 2002.

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

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

FURLANETTO, C. et al. Reaction of summer green manures to the nematode *Tubixaba tuxaua*. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 33, n. 6, p. 403-408, Nov./ Dec. 2008.

GARDIANO, C.G. et al. Avaliação de extratos aquosos de varias espécies vegetais, aplicados ao solo, sobre *Meloidogyne javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 30, n. 3, p. 551-556, jul./set. 2009.

GIARETTA, R.D. et al. Efeito de extrato aquoso de sementes de abóbora sobre a eclosão e inativação de juvenis de *Meloidogyne javanica* e de *M. incognita*. **Revista Trópica - Ciências Agrárias e Biológicas**, Chapadinha, v. 3, n. 1, p. 7-11, 2009.

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

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

HUSSAINI, S.S.; RAO, R.V.V.P.; PANDU, H.K. Toxicity of water soluble leaf extracts against larvae and egg masses of three *Meloidogyne* species. **Indian Journal of Nematology**, New Delhi, v. 26, n. 1, p. 23-31, June 1996.

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

JAVED, N. et al. Effects of neem formulations applied as soil drenching on the development of root-knot nematode *Meloidogyne javanica* on roots of tomato. **Pakistan Journal of Botany**, Karachi, v. 40, n. 2, p. 905-910, 2008a.

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

JAVED, N. et al. Protective and curative effect of neem (*Azadirachta indica*) formulations on the development of root-knot nematode *Meloidogyne javanica* in roots of tomato plants. **Crop Protection**, Guildford, v. 26, n. 4, p. 530-534, Apr. 2007.

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

KJAER, A. Glucosinolates in the Cruciferae. In: VAUGHN, J.G.; MACLEOD, A.J.; JONES, B.M. G. (Ed.). **The biology and chemistry of the Cruciferae**. London: Academic, 1976. p. 207-219.

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

KNUDSEN, J. T.; TOLLSTEN, L.; BERGSTROM, G. Floral scents: a checklist of volatile compounds isolated by head-space techniques. **Phytochemistry**, New York, v. 33, n. 2, p. 253-280, May 1993.

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

LEE, S.M. et al. 7-Deacetyl-17b-hydroxyazadione, a new limonoid insect growth inhibitor from *Azadirachta indica*. **Phytochemistry**, New York, v. 27, p. 2773-2775, 1988.

LEFF, J. W.; FIERER, N. Volatile organic compound (VOC) emissions from soil and litter samples. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 40, n. 2, p. 1629-1636, May 2008.

LOPES, E. A. et al. Controle de *Meloidogyne javanica* com diferentes quantidades de torta de nim (*Azadirachta indica*). **Revista Trópica - Ciências Agrárias e Biológicas**, Chapadinha, v. 2, n. 1, p. 17-21, 2008.

LOPES, E.A. et al. Efeitos dos extratos aquoso de mucuna preta e manjerição sobre *Meloidogyne incognita* e *M. javanica*. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 29, n. 1, p. 67-74, May 2005.

LOPEZ-PEREZ, J.A. et al. Evaluation of alternative to methyl bromideto control *Meloidogyne incognita* in cucumber:abstracts. **Nematropica**, Bradenton, v. 33, n. 2, p. 189-196, May 2003.

LORD, J.S. et al. Biofumigation for control of pale potato cyst nematodes: activity of brassica leaf extracts and green manures on *Globodera pallida* in vitro and in soil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 59, n. 14, p. 7882-7890, June 2011.

MANI, A.; CHITRA, K.C. Toxicity of certain plant extracts to *Meloidogyne incognita*. **Nematologia Mediterranea**, Bologna, v. 17, p. 43-44, apr. 1989.

MARBANMENDOZA, N. et al. Control of root-knot nematodes on tomato by lectins. **Journal of Nematology**, College Park, v. 19, n. 3, p. 331-335, 1987.

MARTINEZ, S.S. Composição do nim. In: _____. **O nim *Azadirachta indica*: natureza, usos múltiplos, produção**. Londrina: Instituto Agrônômico do Paraná, 2002. p. 23-30.

MOSSINI, S.A.G.; KEMMELMEIER, C. A árvore Nim (*Azadirachta indica* A. Juss): múltiplos usos. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, Buenos Aires, v. 24, n. 1, p. 139-148, Dec. 2005.

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

NOGUEIRA, M.A.; DEOLIVEIRA, J.S.; FERRAZ, S. Nematicidal hydrocarbons from *Mucuna aterrima*. **Phytochemistry**, New York, v. 42, n. 4, p. 997-998, July 1996.

OJAGHIAN, M.R. et al. In vitro biofumigation of brassica tissues against potato stem rot caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Pathology Journal**, Korea, v. 28, n. 2, p. 185-190, May 2012.

OSEI, K. et al. The potential of four non traditional legumes in suppressing the population of nematodes in two Ghanaian soils. **Journal of Soil Science and Environmental Management**, Nairobi, v. 1, n. 4, p. 63-68, June 2010.

PICHERSKY, E.; GANG, D.R. Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 5, n. 10, p. 439-445, Oct. 2000.

REDOVNIKOVIC, I.R. et al. Glucosinolates and their potential role in plant. **Periodicum Biologorum**, Zagreb, v. 110, n. 4, p. 297-309, Feb. 2008.

RESENDE, C.I.; FERRAZ, S. **O controle de *Meloidogyne javanica* e *M. incognita* por diferentes variedades de mucunas**. Mossoró: ESAM, 1986. 64 p. (Coleção Mossoroense, 236).

REVISTA ENVÍO. **Victims of nemagon hit the road**. Manágua, 2005. Disponível em: <<http://www.envio.org.ni/articulo/2972>>. Acesso em: 9 out. 2011.

RITZINGER, C.H.S. et al. Uso de torta de mamona e nim em mudas de mamoeiro infestadas pelo nematóide das galhas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, 1., 2004, Campina Grande. **Resumos...** Campina Grande: UFPB, 2004. 1 CD-ROM.

SANG, J.P. et al. Glucosinolate profiles in the seed, root and leaf tissue of cabbage, mustard, rapeseed, radish and swede. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v. 64, p. 77-93, Jan. 1984.

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

SILVA, G.S.; SOUZA, I.M.R.; CUTRIM, F.A. Efeito da incorporação de sementes trituradas de feijão de porco ao solo sobre o parasitismo de *Meloidogyne incognita* em tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 4, p. 412-413, July/Aug. 2002.

SILVA, J.C.T. et al. Effect of neem seed extracts on the development of the Soybean Cysts Nematode. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 33, n. 3, p. 171-179, May/June 2008.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

TENENTE, R.C.V.; LORDELLO, L.G.E. Penetração e crescimento de *Meloidogyne incognita* raça 4, em raízes de mucuna preta (*Stizolobium aterrimum*). **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 11, p. 242-248, 1987.

THOMAS, W.B. Methyl bromide: effective pest management tool and environmental threat. **Supplement to Journal of Nematology**, College Park, v. 28, n. 4S, p. 586-589, Dec. 1996.

VIGLIERCHIO, D.R. **The world of nematodes**: a fascinating component of the animal kingdom. Davis: University of California, 1991. 266 p.

WANG, K.H.; HOOKS, C.R.; PLOEG, A. **Protecting crops from nematode pests**: using marigold as an alternative to chemical nematicides. Honolulu: University of Hawaii, 2007. 6 p. (Plant Disease, PD-35).

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

ZERINGUE, H.J.; BHATNAGAR, D. Effects of neem leaf volatiles on submerged cultures of aflatoxigenic aspergillus-parasiticus. **Applied and Environmental Microbiology**, Berlin, v. 60, n. 10, p. 3543-3547, Oct. 1994.

ZUCKERMAN, B.M. Hypotheses and possibilities of intervention in nematode chemoresponses. **Journal of Nematology**, Lakeland, v. 15, n. 2, p. 173-182, Apr. 1983.

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

ARTIGO 1

**Nematicidal activity of volatile organic compounds emitted by
Brassica juncea, *Azadirachta indica*, *Canavalia ensiformis*, *Mucuna
pruriens* and *Cajanus cajan* against *Meloidogyne incognita***

Accepted by the Applied Soil Ecology

Aline F. Barros, Vicente P. Campos, Júlio Carlos P. Silva, Márcio P.
Pedroso, Flávio H.V. Medeiros, Edson A. Pozza, Ana Luiza Reale

ABSTRACT

Understanding the effect of plant volatile organic compounds (VOCs) on soil nematodes and water may explain plant damage in the field and how some nematode management strategies reduce soil nematode populations. *M. incognita* is a damaging plant pathogenic nematode that affects crops worldwide. The aims of this study were to evaluate the effect of the VOCs emitted by five common crops used for soil incorporation to control the second-stage juveniles (J₂) of *Meloidogyne incognita*. To investigate the “in vitro” role of water in the relationship between nematodes and plant VOCs. And to identify the volatile molecules by gas chromatography (GC/MS). The method used permitted the volatile molecules from macerated plant organs to only contact the J₂ nematodes by air. Plants organs from all plants macerated with and without water emitted VOCs that immobilized J₂ nematodes, with higher levels emitted when the plant organs were macerated without water. Only water exposed to VOCs from neem and mustard leaves were capable of immobilizing *M. incognita* J₂. The *M. incognita* J₂ exposed to neem and mustard VOCs and inoculated in tomato seedlings resulted in reduced gall formation and nematode reproduction, showing the nematicidal effect of the plant-emitted VOCs. GC/MS analysis revealed the presence of 58 and 32 molecules in the VOCs emitted from neem and mustard macerates, respectively. Alcohols were found in both the neem and mustard VOCs. Esters were found in the neem VOCs, and sulfur-containing compounds, mostly isothiocyanates, were found in mustard. Our results demonstrate that plant VOCs contain diversified molecules that affect *M. incognita* mobility, pathogenicity and reproduction. Nematode toxic VOCs may be retained in water, which prevents the VOCs from escaping into the air and causing the water to become toxic to nematodes. These data may explain part of the role of VOCs in the biofumigation process, through plant incorporation with the soil, and suggests that irrigation performed directly after incorporation may

trap the VOCs in soil water and thereafter retain nematode toxicity longer than incorporation that is performed later.

Keywords: biofumigation; nematode control; gas chromatography; root - knot nematodes.

1. Introduction

Plants produce more than 1,700 volatile organic compounds (VOCs) (Knudsen and Gershenzon, 2006), but the nature and function of the VOCs remain unknown for many plants. Understanding the effect of plant VOCs on soil nematodes and water could explain how a number of nematode management strategies reduce nematode populations and plant damage in the field.

Root-Knot nematodes of the *Meloidogyne* genus are plant biotrophic parasites responsible for approximately 70% of the damage caused by phytonematodes (Sasser and Freckman, 1987). A root-knot nematode, *M. incognita*, has a wide host range and may be the plant pathogen responsible for the greatest losses in food production throughout the world (Trudgill and Block, 2001).

Attempts have been made to control plant pathogens, especially plant-parasitic nematodes, through the incorporation of plant tissues that emit VOCs. Incorporating green plant debris from *Brassica* spp. into the soil decreases the nematode and phytopathogenic fungi populations and helps control these phytopathogens (Lord et al., 2011; Neves et al., 2007; Stapleton and Duncan, 1998). In a similar fashion, incorporating *Brassica napus* debris into the soil decreases the population of *Meloidogyne chitwoodi* (Mojtahedi et al., 1993), whereas incorporating ground seeds from *Canavalia ensiformis*, leaves from

Azadirachta indica, extracts from *Mucuna pruriens*, and *Cajanus cajan* green manure decreases the *M. incognita* and/or *M. javanica* populations (Javed et al., 2007; Lopes et al., 2005; Santos et al., 2009; Silva et al., 2002). These biocontrol effects, especially for the Brassica species, are credited to biotoxic VOCs through a process known as biofumigation (Ojaghian et al., 2012). However, other factors, such as the release of non-volatile molecules by degraded tissues and the emission of volatile compounds by microbiota colonizing plant tissues incorporated into the soil, may also be involved. In fact, non-volatile organic compounds can also control nematodes. For example, the non-volatile azadirachtin, produced by neem, can decrease a nematode population (Lynn et al., 2010). VOCs from neem leaves have been characterized and primarily consist of alcohols, aldehydes, ketones, hydrocarbons, terpenes, styrene, sulfur and 2,5-dihydrofuran. Some of these compounds inhibit the radial growth of *Aspergillus parasiticus* and, consequently, the production of aflatoxin (Zeringue and Bhatnagar, 1994). However, the toxicity of these compounds against phytonematodes has not been evaluated.

Understanding the mechanisms involved in biofumigation can lead to improved efficiency of the nematode control method (Lord et al., 2011). To achieve this improved efficiency, the effects of VOCs emitted by microbiota feeding on green plant tissues incorporated into the soil must be separated from VOCs emitted by green plant tissues without microbial infestation because the VOC concentrations emitted by litter colonized with micro-organisms can be 11 times higher than the VOC concentrations emitted by a sterilized litter (Gray et al., 2010).

Although plants emit several diverse volatile molecules (Knudsen and Gershenson, 2006), the majority of studies on the effect of plant volatiles on phytonematodes were performed using a single, pure volatile molecule from a plant. For example, isothiocyanates, which result from the hydrolysis of

glucosinolates by the Brassica species, have nematicide and fungicide effects (Lazzeri et al., 1993; Ojaghian et al., 2012; Zasada and Ferris, 2003). Several diverse volatile molecules can be produced by bacteria and fungi. Freire et al. (2012) detected 38 volatile molecules emitted by *Fusarium oxysporum* cultures, and Gu et al. (2007) identified approximately 81 different VOCs in cultures of 15 different bacteria.

The toxic effect to *M. incognita*, the effect on the life cycle of *M. incognita* in tomato plants, and the structure of the VOCs emitted by *Brassica juncea*, *Azadirachta indica*, *Canavalia ensiformis*, *Mucuna pruriens* and *Cajanus cajan* have not yet been studied without the inclusion of non-volatile molecules.

Another characteristic of VOCs in soil is their dissolution in water (through solvation), which explains the long distance effects these volatiles have in the soil (Weatley, 2002). The dissolution of VOCs in water prevents the loss of VOCs into the atmosphere. Water exposed to volatiles emitted by the *Muscodor albus* fungus has been shown to be toxic to *M. incognita* second-stage juveniles (J₂) (Grimme et al., 2007).

There is limited knowledge about the nematicidal activity of the total volatiles emitted by *Brassica juncea*, *Azadirachta indica*, *Canavalia ensiformis*, *Mucuna pruriens* or *Cajanus cajan*. The goals of the present study were to verify the toxicity of the VOCs emitted by different plant species to *M. incognita*, to evaluate the infectivity and reproduction of J₂ nematodes exposed to plant-produced VOCs, to test the toxicity of water exposed to the plant-emitted VOCs to *M. incognita* J₂, and to characterize the volatile molecules emitted by macerates of *Brassica juncea* and *Azadirachta indica* leaves using solid-phase microextraction (SPME) (Arthur and Pawliszyn, 1990) and gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC/MS).

2. Materials and methods

2.1. Collection of *Meloidogyne incognita* eggs and second-stage juveniles

Pure *Meloidogyne incognita* populations were multiplied in tomato plants and maintained in a greenhouse for approximately 3 months. Galled roots were separated from the soil, washed in still water, and cut into 0.5 cm long segments. Eggs were extracted from the root segments as described by Hussey and Barker (1973). The eggs were placed in a hatching chamber and incubated at 28°C. J₂ nematodes that hatched two days after incubation in the hatching chamber were used in the toxicity assays of the tested plant-emitted VOCs.

2.2. Plant collection and macerate preparation

The leaves from velvet beans (*Mucuna pruriens*), mustard (*Brassica juncea*), pigeon peas (*Cajanus cajan*), and neem (*Azadirachta indica*) as well as the seeds from pig bean (*Canavalia ensiformis*) were collected at approximately 8 o' clock in the in the Lavras municipality, Minas Gerais State (MG), Brazil. Because there was the possibility that the water retained VOCs from the macerates, dry and water macerations were performed. After the plant material was washed with water, 5, 10 and 15 g aliquots of either leaves or seeds were weighed from each species. Each aliquot was immersed in 100 mL of distilled water and allowed to rest for 24 hours in a labeled beaker covered with aluminum foil. The material was then ground in a blender for 20 seconds and filtered through gauze. The resulting suspension was the water macerate, which was immediately used to assay the toxicity of VOCs against *M. incognita*.

For the dry maceration, 0.5, 1.0 and 1.5 g aliquots of the leaves or seeds of each species were weighed. Each aliquot was surface sterilized using 2% sodium hypochlorite for 1 minute and rinsed three times with distilled water.

After excess water was removed with paper towels, each aliquot (amount) was ground with a mortar and pestle without the addition of water. This ground material was immediately used to test the toxicity of emitted VOCs against *M. incognita* J₂.

2.3. Toxicity of volatile compounds emitted by neem, pigeon pea, mustard, velvet bean and pig bean to *Meloidogyne incognita* J₂

SUPELCOTMSPME (Sigma-Aldrich, Bellefonte, PA, USA) 80 × 28 mm vials with screw tops were internally lined with a silicone layer connecting them to the vial, which guaranteed a complete seal. Approximately 25 g of dry, autoclaved sand was placed inside these sterilized vials and 2 mL of the plant water macerates with amounts of 5, 10 or 15 g/100 mL of distilled water, obtained as described above, were placed over the sand surface. In other vials, 2 mL of distilled water was placed on the sand surface, followed by 0.5, 1.0 or 1.5 g of the dry plant macerate. As a control, some vials did not receive plant macerates. A 1.5 mL sterilized microtube was buried midway in the sand of the Supelco vials. The vials were then sealed and incubated at 25°C in the dark for 3 days. A 1 mL suspension of 100 *M. incognita* J₂ was then injected into the buried microtube using a 3 mL syringe (Fig. 1). The vials were then incubated at 25°C for 24 hours. After exposing the J₂ nematodes to the VOCs produced by plant macerates (dry or water), the vials were opened, the J₂ nematode suspension in the microtubes was transferred to ELISA polypropylene microplates, and both the mobile and immobile J₂ nematodes were quantified using an inverted microscope.

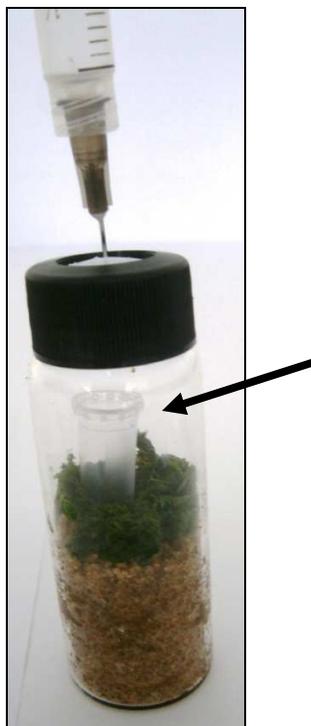


Fig. 1. Materials used during tests performed on VOCs emitted by plants and toxic to *Meloidogyne incognita* second-stage juveniles: Supelco™ SPME vial; screw top showing the silicone lining at the top; sand-filled vial with the plant macerate on the surface; and a half-buried microtube showing the injection of the suspension of *Meloidogyne incognita* second-stage juveniles into the buried microtube (arrow).

2.4. Toxicity of water exposed to plant emitted volatile compounds towards *Meloidogyne incognita* J₂

The toxicity of water exposed to the VOCs emitted by the dry macerates of neem, mustard, pigeon pea and velvet bean leaves and pig bean seeds to *M. incognita* J₂ was evaluated with bi-compartmented plastic Petri plates (Fernando et al., 2005). One of the plate compartments contained 5 g of the macerate with 1 mL of distilled water in the other compartment. The water remained exposed to the VOCs for 3 days. The following controls were used: 1) one empty compartment and one compartment with 1 mL of

distilled water, which was incubated for 3 days; and 2) broccoli flower dry macerate, which was previously found to make water toxic to *M. incognita* (unpublished data).

After its exposure to VOCs (3 days) from the different sources, the water was removed from the bi-compartmented plate and placed in a 2 mL screw top tube to which 0.5 mL of a 100 J₂ water suspension was added. The tubes were stored at 25°C for 48 hours before being opened, and the number of mobile and immobile J₂ nematodes were quantified with a lens-inverted microscope.

2.5. Infectivity of *Meloidogyne incognita* J₂ exposed to VOCs emitted by neem and mustard leaves and their subsequent reproduction in tomato plants

Neem and mustard plants were used in this assay because they were previously reported to have high toxicity against *M. incognita* when incorporated into the soil or used in a soil biofumigation process (Javed et al., 2007; Neves et al., 2007; Silva et al., 2002). Water macerates were obtained for each plant species using 5, 10 and 15 g of leaves in 100 mL of distilled water, and dry macerates containing 0.5, 1.0 and 1.5 g of plant material were prepared as previously described. The control vials did not receive plant macerate. The macerate was placed on the sand surface in a Supelco vial. A microtube was partially buried in the sand. After 3 days, 1 mL of a suspension containing 600 J₂ nematodes was injected into the microtube with a syringe. The J₂ nematode sample was removed from the microtube after 48 hours of exposure to the VOCs. Then, 200 µl of the J₂ nematode suspension was transferred to an ELISA polypropylene microplate, and the number of mobile and immobile J₂ nematodes were quantified. This immobility estimate only served to confirm the immobility observed in the previous assay prior to the inoculation of the tomato plants with J₂ nematodes. The remainder of the suspension (approximately 480 J₂

nematodes) was dispersed in 4 mL of distilled water before inoculating each tomato seedling with approximately 5 mL J_2 suspension. The tomato seedlings were grown in a sowing tray with 75 cm³ compartments using multiplant[®] substrate (produced by Terra do Paraíso, Holambra, SP, Brazil) and were 30 days old at the time of the inoculation. Following the inoculation, the seedling trays were kept in a greenhouse. The inoculated seedlings were watered as needed by spraying with a manual sprayer. The number of galls and eggs per root was quantified 30 days after the inoculation.

2.6. Identification of the VOCs emitted by neem and mustard macerates using GC-MS

VOCs were extracted via headspace solid-phase microextraction (SPME) (Arthur and Pawliszyn 1990). The following parameters were adopted: a DVB/CAR/PDMS (Divinylbenzene, Carboxen, and Polydimethylsiloxane) fiber, extraction temperature of 55°C with 250 rpm sample agitation, 35 minute extraction time, and 2 minute desorption time at the GC injector. A GC-MS QP 2010 Ultra (Shimadzu, Japan) gas chromatograph coupled with a mass spectrometer equipped with an AOC-5000 (Shimadzu, Japan) automatic injector for liquids and gases and an HP-5 (5% phenyl-95% dimethyl siloxane) 30 m × 0.25 mm × 0.25 μm column was used to separate and identify the VOCs. The injector, interface and ion detector temperatures were 250°C, 240°C, and 200°C, respectively. The injector operated in the splitless mode or with a 1:4 split based on the sample peak intensity. The carrier gas was grade 5.0 He with a flow of 1.0 mL min⁻¹. The GC oven temperature was increased at a rate of 3°C min⁻¹ from 40°C to 160°C and then at 10°C min⁻¹ to 240°C. To identify the VOC samples, the mass spectrum of each peak was obtained via the Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System (AMDIS) v. 2.63 software. The VOCs were identified by comparing the mass spectra to those in the NIST

library using the Mass Spectral Search Program v. 1.7 (NIST, Washington DC, USA) software and the experimentally obtained retention indexes (RI Exp.) to those reported in the literature (RI Lit.) (Adams, 2007; NIST, 2013; Rohloff and Bones, 2005). For the mass spectra comparison, only spectra with a similarity better than 80% were considered. The experimental retention indices were obtained by injecting a homologous series of alkanes. The sample macerate quantities were the same as described previously.

2.7. Statistics and data treatment

All of the assays were repeated twice using a completely randomized experimental design with four replicates per treatment. An ANOVA was performed using a 5 plant species \times 4 amounts in a factorial scheme with a 5 plant species \times 3 macerate types factorial scheme for the assay of the toxicity of VOCs towards *M. incognita* J₂. For the toxicity assay of water exposed to the plant macerate, a single factor ANOVA was performed with plant species as the factor. For the infectivity and reproduction assay for *M. incognita* J₂ in tomato plants, 2 plant species \times 4 amounts and 2 plant species \times 3 macerates factorial schemes were used. These data sets were subjected to preliminary analyses of their normality (Shapiro-Wilk) and variance homogeneity (Bartlett). Any data determined not to meet the normality and variance homogeneity were then transformed. For the infectivity and reproduction assays of J₂ in tomato plants, the data for the effect dry macerate had on the number of galls per root was \sqrt{x} transformed, while the data on the effect dry macerate had on the number of eggs per root was transformed in $\log(x+0.5)$. When these assumptions were met, an ANOVA (F test) was performed. The averages of the qualitative variables for each treatment were compared using a Tukey test at $p < 0.05$. The regression models were fit to the quantitative variables.

3. Results

3.1. Toxicity of volatile compounds emitted by neem, pigeon-pea, mustard, velvet bean and pig bean to *Meloidogyne incognita* J₂

There was significant interaction between the plant species and the amount of dry ($p<0.001$) or water macerate ($p<0.001$) used. Low amounts of the dry macerate (0.5 g) resulted in a *M. incognita* J₂ immobility above 90%, except for mucuna, which required 1.0 g for J₂ nematode immobility above 90% (Fig. 2a). For the water macerate, only the higher amounts (15 g/100 mL of water) yielded J₂ nematode immobility above 80% (except for pig bean seeds, which caused an immobility above 90% independent of the amount used) (Fig. 2b).

There were significant interactions between the plant species and type of macerate used ($p<0.001$). J₂ nematode immobility was always higher when a macerate was used compared with the controls. This was observed for both macerate types (dry and water) and plant species tested. For pig bean, the VOCs from the water and dry macerates yielded similar amounts of J₂ nematode immobility. For the remaining plants, the VOCs emitted by the dry macerate caused higher J₂ nematode immobility compared to the water macerate (Table 1).

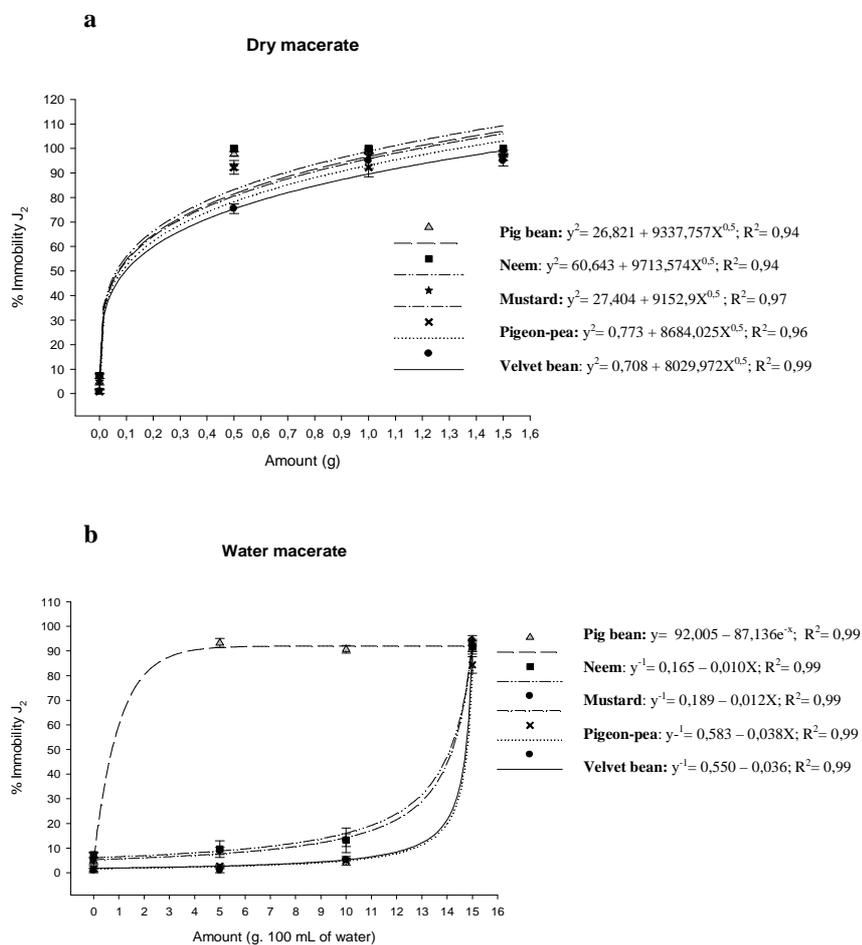


Fig. 2. Percent immobility of second-stage juveniles (J_2) exposed to VOCs emitted by the dry (a) and water (b) macerates of the five plant species tested at different amounts (grams = g).

Table 1 Percent immobility of second-stage juveniles exposed to VOCs emitted by the macerates (dry and water) for each plant species tested.

Plant macerate	PLANT (Common names)				
	Pig bean	Pigeon pea	Mustard	Velvet bean	Neem
Dry	98 aA	93 aA	96 aA	88 aA	100 aA
Water	92 aA	30 bB	39 bB	33 bB	37 bB
Control (water)	5 bA	1 cA	5 cA	1 cA	7 cA

Averages with matching lower case letters within the same column and upper case letter within the same row are not significantly different according to the Tukey test ($p < 0.05$).

3.2. Toxicity of water exposed to plant emitted volatile compounds to *Meloidogyne incognita* second-stage juveniles

Water exposed to VOCs emitted by neem and mustard leaves significantly increased the immobility ($p < 0.001$) of *M. incognita* J₂ compared to the other plants tested and to the control. The highest toxicity observed was for the neem leaf macerate (22.7%). However, the J₂ nematode immobility caused by water exposed to broccoli flower macerate VOCs (97%) was approximately 4 times higher than the J₂ nematode immobility caused by water exposed to neem VOCs. The water exposed to the VOCs emitted by the pig bean, pigeon pea and velvet bean plants was not significantly different from the controls (pure water) (Fig. 3).

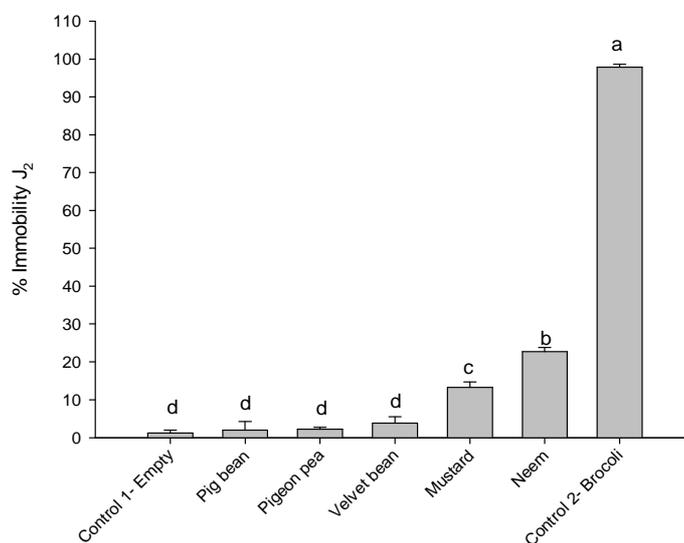


Fig. 3. Toxicity of water exposed to volatile compounds from pig bean seeds and pigeon pea, velvet bean, mustard and neem leaves based on the percent immobility of second-stage juveniles (J₂) relative to the controls: 1) empty compartment and 2) broccoli flower. The averages with matching letters were not significantly different according to the Tukey test at $p < 0.05$. The bars indicate the mean standard errors.

3.3. Infectivity of *Meloidogyne incognita* J₂ exposed to volatile compounds emitted by neem and mustard leaves, and their subsequent reproduction in tomato plants

The high immobility of *M. incognita* J₂ exposed to neem and mustard VOCs before inoculating in tomato plants confirmed the toxicity of these compounds. This toxicity had been observed in a previous assay.

The dry macerate amounts evaluated with neem and mustard significantly decreased the number of galls and eggs from *M. incognita* J₂ exposed to the VOCs of neem and mustard compared with the control. The neem

and mustard dry macerates progressively decreased the number of galls g^{-1} in the tomato root. More pronounced decreases were observed with the 1 g and 1.5 g amounts. At these amounts, the mustard dry macerate caused higher decreases (72 - 79%) in the number of galls relative to the neem dry macerate (50 - 57%). The number of eggs was decreased (81.5 - 96%) for all of the neem and mustard dry macerate amounts used, even at the lowest amount tested (Fig. 4a and c).

The different neem and mustard water macerate amounts decreased the number of galls by up to 85% and the number of eggs between 16 and 80% of *M. incognita* J₂ compared with controls. A pronounced decrease in the number of galls was observed when the amount of the neem water macerate was increased. There was no such curve adjustment for the mustard water macerate. However, a similar decrease in the gall number relative to the control was observed with all tested macerate amounts. There was also no curve adjustment to the number of eggs when *M. incognita* J₂ was exposed to the VOCs in the mustard water macerate. However, a pronounced decrease was observed at macerate amounts of 15% (m/v). Neem water macerate amounts of up to 5% (m/v) decreased the number of eggs by 69%. Above the 5% amount, the number of eggs decreased at a similar rate (Fig. 4b and d).

There were no significant interactions between the plant species and type of macerate that affected the number of galls ($p = 0.467$). However, the macerate type alone had a significant effect ($p < 0.001$) on the number on galls. The highest decrease in the gall number was observed when *M. incognita* J₂ were exposed to the mustard dry macerate. There was a significant interaction between the plant species and macerate type that affected the number of eggs ($p < 0.001$). The number of eggs was reduced more when exposed to the dry macerate (83 to 91%) than when exposed to the water macerate (36 to 73%). For both the dry and water macerates, the number of galls and eggs was always

lower than for the controls, independent of the type of macerate and plant species (Table 2).

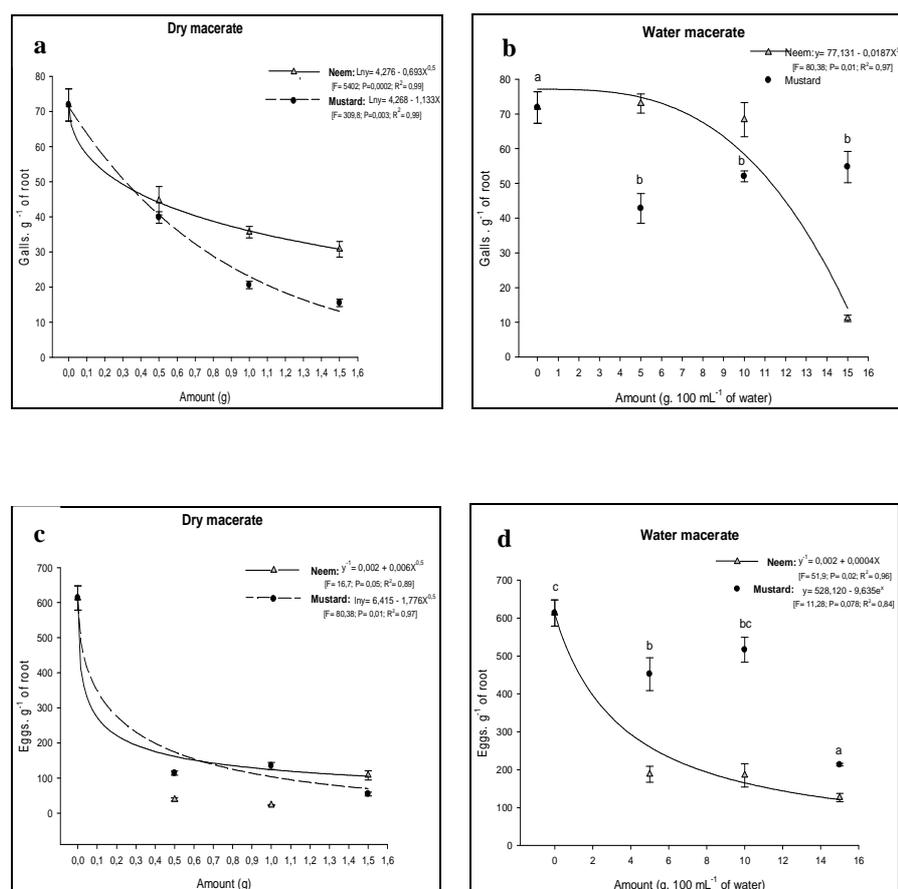


Fig. 4. The number of *Meloidogyne incognita* galls (a and b) and eggs (c and d) in tomato plant roots after inoculation with second-stage juveniles after exposure to the VOCs of different amounts (grams = g) of neem and mustard plant dry (a and c) and water macerates (b and d). The bars indicate the mean standard errors.

Table 2 Number of galls and eggs per gram of tomato plant root inoculated with *Meloidogyne incognita* second-stage juveniles after exposure to the VOCs emitted by neem and mustard plant macerates.

Plant macerate	Galls.g ⁻¹ of root		Eggs.g ⁻¹ of root	
	Mustard	Neem	Mustard	Neem
Dry	25 cA	36 bA	101 cA	56 cA
Water	50 bA	51 bA	394 bA	167 bB
Control (water)	72 aA	72 aA	613 aA	613 aA

Averages with matching lower case letters within the same column and upper case letter within the same row are not significantly different according to the Tukey test ($p < 0.05$).

3.4. Identification of volatile compounds emitted from neem and mustard macerates by GC-MS

GC-MS analyses of the volatiles emitted by mustard and neem macerates revealed 32 and 58 compounds, respectively. Seven of the molecules found were not identified. Alcohols and esters were the main compounds found in the neem macerate. The mustard macerate yielded predominantly sulfur-containing compounds (mainly isothiocyanates) and alcohols. However, there was higher chemical diversity in the VOCs identified in the mustard macerates (Tables 3 and 4).

The compounds identified in the macerates were categorized as absent (not detected), as present (“v”) or as a major compound (“vv”) according to their presence and quantity. It is important to note that the intensity of peaks in the chromatogram for a SPME depends on the amount of the compound in the sample, the type of fiber used, the boiling point of the compound, and the extraction conditions. For both neem and mustard plants, the majority of VOCs

identified in the dry macerate were also found in the water macerate, although some VOCs were only detected in one macerate.

Table 3 VOCs identified in mustard by SPME-GC-MS.

Compound ^a	RI Exp.	RI Lit. ^b	Similar. (%)	Dry macerate	Wet macerate
Alcohols					
1 2-methyl-propanol	621	622	91	v	v
2 1-penten-3-ol	676	686	94	v	v
3 3-methyl-1-butanol	727	734	95		vv
4 2-methyl-1-butanol	730	738	91		v
5 pentanol	762	768	90	v	v
6 2-pentenol (isomer)	766	-	86	v	
7 3-hexenol (E)	848	851	85	vv	v
8 3-hexenol (Z)	852	857	93	vv	v
9 1-hexanol	865	867	93		v
10 2-ethyl-hexanol	1028	1029	94		vv
11 phenylethyl alcohol	1115	1116	91		v
Sulfured					
1 dimethyl disulfide	739	738	94		vv
2 allyl thiocyanate	869	-	91	v	v
3 isothiocyanate ^c	882	-	-	vv	vv
4 2,4-dithiopentane	886	885	80		v
5 allyl isothiocyanate	888	890	94	v	v
6 2-propenyl-methyl-disulfide	914	919	80		v
7 dimethyl trisulfide	966	964	94		v
8 1-butenyl isothiocyanate	984	982	90	vv	
9 3-butenyl isothiocyanate	1005	1006	89	vv	v
10 isothiocyanate ^c	1058	-	-	v	
Others					
1 allyl cyanide	651	658	95	vv	vv
2 isopentyl methyl ether	684	684	94	v	vv
3 3-pentanone	696	688	90	v	v
4 2-ethyl-furan	700	700	93	v	v
5 hexanal	800	800	89	v	v
6 2-hexenal	849	854	93	vv	v
7 unidentified ^d	907	-	-	v	v
8 benzaldehyde	958	961	95	v	
9 n-ethyl-bezenamine	1129	1128	92		v
10 cyclocitral (isomer)	1220	1218	80	v	v
11 Sesquiterpene ^e	1538	-	85	v	v

v – Compound present in the sample; vv – major compound.

^a The term isomer was added to the table for cases where it was impossible to define which isomer was present.

^b Theoretical retention indexes according to the literature (R.P. Adams, Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, 4th Ed., Allured Publishing Corp., Carol Stream, 2007.) (<http://webbook.nist.gov/chemistry/>) (Jens Rohloff, Atle M. Bones; Phytochemistry 66 (2005) 1941–1955).

^c Compound with fragmentation patterns similar to an isothiocyanate.

^d Spectrum: m/z [151]⁺ (65%), [133] (100%), [135] (26%), [134] (9%), [68] (8%), [77] (4%), [75] (2%).

^e Compounds not identified due to their low purity or low peak intensity in the mass spectrum. Mass spectrum fragmentation typical of non-oxygenated sesquiterpenes.

Table 4 VOCs identified in neem by SPME-GC-MS

Compound ^a	RI Exp.	RI Lit. ^b	Similar. (%)	Dry macerate	Wet macerate
Alcohols					
1 ethanol	-	-	98	vv	vv
2 propanol	-	-	92	v	
3 2-methyl-propanol	621	622	91	v	v
4 1-penten-3-ol	676	-	94	v	
5 3-methyl-1-butanol	727	734	95		vv
6 2-methyl-1-butanol	730	738	91		v
7 pentanol	762	768	89	v	
8 2-pentenol (isomer)	766	-	90	v	
9 2-methyl-2-buten-1-ol	772	-	84	v	v
10 3-methyl-2-buten-1-ol	776	778	85	v	v
11 3-hexenol (E)	848	851	83	vv	v
12 3-hexenol (Z)	852	857	81	vv	vv
13 2-hexenol (E)	864	861	86	v	v
14 1-hexanol	866	867	94	vv	vv
15 2-ethyl-hexanol	1028	1029	94		vv
16 2-nonanol	1096	1098	76	v	
Esters					
1 ethyl acetate	612	-	96	v	
2 butyl acetate	810	812	80	v	
3 propyl butanoate	900	896	94	v	
4 butyl butanoate	996	993	80	v	v
5 3-hexenyl acetate (E)	1007	1004	93	v	
6 3-hexenyl acetate (Z)	1008	1007	91	v	
7 hexyl acetate	1015	1008	95	v	
8 2-hexenyl acetate	1017	1019	91	v	
9 2-ethyl hexenoate (isomer)	1045	-	89	v	
10 pentyl butanoate	1095	1093	87		v
11 3-hexen-1-ol propanoate (isomer)	1099	-	89	v	v
12 3-hexen-1-ol propanoate (isomer)	1101	-	92	v	v
13 hexyl propanoate	1107	1105	91		v
14 2-hexen-1-ol propanoate	1110	1111	91		v
15 3-hexenyl isobutanoate (isomer)	1144	1145	94	v	
16 2-methyl-hexyl propanoate	1149	-	91	v	
17 3-hexenyl butanoate (E)	1186	-	93	v	

Continued

Compound ^a	RI Exp.	RI Lit. ^b	Similar. (%)	Dry macerate	Wet macerate
18 3-hexenyl butanoate (Z)	1187	1186	94	v	
19 2-hexenyl butanoate (E)	1189	-	88	v	
20 hexyl butanoate	1193	1191	96	v	
Others					
1 acetone	-	-	94	v	v
2 carbon disulfide	-	-	93		v
3 2,3-butadione	-	-	95	v	
4 methyl furan (isomer)	611	-	92	v	v
5 2-pentanone	683	-	92	vv	v
6 3-pentanone	696	-	93	vv	v
7 acetoin (3-hidroxi-2-butanone)	715	718	90		v
8 N- methylpyrrole	739	-	88		vv
9 dimethyl thiophene (isomer)	905	-	92		v
10 octadien-3-one (isomer)	984	983	80	v	
11 m-cymene	1024	1022	88	v	
12 limonene	1028	1031	89	v	
13 eucalyptol	1030	1033	82	v	
14 2,2,6-trimethylcyclohexanone	1034	1035	91	v	v
15 N-ethyl-bezenamine	1115	1116	92		v
16 sesquiterpene ^c	1379	-	-	v	
17 sesquiterpene ^c	1437	-	-	vv	vv
18 sesquiterpene ^c	1490	-	-	v	v

v – Compound present in the sample; vv – major compound.

^a The term isomer was added to the table for cases where it was impossible to define which isomer was present.^b Theoretical retention indexes according to the literature (R.P. Adams, Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, 4th Ed., Allured Publishing Corp., Carol Stream, 2007.) (<http://webbook.nist.gov/chemistry/>)(Jens Rohloff, Atle M. Bones; Phytochemistry 66 (2005) 1941–1955).^c Compounds not identified due to their low purity or low peak intensity in the mass spectrum. Mass spectrum fragmentation typical of non-oxygenated sesquiterpenes.

4. Discussion

Brassica species emit several VOCs from their macerated leaves; however, there have been no reports on the nematicidal effect of these VOC mixtures. Some studies have found a fungicidal effect for the VOCs from *Brassica juncea* leaf macerates, as indicated by the decreased radial growth of *Rhizoctonia solani* and *Pythium ultimum* cultures (Charron and Sams, 1999) as well as *Fusarium sambucinum* (Mayton et al., 1996). Although the nematicidal effect of the total VOCs emitted by Brassica macerates have not been investigated, some molecules present in its VOC mixture have individually been found to have nematicidal effects (Ojaghian et al., 2012; Zasada and Ferris, 2003).

The nematicidal effects of VOCs emitted by neem, pigeon pea, velvet bean and pig bean tissue macerates have not been studied. However, the nematicide activity is already known for the non-volatile molecules produced by these plants, e.g., azadirachtin from neem, lectins from pig bean, and both triacontan-1-ol and tetracosanoate triaconyl from velvet bean (Agrawal et al., 2005; Alvarez, 1989; Huang and Morgan, 1990; Nogueira et al., 1996; Silva et al., 2008).

Although some of the neem and mustard VOCs were only detected in one of the macerate types, the majority of VOCs were found in both dry and water macerates. This could be due to several factors: *i*) compounds being detected in the dry but not the water macerate may be due to the retention of these compounds by water, which decreases the quantity available for extraction by the SPME fiber; *ii*) some compounds may be degraded by water; and/or *iii*) water favors the extraction of certain compounds from the neem and mustard leaves. Although these hypotheses are all possible, the analyses performed do not allow us to determine if any of them are indeed factors.

The toxicity of VOCs emitted by the dry and water macerates was evaluated by assessing the mobility of *M. incognita* J₂ exposed to these VOCs (Table 1). Decreased mobility was observed for the dry macerate compared with the water macerate for the majority of the tissues tested. It should be noted that the VOCs emitted by the water macerates resulted in significantly higher J₂ nematode immobilities than the distilled water control. The increased toxicity of VOCs emitted from the dry macerates relative to the water macerates has two possible explanations: *i*) the VOCs identified are different for both the dry and water macerates from neem and mustard plants (Tables 3 and 4), which may suggest some compounds are degraded or transformed through contact with water; or *ii*) some of the VOCs emitted by the macerates may be retained by the water in the water-macerate suspension, which decreases their quantity in the gas mixture, but they are present in the water macerate because the J₂ nematode immobility due to the emitted VOCs differs from the control. It is impossible to know which of these hypotheses is more plausible or if they occur simultaneously.

Because there were reports that water exposed to the VOCs emitted by fungal cultures are toxic to *M. incognita* J₂ (Grimme et al., 2007), a test was performed to evaluate the retention of volatiles by water. Water exposed to the VOCs from neem, mustard and broccoli (positive control) were toxic to J₂ nematodes (Fig. 3), which indicates that at least some of the VOCs must be retained by water. The increased toxicity of water exposed to VOCs from broccoli flowers compared with the neem and mustard macerates may be due to the following: *i*) a larger quantity of VOCs are emitted by broccoli than the other plants tested; *ii*) the VOCs emitted by the broccoli are more toxic than the VOCs emitted by the other plants; and/or *iii*) the VOCs emitted by broccoli are better retained by water than the VOCs from the other plants. In this study, the broccoli flower VOCs were compared to the water VOCs of neem, mustard,

pigeon pea and velvet bean leaves as well as pig bean seeds. Because these components represent different types of tissues, no conclusion can be drawn regarding the amount of VOCs produced in different types of tissues. Future studies are needed to evaluate what effect green manure incorporation has on irrigated soils under field conditions. Indeed, the retention of VOCs by water is related to their water solubility. The VOC retention or solubility in water is dependent on the Henry law ($S = K \cdot P$), in which the VOC quantity in water increases with partial pressure and molecule polarity (affecting the increase of K). Because water is polar, polar VOCs can be expected to have greater solubility due to intermolecular interactions such as hydrogen bonds or dipole-dipole bonds. For example, of the compounds identified by GC-MS, ethanol and acetone are miscible with water, whereas hexanol, carbon disulfide and methylbutanol isomers have low water solubility. Dimethyl disulfide, 2-nonanol and hexyl butanoate are practically water insoluble. The different solubility of these compounds may explain the different results obtained when water was exposed to VOCs from the different tissues because they emitted different compounds. A possible application of this concept would be to use soil irrigation after incorporating green plant tissues to increase the retention of volatile molecules toxic to phytonematodes.

Zeringue and Bhatnagar (1994) identified VOCs from neem leaves by GC/MS and observed that 23% of the total area of the correspondent peak consisted of alcohol molecules. In the present work, alcohol molecules were also predominate in neem leaf VOCs; however, the alcohol molecules found were different from those identified by Zeringue and Bhatnagar (1994). Additionally, other molecules identified by Zeringue and Bhatnagar (1994) differed from those found in this study. The VOCs were collected from intact leaves by Zeringue and Bhatnagar (1994) and from macerated leaves in the present study, which may explain the difference in the characterized VOC molecules. In fact,

macerate and intact leaves furnish different VOC molecules for the same plant (Augusto et al., 2003). Isothiocyanates have been found by many researchers in mustard VOCs (Charron and Sams, 1999; Mayton et al., 1996; Ojaghian et al., 2012), which is in accordance with our data; we found many sulfured molecules, including isothiocyanate (Table 3).

Although the VOCs analyzed by GC-MS revealed sulfur compounds (primarily isothiocyanates) and alcohols in mustard macerates and primarily alcohols and esters in neem macerates (tables 3 and 4), the toxicity of the individual compounds were not tested on *M. incognita* J₂ in this work. Nevertheless, there are reports that isothiocyanates, which are produced via the hydrolysis of glucosinolates by the myrosinase enzyme and have been identified in both mustard and broccoli, presented high toxicity to several pathogens (Charron and Sams, 1999; Mayton et al., 1996; Ojaghian et al., 2012; Zasada and Ferris, 2003). Other VOCs identified from neem and/or mustard may also be toxic. For example, methyl butanol, ethanol, ethyl acetate and phenyl ethyl alcohol isomers are present in a mixture of VOCs produced by *Saccharomyces cerevisiae* and inhibit the mycelial growth of the *Guignardia citricarpa* fungus (Fialho, et al., 2010). Pure hexanal was responsible for decreasing the radial growth and production of aflatoxin in the fungus *Aspergillus parasiticus* (Zeringue and Bhatnagar, 1994). Acetone was negatively correlated to the survival of *Macrophomina phaseolina* and *Rhizoctonia solani* (Basseto et al., 2012). According to Eilbert et al. (2000), sesquiterpenes produced by the basidiomycete *Resupinatus leightonii* inhibit the formation of *Magnaporthe grisea* appressorium and showed cytotoxic activity.

The decreased infectivity of *M. incognita* J₂ in tomato plants after exposure to mustard and neem VOCs (Fig. 4) shows the nematicidal effect of these VOCs and confirms that the immobilized J₂ from the *in vitro* tests suffered irreversible damage to their infective capability. The strong reduction in

reproduction due to decreased infectivity indicates incapacity of the feeding sites that provide the female with sufficient nutrients for good egg production. Further research is needed to confirm this conclusion. Increasing the exposure time of *M. incognita* J₂ to VOCs from *Fusarium oxysporum* cultures reduced the number of galls in the tomato plants (Freire et al., 2012). The VOCs emitted by the fungus *Muscodor albus* decreased *M. incognita* infectivity in tomato plants (Grimme et al., 2007). The VOCs emitted by the *Bacillus megaterium* YFM3.25 rhizobacteria reduced the number of galls and eggs of *M. incognita* compared with the control (Huang et al., 2010).

The present study determined the toxicity of volatiles emitted from green plant tissues composed of neem, mustard, mucuna, pigeon pea and pig bean to *M. incognita* and suggested that this toxicity also occurs after incorporating green plant tissue in the soil. Lord et al. (2011) observed a greater reduction in *Globodera pallida* populations in soils covered with plastic after incorporating *Brassica* green tissue than in uncovered soils. However, when tissues from the tested green plants are incorporated in the soil, the effects of their VOCs combine with the effects of non-volatile molecules and VOCs emitted by soil microbiota to become a part the biofumigation process of controlling phytonematodes.

5. Conclusions

All tested plants emitted VOCs that caused toxicity to *M. incognita* J₂ through J₂ immobilization. However, in most tested plants VOCs immobilization was higher in dry macerate compared to water macerate. When water was exposed to plant VOCs, only neem and mustard VOCs made the water toxic to J₂ by causing them immobilization. The exposed *M. incognita* J₂ to neem and mustard macerates VOCs reduced their infectivity and reproduction in tomato

plants proving thereafter nematocidal effect. GC/MS analysis revealed that VOCs of neem macerate contain mainly alcohols and esters and VOCs of mustard yielded, predominantly, sulfur-containing compounds (mainly isothiocynates) and alcohols.

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

References

Adams, R.P., 2007. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry, fourth ed. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, Illinois USA.

Agrawal, H., Kaul, N., Paradkar, A.R., Mahadik, K.R., 2005. Standardization of crude extract of neem seed kernels (*Azadirachta indica* A. Juss) and commercial neem based formulations using HPTLC and extended length packed-columns SFC method. *Chromatographia* 62, 183-195.

Alvares, N.G., 1989. La rotación con leguminosas como alternativa para reducir el daño causado por fitopatógenos del suelo y elevar la productividad del agro ecosistema maíz en el trópico húmedo. Colégio de Pos-graduados, Montecillo México.

Arthur, C.L., Pawliszyn, J., 1990. Solid-phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Anal. Chem.* 62, 2145-2148.

Augusto, F., Lopes, A.L., Zini, C.A., 2003. Sampling and sample preparation for analysis of aromas and fragrances. *Trends Anal. Chem.* 22, 160-169.

Basseto, M.A., Bueno, C.J., Augusto, F., Pedroso, M.P., Furlan, M.F., Padovani, C.R., Furtado, E.L., Souza, N.L., 2012. Solarização em microcosmo: efeito de materiais vegetais na sobrevivência de fitopatógenos de solo e na produção de voláteis. *Summa Phytopathol.* 38, 123-130.

Charron, C.S., Sams, C.E., 1999. Inhibition of *Pythium ultimum* and *Rhizoctonia solani* by shredded leaves of *Brassica* species. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 124, 462-467.

Eilbert, F., Engler-Lohr, M., Anke, H., Sterner, O., 2000. Bioactive sesquiterpenes from the basidiomycete *Resupinatus leightonii*. *J. Nat. Prod.* 63, 1286-1287.

Fernando, W.G.D., Ramarathnam, R., Krishnamoorthy, A.S., Savchuk, S.C., 2005. Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol. *Soil Biol. Biochem.* 37, 955-964.

Fialho, M.B., Toffano, L., Pedroso, M.P., Augusto, F., Pascholati, S.F., 2010. Volatile organic compounds produced by *Saccharomyces cerevisiae* inhibit the

in vitro development of *Guignardia citricarpa*, the causal agent of citrus black spot. World J. Microb. & Biot. 26, 925-932.

Freire, E.S., Campos, V.P., Pinho, R.S.C., Oliveira, D.F., Faria, M.R., Pohlit, A.M., Noberto, N.P., Rezende, E.L., Pfenning, L.H., Silva, J.C.T., 2012. Volatile substances produced by *Fusarium oxysporum* from coffee rhizosphere and other microbes affect *Meloidogyne incognita* and *Arthrobotrys conoides*. J. Nematol. 44, 321-328.

Gray, C.M., Monson, R.K., Fierer, N., 2010. Emissions of volatile organic compounds during the decomposition of plant litter. J. Geophys. Res-Biogeosci. 115, 1-9.

Grimme, E., Zidack, N.K., Sikora, R.A., Strobel, G.A., Jacobsen, B.J., 2007. Comparison of *Muscodor albus* volatiles with a biorational mixture for control of seedling diseases of sugar beet and root-knot nematode on tomato. Plant Dis. 91, 220-225.

Gu, Y.Q., Mo, M.H., Zhou, J.P., Zou, C.S., Zhang, K.Q., 2007. Evaluation and identification of potential organic nematicidal volatiles from soil bacteria. Soil Biol. Biochem. 39, 2567-2575.

Huang, H.P., Morgan, E.D., 1990. Analysis of azadirachtin by supercritical-fluid chromatography. J. Chromatogr. 519, 137-143.

Huang, Y., Xu, C.K., Ma, L., Zhang, K.Q., Duan, C.Q., Mo, M.H., 2010. Characterisation of volatiles produced from *Bacillus megaterium* YFM3.25 and their nematicidal activity against *Meloidogyne incognita*. Eur. J. Plant Pathol. 126, 417-422.

Hussey, R.S., Barker, K.R., 1973. A comparison of methods for collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. Plant Dis. Rep. 57, 1025-1028.

Knudsen, J.T., Gershenzon, J., 2006. The chemistry diversity of floral scent, in: Dudareva, N., Pichersky, E. (Eds.), Biology of floral scent. CRC, Boca Raton, pp. 27-52.

Javed, N., Gowen, S.R., Inam-Ulhaq, M., Anwar, S.A., 2007. Protective and curative effect of neem (*Azadirachta indica*) formulations on the development of root-knot nematode *Meloidogyne javanica* in roots of tomato plants. Crop Prot. 26, 530-534.

Lazzeri, L., Tacconi, R., Palmieri, S., 1993. In vitro activity of some glucosinolates and their reaction products toward a population of the nematode *Heterodera schachtii*. J. Agric. Food Chem. 41, 825-829.

Lopes, E.A., Ferraz, S., Freitas, L.A., Ferreira, P.A., Amora, D.X., 2005. Efeitos dos extratos aquoso de mucuna preta e manjeriçao sobre *Meloidogyne incognita* e *M. javanica*. Nematol. Bras. 29, 67-74.

Lord, J.S., Lazzeri, L., Atkinson, H.J., Urwin, P.E., 2011. Biofumigation for control of pale potato cyst nematodes: activity of brassica leaf extracts and green manures on *Globodera pallida* in vitro and in soil. Agric. Food Chem. 59, 7882-7890.

Lynn, O.M., Song, W.G., Shim, J.K., Kim, J.E., Lee, K.Y., 2010. Effects of azadirachtin and neem-based formulations for the control of sweetpotato whitefly and root-knot nematode. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. 53, 598-604.

Mayton, H.S., Olivier, C., Vaughn, S.F., Loria, R., 1996. Correlation of fungicidal activity of *Brassica* species with allyl isothiocyanate production in macerated leaf tissue. Phytopathol. 86, 267-271.

Mojtahedi, H., Santo, G.S., Wilson, J.H., Hang, A.N., 1993. Managing *Meloidogyne Chitwoodi* on potato with rapeseed as green manure. Plant Dis. 77, 42-46.

Neves, W.S., Freitas, L.G., Coutinho, M.M., Parreira, D.F., Ferraz, S., Costa, M.D., 2007 Biofumigação do solo com espécies de brássicas para o controle de *Meloidogyne javanica*. Nematol. Bras. 31, 195-201.

Nogueira, M.A., de Oliveira, J.S., Ferraz, S., 1996. Nematicidal hydrocarbons from *Mucuna aterrima*. Phytochemistry 42, 997-998.

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

Ojaghian, M.R., Jiang, H., Xie, G.L., Cui, Z.Q., Zhang, J.Z., Li, B., 2012. In vitro biofumigation of *Brassica* tissues against potato stem rot caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. Plant Pathol. J. 28, 185-190.

Rohloff, J., Bones, A.M., 2005. Volatile profiling of *Arabidopsis thaliana* - Putative olfactory compounds in plant communication. Phytochemistry 66, 1941-1955.

Santos, E.S., Lacerda, J.T., Carvalho, R.A., Cassimiro, C.M., 2009. Produtividade e controle de nematóides do inhame com plantas antagônicas e resíduos orgânicos. *Tecnol. Ciên. Agropec.* 3, 7-13.

Sasser, J.N., Freckman, D.W., 1987. A world perspective on nematology the role of the society, in: Veech, J.A., Dickson, D.W. (Eds.), *Vistas on nematology*, Society of Nematologists, Maryland, pp. 7-14.

Silva, G.S., Souza, I.M.R., Cutrim, F.A., 2002. Efeito da incorporação de sementes trituradas de feijão de porco ao solo sobre o parasitismo de *Meloidogyne incognita* em tomateiro. *Fitopatol. Bras.* 27, 412-413.

Silva, J.C.T., Oliveira, R.D.L., Jham, G.N., Aguiar, N.D.C., 2008 Effect of neem seed extracts on the development of the Soybean Cysts Nematode. *Trop. Plant Pathol.* 33, 171-179.

Stapleton, J.J., Duncan, R.A., 1998. Soil disinfestation with cruciferous amendments and sublethal heating: effects on *Meloidogyne incognita*, *Sclerotium rolfsii* and *Pythium ultimum*. *Plant Pathol.* 47, 737-742.

Trudgill, D.L., Block, V.C., 2001 Apomictic, polyphagous rootknot nematodes: exceptionally successful and damaging biotrophic root pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 39, 53-77.

Wheatley, R.E., 2002. The consequences of volatile organic compound mediated bacterial and fungal interactions. *Anton. Leeuw. Int. J. G.* 81, 357-364.

Zasada, I.A., Ferris, H., 2003. Sensitivity of *Meloidogyne javanica* and *Tylenchulus semipenetrans* to isothiocyanates in laboratory assays. *Nematology* 93, 747-750.

Zeringue, H.J., Bhatnagar, D., 1994. Effects of neem leaf volatiles on submerged cultures of aflatoxigenic *Aspergillus parasiticus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 3543-3547.

ARTIGO 2

Tempo de exposição de juvenis de segundo estágio a voláteis emitidos por macerados de nim e mostarda e biofumigação contra *Meloidogyne incognita*

Preparado de acordo com as normas da Nematropica

(Versão preliminar)

Barros, A. F., V. P. Campos, J. C. P. Silva, L. E. López, A. P. Silva, E. A. Poza, L. A. Pedroso.

ABSTRACT

Barros, A. F., V. P. Campos, J. C. P. Silva, L. E. López, A. P. Silva, E. A. Pozza, L. A. Pedroso. 2014. Exposition time of second stage juveniles to volatiles emitted by neem and mustard macerates, and biofumigation against *Meloidogyne incognita*. *Nematropica* 36:00-00.

Although volatiles emitted by diverse sources have demonstrated toxicity to plant pathogens, only a few studies have proved the effect of volatiles emitted by plants to plant parasitic nematodes. Thereafter, the aims of this work were to study the exposition times of second stage juveniles (J₂) of *Meloidogyne incognita* (MI) to volatile organic compounds (VOC) of neem and mustard and also the direct effect of these plant macerates incorporated into infested substrate with eggs of MI (biofumigation) as well as the effects of the VOCs released to the air and held at the substrate surface by the plastic cover, in J₂. Macerates of neem and mustard emitted VOCs that caused significant J₂ immobility at initial exposition time periods. Significant mortality, however, was observed after 24 hours of exposition to VOCs. Number of MI galls and eggs, resulted from tomato inoculation with J₂ exposed to VOCs, decreased with the increase of exposition times. So these findings confirmed as nematicidal effect of the previous evaluation of J₂ immobilization and mortality after 24 hours of J₂ exposition time. The biofumigation underwent with neem and mustard macerates incorporated into infested substrate with MI eggs, under plastic sealed cups, resulted in linear reduction of galls when macerate amounts were increased, and lesser than in control with highest amount (9.6 g). However, the number of eggs were already significantly reduced, compared to control, in macerates above or equal to 2.4g. The J₂ exposed to VOCs emitted by neem or mustard macerates incorporated into substrate and retained in chamber formed on the substrate surface enabled by plastic sealing, caused significant immobility and mortality even in lower macerate amount. These volatiles had been lost in the absence of the plastic sealing. The mixture of ground neem or mustard with the substrate and the VOC emitted to the air have nematicidal effects to MI, as well as the J₂ exposition to their VOCs after 24 hours.

Key words: *Azadirachta indica*, *Brassica juncea*, control, root-knot nematodes.

RESUMO

Barros, A. F., V. P. Campos, J. C. P. Silva, L. E. López, A. P. Silva, E. A. Pozza, L. A. Pedroso. 2014. Tempo de exposição de juvenis de segundo estágio a voláteis emitidos por macerados de nim e mostarda e biofumigação contra *Meloidogyne incognita*. Nematropica 36:00-00.

Embora voláteis emitidos por diversas fontes tenham demonstrado toxicidade a patógenos de plantas, poucos são os estudos sobre os efeitos de voláteis emitidos por plantas a fitonematoides. Por isso, objetivou-se neste trabalho estudar: tempos de exposição dos juvenis de segundo estágio (J₂) de *M. incognita* (MI) a compostos orgânicos voláteis (COVs) de nim e mostarda, o efeito direto desses macerados incorporados ao substrato infestados com ovos de MI (biofumigação), e dos COVs liberados ao ar e retidos na superfície do substrato por cobertura plástica em J₂. Macerados de nim e mostarda emitiram COVs que causaram imobilidade significativa de J₂ já nos primeiros períodos de exposição. Mortalidade significativa foi observada a partir de 24 horas de exposição aos COVs. Os números de galhas e ovos de MI resultantes da inoculação em tomateiros dos J₂ expostos aos COVs diminuíram com o aumento do tempo de exposição. Assim, confirmaram como efeito nematicida as avaliações anteriores de imobilidade e mortalidade a partir de 24 horas de exposição dos J₂. O processo de biofumigação, em ambiente vedado com plástico, com macerado de nim ou mostarda incorporado ao substrato infestado com ovos de MI resultou na redução linear de galhas com o aumento da quantidade dos macerados, sendo menor que a testemunha na maior quantidade (9,6g). Contudo o número de ovos já foi significativamente reduzido em comparação a testemunha em quantidades dos macerados acima ou igual a 2,4 g. Os J₂ expostos aos COVs emitidos pelos macerados de nim ou mostarda incorporados ao substrato e retidos na câmara formada na superfície pela cobertura plástica causaram imobilidade e mortalidade significativa já na menor quantidade. Esses voláteis seriam perdidos na ausência de cobertura plástica. A mistura ao substrato do macerado de nim ou mostarda triturado e os COVs emitidos para o ar têm efeitos nematicidas a MI bem como as exposições dos J₂ a eles a partir de 24 horas.

Palavras chave: *Azadirachta indica*, *Brassica juncea*, controle, nematoide das galhas.

INTRODUÇÃO

Meloidogyne incognita tem ampla gama de hospedeiros, possivelmente, sendo o patógeno de plantas que mais causa perdas na produção de alimentos no mundo (Trudgill & Block, 2001). Dentre as culturas que sofrem grandes danos a esse patógeno destaca-se o tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) com

perdas variando de 28,7 a 85,0% (Chitwood, 1951; Lordello, 1981; Ferraz & Churata-Masca, 1983). Esta constitui a hortaliça que mais hospeda nematoide do gênero *Meloidogyne*.

Voláteis emitidos por culturas fúngicas e bacterianas causam, principalmente, imobilidade e mortalidade de juvenis de segundo estágio (J₂) com poucos dados sobre a infectividade e reprodução dos J₂ expostos aos voláteis e inoculados em plantas suscetíveis (Gu *et al.*, 2007, Campos *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2010; Freire *et al.*, 2012). Entretanto, compostos orgânicos voláteis (COVs) emitidos por plantas com efeitos tóxicos a fitonematoides têm sido pouco estudados, apesar da biofumigação, técnica usada no campo para controle de fitonematoides ter seus efeitos biocontroladores atribuídos a produção de voláteis biotóxicos (Ojaghian *et al.*, 2012). Porém, outros fatores tais como moléculas não voláteis liberadas pela degradação dos tecidos incorporados ao solo e voláteis emitidos pela microbiota colonizadora desses tecidos se misturam aos COVs liberados pelos tecidos da planta causando efeitos aditivos ou sinérgicos ainda não avaliados. Por exemplo, sabe-se que os COVs emitidos por tecido colonizado por micro-organismos chegam a 11 vezes àquele emitido por tecido esterilizado (Gray *et al.*, 2010).

Assim, para o entendimento sobre a eficácia de voláteis no controle de fitopatógenos é importante separar os efeitos dos COVs emitidos pela microbiota que se alimenta na massa verde incorporada ao solo daqueles emitidos pela massa verde sem a infestação microbiana, o que facilita o entendimento do processo envolvido no método de biofumigação. Com relação à fitonematoides, estudos neste sentido podem ser realizados a semelhança daqueles com COVs emitidos por fungos e bactérias (Campos *et al.*, 2010; Freire *et al.*, 2012). Segundo Lord *et al.* (2011) o entendimento dos mecanismos envolvidos na biofumigação ajuda a melhorar a eficiência desse método de controle. Além disso, é importante também conhecer a interação de diversos

fatores que afetam a biofumigação no campo (Morra & Kirkegaard, 2002; Matthiessen *et al.*, 2004).

O potencial da biofumigação em suprimir patógenos do solo tem sido demonstrado pela incorporação de tecidos verdes de espécies de brássicas e *Azadirachta indica* no solo (Stapleton & Duncan, 1998; Ahmad & Ghaffar, 2007; Lord *et al.* 2011; Moura *et al.*, 2012), sem contudo separar o efeito apenas dos COVs emitidos dos tecidos vegetais principalmente na redução populacional de fitonematoides. Porém, o efeito dos COVs pode ser potencializado no momento da incorporação dos tecidos vegetais com o uso da cobertura plástica (Lord *et al.*, 2011).

Como a planta incorporada ao solo é a parte principal do processo de biofumigação, é relevante o estudo dos voláteis emitidos por elas como candidatos a biofumigação, principalmente em tecidos triturados, para assim ajudar na explicação da eficácia desse processo no campo. As espécies de brássicas produzem compostos sulfurados como os glucosinolatos, os quais são hidrolisados pela enzima mirosinase quando seus tecidos são danificados produzindo o composto volátil denominado de isotiocianato (Bones & Rossiter, 2006). Os isotiocianatos têm demonstrado atividade nematicida e fungicida (Lazzeri, *et al.*, 1993; Zasada & Ferris, 2003; Ojaghian *et al.*, 2012). Porém precisam ser retidos no solo para aumentar a eficácia no controle de fitonematoides. Alguns COVs de folhas intactas de nim, também, têm sido caracterizados como alcoóis, aldeídos, cetonas, hidrocarbonetos, além de compostos variados incluindo os terpenos, estireno, além dos compostos contendo enxofre e 2,5-di-hidro-furano (Zeringue & Bhatnagar, 1994). Alguns desses compostos reduziram o crescimento radial de *Aspergillus parasiticus* e conseqüentemente a produção de aflatoxina (Zeringue & Bhatnagar, 1994). Alcoóis e ésteres foram encontrados em folhas maceradas de nim (dados não incluídos). Todavia, a toxicidade dessas moléculas voláteis emitidas pelo nim

não foi avaliada contra fitonematoides. Sabe-se também que a molécula não volátil, tetranortriterpenóide azadiractina, produzida pelo nim reduz a população de nematoides (Lynn *et al.*, 2010).

Ainda não se estudou a sensibilidade dos J₂ em períodos de tempo de exposição aos voláteis necessários para causar efeitos deletérios aos J₂ expressos em perdas de imobilidade e na mortalidade ou mesmo na infectividade e reprodução desses J₂ em tomateiros. Também não se conhece o efeito isolado dos COVs, principalmente os compostos liberados ao ar após a incorporação dos tecidos vegetais, aos J₂ de *M. incognita*, por meio da biofumigação do substrato.

Esses tópicos, então, constituem os objetivos deste trabalho além de investigar também o efeito da biofumigação utilizando diferentes quantidades do macerado fresco de nim e de mostarda em ovos de *M. incognita* misturados ao substrato em ambiente hermético.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta de ovos e juvenis do segundo estágio de Meloidogyne incognita

Populações puras de *Meloidogyne incognita* foram multiplicadas em tomateiros e mantidas em casa de vegetação por aproximadamente 3 meses. A seguir as raízes com galhas foram separadas do solo, lavadas em água parada e cortadas em pedaços de 0,5 cm de comprimento. Delas foram extraídos ovos pelo processo descrito por Hussey & Barker (1973). Os ovos obtidos foram colocados em câmara de eclosão e os juvenis de segundo estágio (J₂) eclodidos a partir do segundo dia da montagem da câmara foram utilizados nos ensaios de toxicidade dos compostos orgânicos voláteis (COVs) emitidos por nim e mostarda.

Plantas estudadas e preparo dos macerados

Foram coletadas, aproximadamente, às oito horas da manhã, folhas de mostarda crespa (*Brassica juncea*) e nim (*Azadirachta indica*) no município de Lavras- MG, Brasil. Na obtenção do macerado fresco foi pesado 1,5 grama de folhas de cada planta. Cada porção vegetal foi desinfestada, superficialmente, com hipoclorito de sódio 2% por 1 minuto, seguido de três lavagens em água destilada. Após secagem do excesso de água em papel toalha, cada porção (quantidade) foi colocada em almofariz e macerada com pistilo sem adição de água. Esse material triturado foi utilizado imediatamente no teste de emissão de COVs tóxicos a J₂ de *M. incognita*.

Imobilidade e mortalidade de juvenis de segundo estágio de Meloidogyne incognita após exposição aos COVs de nim e mostarda por vários períodos de tempos, seguido de infecção e reprodução em tomateiros

Para este ensaio foram utilizados frascos de 80 x 28 mm SUPELCO™SPME (Sigma-Aldrich, Bellefonte, PA, USA) com tampa rosqueada, revestida internamente por uma película em silicone ligando a tampa ao frasco, garantindo vedação. No interior dos frascos esterilizados foram colocados 25 g de areia seca autoclavada e na superfície da areia foram depositados 2 mL de água destilada seguido de 1,5 grama do macerado vegetal de nim ou mostarda, individualmente, em cada frasco. Como controle, os frascos não receberam os macerados vegetais em cada tempo de exposição dos J₂. Em todos os frascos Supelcos um microtubo esterilizado de 1,5 mL foi introduzido até a altura mediana na areia ali contida. Então, todos eles foram vedados, e incubados em BOD a 25°C no escuro por 3 dias. A seguir, 1 mL de uma suspensão de 600 J₂ de *M. incognita* foi injetada com uma seringa de 3 mL de volume interno dentro do microtubo inserido na areia do frasco. Novamente, foram incubados nas mesmas condições anteriores por 3; 6; 12; 24; 48 e 72 horas. Ao final de cada período de exposição, os frascos foram abertos

e 200 µL da suspensão de J_2 contida nos microtubos foram transferidos para uma placa de polipropileno utilizada em testes sorológicos (“ELISA”) e quantificado a percentagem de J_2 móveis e imóveis em microscópio de objetiva invertida. A mortalidade dos J_2 foi avaliada após 24 horas. O restante da suspensão de J_2 (aproximadamente 480 J_2) foi disperso em 4 mL de água e inoculada em muda de tomateiro com 30 dias de idade, plantada em sementeira contendo células de 75 cm³ com substrato multiplant[®] (Terra do Paraíso, Holambra, SP, Brasil). Após a inoculação, as mudas foram mantidas em casa de vegetação. O número de galhas e ovos por sistema radicular foi avaliado 30 dias após a inoculação.

Biofumigação de substrato misturado com ovos de Meloidogyne incognita e toxicidade em J_2 dos voláteis liberados ao ar a partir de diferentes quantidades do macerado fresco de nim e mostarda em casa de vegetação

Para este ensaio foram utilizados copos plásticos com capacidade de 300 mL e cento e vinte gramas de substrato multiplant[®]. Foram utilizados os macerados frescos de nim e mostarda, obtidos conforme descrito anteriormente, nas quantidades de 0; 1,2; 2,4; 4,8; 9,6g, o que corresponde a uma porcentagem de 0; 1; 2; 4; 8%. Uma suspensão contendo 3000 ovos de *M. incognita* em 2,5 mL de água, obtida como descrito anteriormente, foi colocada em saco plástico juntamente com o substrato e o macerado de nim ou mostarda e misturados sob agitação para homogeneização. Esses ovos sofrerão os efeitos de moléculas voláteis e não voláteis. Em seguida, colocou-se a mistura nos copos plásticos, ajustando a umidade para 60% da capacidade de campo (cc). Para estudar isoladamente o efeito dos COVs sem interferência das moléculas não voláteis foi colocado um tubo eppendorf de 1,5 ml de capacidade aterrado até sua metade na mistura (substrato + macerado vegetal + ovos). O copo com a mistura foi envolvido completamente na parte superior com parafilme fechando-o hermeticamente formando a câmara de gases liberados pelo macerado fresco

misturado ao substrato. Foi colocado, na superfície interna do filme vedante parafilme[®] oposta ao tubo eppendorf, uma fita adesiva de 2x2 cm a fim de permitir maior resistência a perfuração pela seringa evitando aumentar o diâmetro do furo ou até mesmo rasgá-lo. Após três dias de vedação, com uma seringa contendo agulha perfurante, injetou-se 1 mL de uma suspensão contendo 100 J₂ de *M. incognita* no interior do tubo eppendorf. O furo no parafilme provocado pela perfuração com a seringa foi vedado com fita adesiva. Como controle, foi utilizado substrato sem adição do macerado vegetal com a umidade ajustada também para 60% da c.c. Após 48 horas de exposição dos J₂ aos COVs, o parafilme foi retirado e a suspensão de J₂ do tubo eppendorf de cada repetição foi transferida para placa ELISA onde foi avaliada a percentagem de J₂ móveis e imóveis em microscópio de objetiva invertida. A mortalidade dos J₂ foi avaliada após 24 horas. Após a retirada do parafilme uma muda de tomateiro contendo 4 pares de folhas foi transplantada para o copo contendo os ovos de *M. incognita*. Aos 45 dias avaliou-se o número de galhas e de ovos por sistema radicular.

Estatística e análise dos dados

Todos os ensaios foram repetidos duas vezes observando-se a consistência dos resultados. E foram organizados em delineamento inteiramente casualizado, com 4 repetições por tratamento. Para o primeiro e o segundo ensaios, a unidade experimental de cada repetição foi um tubo Supelco e um copo plástico, respectivamente. A Análise de variância (ANOVA) do primeiro ensaio (exposição dos J₂ de *M. incognita* por diferentes períodos de tempos aos voláteis emitidos por nim e mostarda) foi realizada em esquema fatorial, com 3 macerados vegetais (nim, mostarda e testemunha) x 6 tempos, constituindo-se 18

tratamentos . Para o segundo ensaio (biofumigação de substrato e dos voláteis liberados ao ar por nim e mostarda) foi utilizado o fatorial 2 macerados vegetais (nim e mostarda) x 5 quantidades, com total de 10 tratamentos. Os resultados foram previamente submetidos a testes de normalidade (Shapiro- Wilk) e homogeneidade de variância dos erros (Bartlett). No caso dos dados não atenderem aos pressupostos de normalidade e homogeneidade, estes foram submetidos a transformação. No ensaio sobre curva de tempo de exposição dos J₂ aos voláteis fez-se a transformação dos dados relativos à imobilidade e mortalidade dos J₂ de *M. incognita* a $\log(x + 0,5)$ e, os dados relativos ao número de ovos foram transformados para \sqrt{x} . Uma vez atendidos a estes pressupostos, aplicou-se o teste F, por meio da Análise de Variância (ANOVA). Quando o teste F era significativo (P <0,05) procedia-se, para as variáveis qualitativas de cada tratamento a comparação delas pelo teste de Tukey (P <0,05). Nos dados provenientes de variáveis quantitativas, ou seja, os tempos de exposição e as quantidades dos macerados, procedeu-se o ajuste de modelos de regressão lineares e não lineares.

RESULTADOS

Imobilidade e Mortalidade de juvenis de segundo estágio de Meloidogyne incognita após exposição aos COVs de nim e mostarda por vários períodos de tempos, seguido de infecção e reprodução em tomateiros

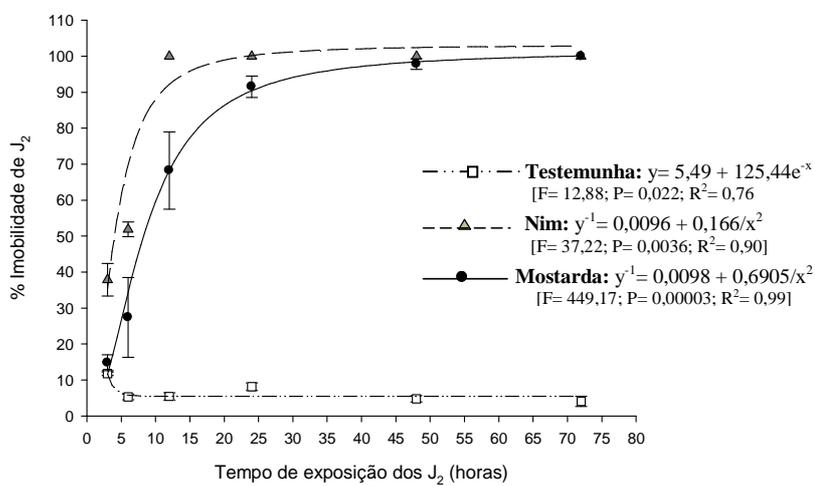
Houve interação significativa entre os macerados das espécies vegetais (nim, mostarda e testemunha) e tempo de exposição de J₂ de *M. incognita* quando avaliou-se a imobilidade (P<0,001) e a mortalidade (P<0,001). A imobilidade aumentou de forma exponencial com o tempo de exposição dos J₂

aos COVs dos macerados de nim e mostarda. Porém, a imobilidade dos J_2 expostos aos COVs do macerado de nim atingiu 100% já em 12 horas, enquanto no macerado de mostarda só alcançou o mesmo valor em 72 horas. Os COVs liberados por macerado de nim aumentaram significativamente a imobilidade dos J_2 em todos os tempos de exposição quando comparados com a testemunha. Já os COVs emitidos por macerado de mostarda causaram imobilidade significativa a partir de 6 horas de exposição. O macerado de nim emitiu COVs que causaram maior imobilidade dos J_2 em relação aos de mostarda apenas nos primeiros tempos de exposição aos voláteis (3 e 6 horas), não havendo diferença significativa nos demais tempos de exposição testados (Figura 1A).

Também a mortalidade dos J_2 aumentou de forma exponencial quando utilizou-se o macerado de mostarda, diferindo da testemunha a partir de 24 horas de exposição quando causaram uma taxa de mortalidade entre 91 a 100%. Quando utilizou-se o macerado de nim a mortalidade aumentou linearmente com o aumento do tempo de exposição, diferindo da testemunha, também, a partir de 24 horas (31 a 97%). Houve diferença significativa entre os macerados de nim e mostarda apenas com 24 horas de exposição (Figura 1B).

A mesma interação descrita acima foi significativa quando avaliou-se a infectividade (número de galhas [NG]) ($P < 0,001$) e a reprodução (número de ovos [NO]) ($P < 0,001$) dos J_2 de *M. incognita* após exposição aos COVs de nim e mostarda. Tanto o NG quanto o NO diminuíram com o aumento do tempo de exposição dos J_2 aos COVs dos macerados. O NG foi reduzido significativamente, em relação à testemunha, a partir de 24 e 48 horas para o macerado de mostarda e nim, respectivamente, sendo que o macerado de mostarda causou uma redução entre 41 a 96% e o macerado de nim entre 43 e 70%. Os COVs emitidos pela mostarda reduziram de forma mais eficiente o NG quando comparado aos COVs de nim nos tempos de 24 e 48 horas, não havendo diferença significativa em 72 horas de exposição dos J_2 . Já o NO foi reduzido

significativamente a partir de 48 horas de exposição em relação a testemunha, atingindo uma redução entre 63 a 92% e de forma semelhante pelos macerados de nim e mostarda (Figuras 2A e B).

A**B**

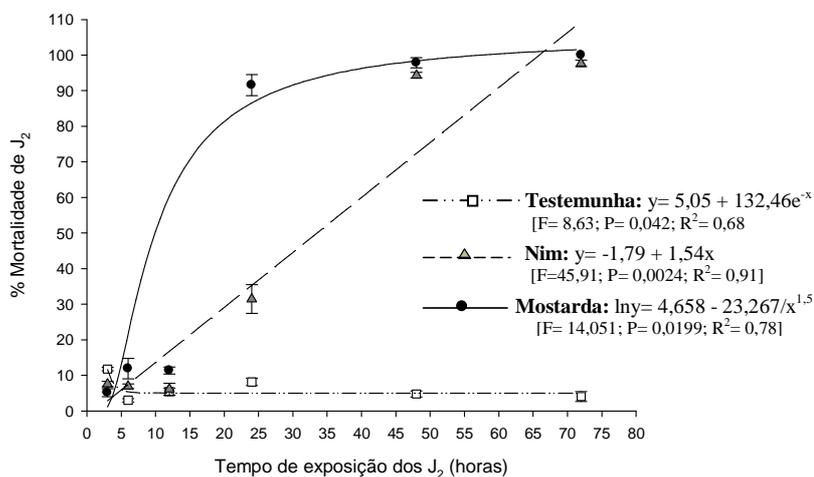
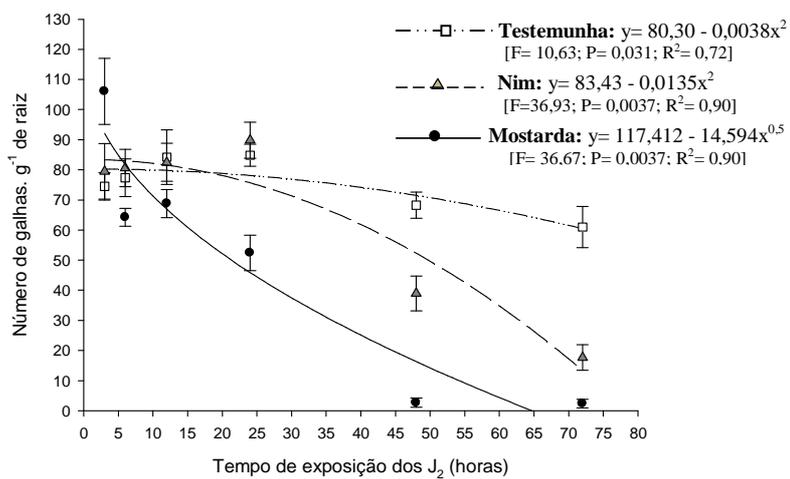


Figura 1. Percentual de imobilidade (A) e mortalidade (B) de juvenis de segundo estágio (J_2) de *Meloidogyne incognita* após vários tempos de exposição dos J_2 aos compostos orgânicos voláteis emitidos por macerados de folhas de nim e mostarda. Barras indicam erro padrão da média.

A



B

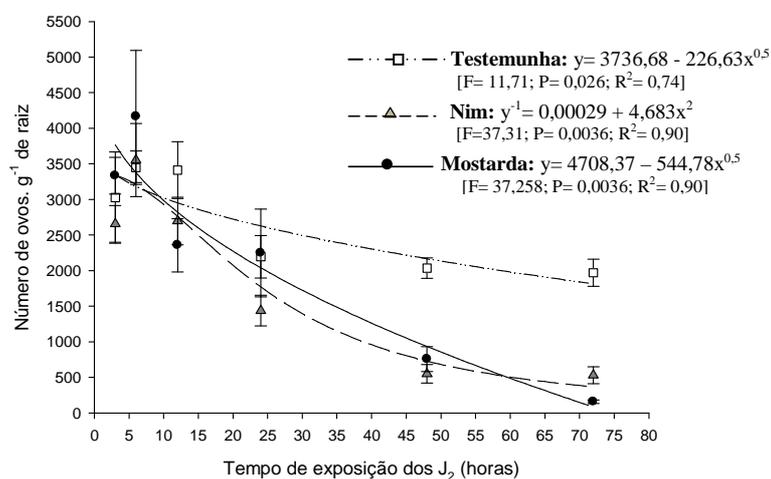


Figura 2. Infectividade e reprodução de juvenis de segundo estágio (J₂) de *Meloidogyne incognita* em raízes de tomateiro após vários tempos de exposição dos J₂ aos compostos orgânicos voláteis emitidos por macerados de folhas nim e mostarda. A) Número de galhas.g⁻¹ de raiz ; B) Número de ovos.g⁻¹ de raiz. Barras indicam erro padrão da média.

Biofumigação de substrato e toxicidade dos voláteis liberados ao ar a partir de diferentes quantidades do macerado fresco de nim e mostarda em casa de vegetação

Quando foram avaliados o número de galhas (P=0,478) e o número de ovos (P=0,423) em tomateiros plantados após a biofumigação do substrato misturado aos ovos de *M. incognita* a interação entre macerados das espécies vegetais testadas e quantidades não foi significativa. Porém, a variável quantidade dos macerados foi significativa (P<0,001). Para o número de galhas, apenas a maior quantidade (9,6g) diferiu da testemunha, obtendo-se uma redução de 68,5% do número de galhas comparado a testemunha (Figura 3A). Já para o número de ovos, as quantidades iguais ou acima a 2,4g diferiram da testemunha, sendo que os melhores resultados foram obtidos nas quantidades de 4,8g e 9,6g, causando uma redução de 69 e 82,5%, respectivamente, no número de ovos (Figura 3B).

Para a variável imobilidade dos J₂ de *M. incognita* expostos aos COVs emitidos pelos macerados de nim e mostarda misturados ao substrato e retidos na sua superfície pela cobertura plástica, a interação entre os macerados das espécies vegetais e quantidades dos macerados não foi significativa (P= 0,056). Porém, a variável quantidade foi significativa (P<0,001). Todas as quantidades testadas diferiram da testemunha (concentração igual a zero). No entanto, a porcentagem de imobilidade (98 – 100%) foi ainda maior quando foram utilizadas quantidades iguais ou acima a 2,4g (Figura 4A). Entretanto, a interação entre espécies vegetais testadas e quantidades dos macerados foi significativa quando avaliou-se a mortalidade dos J₂ de *M. incognita* (P= 0,004). Para a mostarda, todas as quantidades testadas diferiram da testemunha e atingiram níveis semelhantes de mortalidade (87 – 97%) dos J₂ de *M. incognita*. Já para o nim as maiores porcentagens de mortalidade foram obtidas nas quantidades iguais ou acima a 2,4g do macerado. As duas plantas testadas diferiram quando utilizou-se a concentração de 1,2g, sendo que, o macerado de mostarda proporcionou maior taxa de mortalidade (90%) em comparação com o macerado de nim (51%) (Figura 4B).

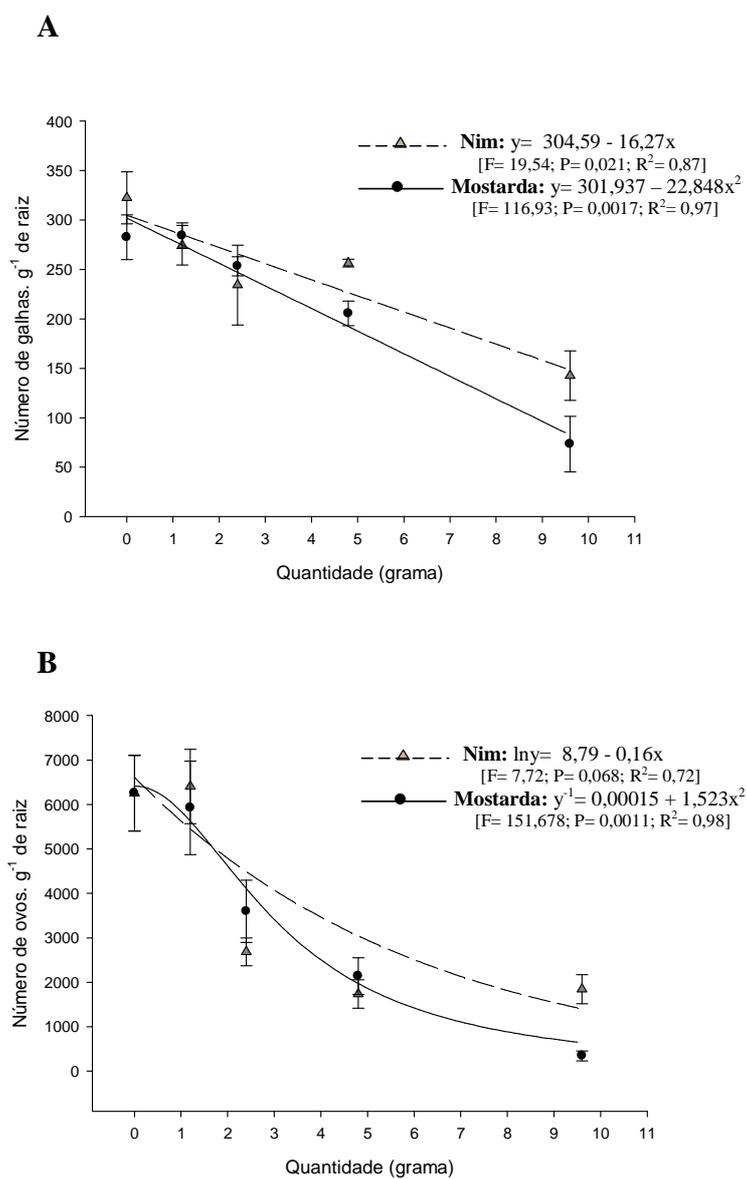


Figura 3. Número de galhas (A) e número de ovos (B) de *Meloidogyne incognita* em raízes de tomateiro resultantes da exposição de ovos de *M. incognita* no solo nas diferentes doses de macerados fresco de nim e mostarda incorporadas ao

substrato em copos e posteriormente fechados hermeticamente. Barras indicam erro padrão da média.

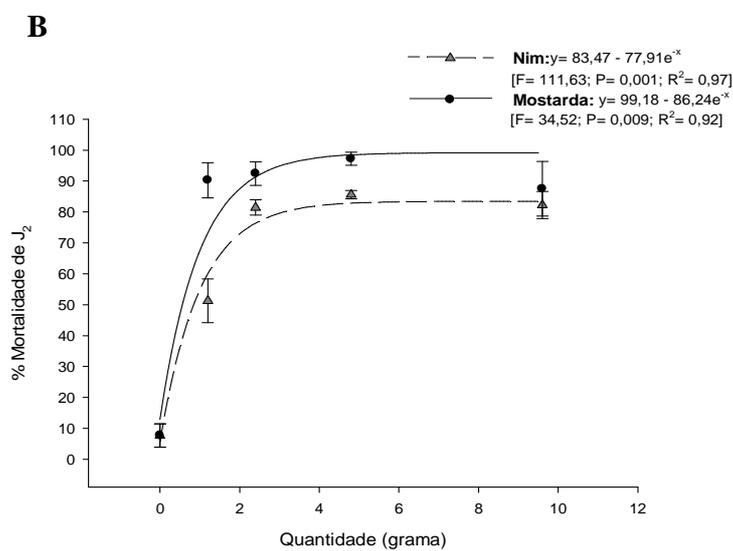
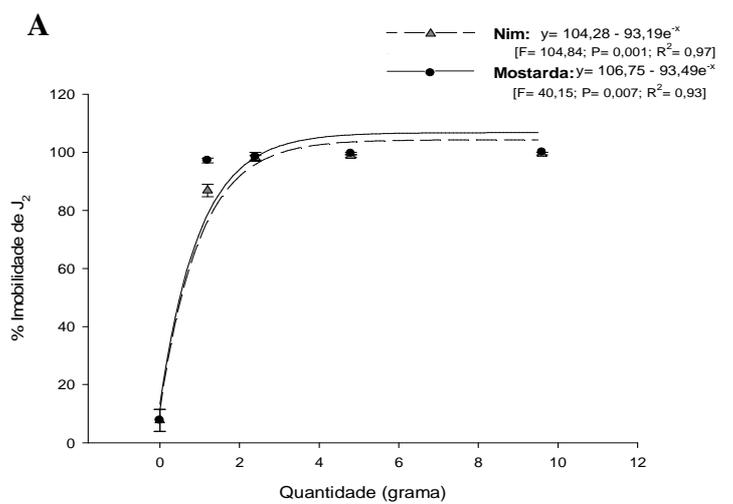


Figura 4. Porcentual de imobilidade (A) e mortalidade (B) de juvenis de segundo estágio (J_2) de *Meloidogyne incognita* devido à exposição dos J_2 aos compostos orgânicos voláteis emitidos por cinco doses do macerado fresco de folhas de nim e mostarda incorporadas ao solo em copos fechados hermeticamente. Barras indicam erro padrão da média.

DISCUSSÃO

As curvas de progresso da imobilidade e mortalidade (Figuras 1A e B) confirmaram que a exposição por 24 horas dos J_2 é suficiente para avaliar a toxicidade de COVs emitidos por mostarda e nim, cujos tempos de exposição também tem sido empregado na avaliação de COVs emitidos por colônias fúngicas e bacterianas (Campos *et al.*, 2010; Gu *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2010). No entanto, exposições dos J_2 a períodos de tempo inferiores a 24 horas já podem imobilizar os J_2 (Figura 1A), indicando a possibilidade deste efeito atrasar o período de tempo requerido para o nematoide completar seu ciclo de vida pois ele precisa se movimentar e ser atraído para o local de penetração. Porém, neste trabalho reduções significativas no número de galhas causadas pelos J_2 expostos aos COVs de mostarda e nim só foram diferentes da testemunha a partir de 24 e 48 horas de exposição, respectivamente, confirmando como efeito nematicida os efeitos tóxicos avaliados pela imobilidade e mortalidade nesses períodos de exposição. O maior tempo de exposição requerido para o macerado de nim reduzir o número de galhas concorda com a baixa mortalidade dos J_2 provocada pelos COVs do macerado de nim em relação ao macerado de mostarda no tempo de 24 horas. Redução na infectividade de J_2 de *M. incognita* após exposição aos COVs de fungos e bactérias por 24 horas ainda precisa ser melhor pesquisado, porém, Freire *et al.* (2012) observaram redução progressiva a partir desse período de exposição dos J_2 aos COVs de *Fusarium oxysporum*.

Embora a menor redução de galhas causada pelos J_2 expostos aos COVs de nim comparado aqueles expostos aos de mostarda comprove a menor taxa de

mortalidade (Figura 1B), esta diferença não foi tão marcante na reprodução (número de ovos) (Figura 2B), o que indica que processos fisiológicos no corpo do J₂ e eventos envolvidos na infectividade foram diferentemente afetados pelos COVs das duas plantas. De fato, COVs emitidos por nim e mostarda têm composições diferentes, destacando-se os isotiocianatos presentes na mostarda e ausentes no nim (Zeringue & Bhatnagar, 1994; Smolinska & Horbowicz, 1999) os quais podem ter modos de ação diferentes tanto no corpo do J₂ como no processo de infecção do hospedeiro.

A toxicidade *in vitro* de COVs emitidos por espécies de brássicas também já foi relatada contra os fungos *Pythium ultimum* e *Rhizoctonia solani* (Charron and Sams, 1999), *Sclerotinia sclerotiorum* (Ojaghian *et al.*, 2012), e *Fusarium sambucinum* (Mayton *et al.*, 1996), empregando tempos de exposição das colônias fúngicas aos COVs de 2, 5 e 7 dias.

A redução do número de galhas e de ovos nos tomateiros crescidos nos copos com substrato misturado com ovos de *M. incognita* e com o macerado vegetal após a retirada da cobertura plástica, mostrou o efeito tóxico dos COVs dos macerados de nim e mostarda (Figuras 3A e B) corroborando com resultados alcançados por Javed *et al.* (2007) e Neves *et al.* (2007) em que misturaram também o tecido vegetal triturado ao solo. Segundo Roubtsova *et al.* (2007), para que a biofumigação seja eficaz é necessário uma mistura completa e uniforme do material vegetal através do perfil do solo onde ocorrem os nematoides alvo. A biofumigação com brássicas em combinação com a solarização mostrou resultados positivos no controle do fungo *Pyrenochaeta lycopersici* e do nematoide *Meloidogyne* spp em tomateiro sob condições de casa de vegetação (Morra *et al.*, 2012). Wang *et al.* (2009) quantificaram a produção dos compostos voláteis sulfeto de metila e dissulfeto de dimetila emitidos a partir da incorporação ao solo de materiais vegetais, principalmente brássicas, e verificou que a eficácia contra *Verticillium dahliae*, *Fusarium* e

Tylenchulus semipenetrans foi correlacionada com a elevada concentração desses voláteis.

A toxicidade dos macerados de folhas frescas de nim e mostarda a *M. incognita* no ensaio aqui relatado, também, foi devida aos COVs emitidos pelo macerado somando-se às moléculas não voláteis também liberadas pelo tecido vegetal. De fato, sabe-se que o nim produz a azadiractina a qual é uma substância não volátil com comprovada ação nematicida (Lynn *et al.*, 2010).

O aumento da imobilidade e mortalidade de J₂ de *M. incognita* pelos COVs liberados pelas quantidades de macerados de nim e mostarda e retidos entre o substrato e a cobertura plástica (Figuras 4A e B), indica que tais compostos são tóxicos ao nematóide. Desta forma, os resultados deste ensaio sugerem que parte dos COVs tóxicos a fitonematoides emitidos pelas quantidades de macerados de nim e mostarda é perdida em solo descoberto incorporado com esses vegetais o que diminui o efeito do biofumigante contra nematoides. Lord *et al.* (2011) observaram maior efeito da incorporação de brássicas no controle do nematoide *Globodera pallida* com cobertura plástica comparado com incorporação vegetal sem cobertura e correlacionou a toxicidade ao nematoide com a presença do isotiocianato que é volátil e é perdido em solo descoberto. No uso do nematicida Dazomet que tem o isotiocianato de metila como princípio ativo, recomenda-se a cobertura plástica após sua aplicação (Agrofit, 2013). Outro fator que pode aumentar a atividade supressiva a patógenos em geral, e principalmente, a fitonematoides é a irrigação após a incorporação do material vegetal triturado. Embora não se tem comprovação da eficácia deste procedimento no campo, a exposição de água aos COVs emitidos pelo fungo *Muscodor albus* tornou-a tóxica a *M. incognita* (Grimme *et al.*, 2007). Vale destacar que substâncias polares a semelhança da água estão presentes em COVs de nim e mostarda como, por exemplo, etanol, acetona e isômeros de metil-butanol (dados não incluídos), o que conduz a sua

diluição na água de irrigação. Desta forma, a irrigação após a incorporação do material vegetal triturado promoverá a retenção da substância tóxica na água do solo por mais tempo, podendo então alcançar o tempo de exposição adequado para imobilizar ou matar os fitonematoides. Matthiessen *et al.* (2004) e Morra & Kirkegaard (2002) também sugerem como fatores que aumentam a atividade supressiva da biofumigação a trituração bem feita do material vegetal antes da incorporação ao solo e umidade suficiente do solo no momento da incorporação dos tecidos.

Neste trabalho foi demonstrado o efeito tóxico dos COVs de nim e mostarda em função do tempo de exposição do nematoide e da quantidade de tecido vegetal na biofumigação contra *M. incognita*, concluindo que a mistura ao substrato do macerado de nim ou mostarda triturado e os COVs emitidos para o ar tem efeitos nematicidas a MI bem como as exposições dos J₂ a eles a partir de 24 horas. Isso representa um passo importante em estudos futuros sobre manejo de fitonematoides.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos apoios financeiros prestados pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

LITERATURA CITADA

- Agrofit. 2013. 2013 Sistema de agrotóxicos fitossanitários. Online. http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons.
- Ahmad, Y., and A. Ghaffar. 2007. Soil solarization: A management practice for mycotoxins in corn. *Pakistan Journal of Botany* 39:2215-2223.
- Bones, A. M., and J. T. Rossiter. 2006. The enzymic and chemically induced decomposition of glucosinolates. *Phytochemistry* 67:1053-1067.
- Campos, V. P., R. S. C. Pinho, and E. S. Freire. 2010. Volatiles produced by interacting microorganisms potentially useful for the control of plant pathogens. *Ciência e Agrotecnologia* 34:525-535.
- Charron, C. S., and C. E. Sams. 1999. Inhibition of *Pythium ultimum* and *Rhizoctonia solani* by shredded leaves of Brassica species. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 124:462-467.
- Chitwood, B. G. 1951. Root-Knot nematodes. II - Quantitative relation of the root-knot nematode - *Meloidogyne hapla* Chitwood, 1949 with tomatoes, onions and lima beans *Plant and soil* 3:47-50.
- Ferraz, L. C. C. B., and M. G. C. Churata-Masca. 1983. Comportamento de cultivares de tomateiro (*Lycopersicon esculentum*, Mill) de crescimento determinado em relação ao nematóide *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1949. *Científica* 11:87-91.
- Freire, E. S., V. P. Campos, R. S. C. Pinho, D. F. Oliveira, M. R. Faria, A. M. Pohlit, N. P. Noberto, E. L. Rezende, L. H. Pfenning, and J. C. T. Silva. 2012. Volatile Substances Produced by *Fusarium oxysporum* from Coffee Rhizosphere and Other Microbes affect *Meloidogyne incognita* and *Arthrobotrys conoides*. *Journal of Nematology* 44:321-328.
- Gray, C. M., R. K. Monson, and N. Fierer. 2010. Emissions of volatile organic compounds during the decomposition of plant litter. *Journal of Geophysical Research-Biogeosciences* 115:1-9.

- Grimme, E., N. K. Zidack, R. A. Sikora, G. A. Strobel, and B. J. Jacobsen. 2007. Comparison of *Muscodor albus* volatiles with a biorational mixture for control of seedling diseases of sugar beet and root-knot nematode on tomato. *Plant Disease* 91:220-225.
- Gu, Y. Q., M. H. Mo, J. P. Zhou, C. S. Zou, and K. Q. Zhang. 2007. Evaluation and identification of potential organic nematicidal volatiles from soil bacteria. *Soil Biology & Biochemistry* 39:2567-2575.
- Huang, Y., C. K. Xu, L. Ma, K. Q. Zhang, C. Q. Duan, and M. H. Mo. 2010. Characterisation of volatiles produced from *Bacillus megaterium* YFM3.25 and their nematicidal activity against *Meloidogyne incognita*. *European Journal of Plant Pathology* 126:417-422.
- Hussey, R. S. , and K. R. Barker. 1973. A comparison of methods for collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. *Plant Disease Reporter* 57:1025-1028.
- Javed, N. , S. R. Gowen, M. Inam-Ulhaq, and S. A. Anwar. 2007. Protective and curative effect of neem (*Azadirachta indica*) formulations on the development of root-knot nematode *Meloidogyne javanica* in roots of tomato plants. *Crop Protection* 26:530-534.
- Lazzeri, L., R. Tacconi, and S. Palmieri. 1993. In Vitro Activity of Some Glucosinolates and their Reaction Products toward a Population of the Nematode *Heterodera schachtii*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41:825-829.
- Lord, J. S., L. Lazzeri, H. J. Atkinson, and P. E. Urwin. 2011. Biofumigation for Control of Pale Potato Cyst Nematodes: Activity of Brassica Leaf Extracts and Green Manures on *Globodera pallida* in Vitro and in Soil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59:7882-7890.
- Lordello, L. G. E. 1981. Nematóides das plantas cultivadas. São Paulo: Nobel, 314p.
- Lynn, O. M., W. G. Song, J. K. Shim, J. E. Kim, and K. Y. Lee. 2010. Effects of Azadirachtin and Neem-based Formulations for the Control of Sweetpotato Whitefly and Root-knot Nematode. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry* 53:598-604.

- Matthiessen, J. N., B. Warton, and M. A. Schackleton. 2004. The importance of plant maceration and water addition in achieving high brassica-derived isothiocyanate levels in soil. *Agroindustria* 3:277-280.
- Mayton, H. S., C. Olivier, S. F. Vaughn, and R. Loria. 1996. Correlation of fungicidal activity of Brassica species with allyl isothiocyanate production in macerated leaf tissue. *Phytopathology* 86:267-271.
- Morra, M. J., and J. A. Kirkegaard. 2002. Isothiocyanate release from soil-incorporated Brassica tissues. *Soil Biology & Biochemistry* 34:1683-1690.
- Moura, L., I. Queiroz, I. Mourao, L. M. Brito, and J. Duclos. 2012. Effectiveness of Soil Solarization and Biofumigation for the Control of Corky Root and Root-Knot Nematode *Meloidogyne* spp. on Tomato. In: Xxviii International Horticultural Congress on Science and Horticulture for People. *Acta Horticulturae* 933:399-405.
- Neves, W. S., L. G. Freitas, M. M. Coutinho, D. F. Parreira, S. Ferraz, and M. D. Costa. 2007. Biofumigação do solo com espécies de brássicas para o controle de *Meloidogyne javanica*. *Nematologia Brasileira* 31:195-201.
- Ojaghian, M. R., H. Jiang, G. L. Xie, Z. Q. Cui, J. Z. Zhang, and B. Li. 2012. In vitro Biofumigation of Brassica Tissues Against Potato Stem Rot Caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Pathology Journal* 28:185-190.
- Roubtsova, T., J. A. Lopez-Perez, S. Edwards, and A. Ploeg. 2007. Effect of broccoli (*Brassica oleracea*) tissue, incorporated at different depths in a soil column, on *Meloidogyne incognita*. *Journal of Nematology* 39:111-117.
- Smolinska, U., and M. Horbowicz. 1999. Fungicidal activity of volatiles from selected cruciferous plants against resting propagules of soil-borne fungal pathogens. *Journal of Phytopathology* 147:119-124.
- Stapleton, J. J., and R. A. Duncan. 1998. Soil disinfestation with cruciferous amendments and sublethal heating: effects on *Meloidogyne incognita*, *Sclerotium rolfsii* and *Pythium ultimum*. *Plant Pathology* 47:737-742.

- Trudgill, D. L., and V. C. Block. 2001. Apomictic, polyphagous rootknot nematodes: exceptionally successful and damaging biotrophic root pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 39:53-77.
- Wang, D., C. Rosen, L. Kinkel, A. Cao, N. Tharayil, and J. Gerik. 2009. Production of methyl sulfide and dimethyl disulfide from soil-incorporated plant materials and implications for controlling soilborne pathogens. *Plant and Soil* 324:185-197.
- Zasada, I. A., and H. Ferris. 2003. Sensitivity of *Meloidogyne javanica* and *Tylenchulus semipenetrans* to Isothiocyanates in Laboratory Assays. *Nematology* 93:747-750.
- Zeringue, H. J., and D. Bhatnagar. 1994. Effects of neem leaf volatiles on submerged cultures of aflatoxigenic *Aspergillus-parasiticus*. *Applied and Environmental Microbiology* 60:3543-3547.