



PAULO VICTOR MAGALHÃES PACHECO

**THE ROLE OF VOLATILE ORGANIC COMPOUNDS
EMITTED BY NEMATOPHAGOUS FUNGI IN THE
INTERACTION WITH *Meloidogyne* spp.**

**LAVRAS – MG
2023**

PAULO VICTOR MAGALHÃES PACHECO

**THE ROLE OF VOLATILE ORGANIC COMPOUNDS EMITTED BY
NEMATOPHAGOUS FUNGI IN THE INTERACTION WITH *Meloidogyne* spp.**

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.

Prof. Dr. Vicente Paulo Campos
Orientador

Dr. Willian César Terra
Coorientador

**LAVRAS – MG
2023**

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

Pacheco, Paulo Victor Magalhães.

The role of volatile organic compounds emitted by
nematophagous fungi in the interaction with *Meloidogyne* spp. /
Paulo Victor Magalhães Pacheco. - 2022.

81 p. : il.

Orientador(a): Vicente Paulo Campos.

Coorientador(a): Willian César Terra.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2022.

Bibliografia.

1. Nematoides parasitas de plantas. 2. Compostos orgânico
voláteis. 3. Fungos nematófagos. I. Campos, Vicente Paulo. II.
Terra, Willian César. III. Título.

PAULO VICTOR MAGALHÃES PACHECO

**THE ROLE OF VOLATILE ORGANIC COMPOUNDS EMITTED BY
NEMATOPHAGOUS FUNGI IN THE INTERACTION WITH *Meloidogyne* spp.**

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.

APROVADO em 30 de setembro de 2022.

Dr. Eduardo Souza Freire – UniRV
Dr. Leandro Grassi de Freitas – UFV
Dra. Regina Cássia Ferreira Ribeiro – Unimontes
Dra. Sônia Maria de Lima Salgado – Epamig

Prof. Dr. Vicente Paulo Campos
Orientador

**LAVRAS – MG
2023**

À Deus, por todas as bênçãos
Ofereço

Aos meus pais Nozinha e Paulo
Aos meus irmãos Felipe, Leonardo e Livia
As minhas avós Dete e Deusa
A tia Socorro

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Fitopatologia (DFP), pela oportunidade concedida para realização do doutorado.

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

Ao professor Dr. Vicente Paulo Campos pela orientação, paciência, confiança, dedicação e ensinamentos que foram de grande relevância para a realização deste trabalho e meu crescimento profissional.

Ao Dr. Willian César Terra pela amizade, apoio e ensinamentos transmitidos, que foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Fitonematoides da UFLA Juliana, Maysa, Letícia, Daniele, Larissa e Tarlei pela amizade, companheirismo diário, boas risadas e pela imensa ajuda prestada.

RESUMO GERAL

O potencial dos fungos nematófagos como agentes de controle biológico dos nematoides parasitas de plantas (NPPs) tem sido amplamente estudado. No entanto, há poucas informações sobre o efeito dos compostos orgânicos voláteis (COVs) produzidos por estes fungos sobre os NPPs. Sendo assim, esse trabalho teve como objetivo avaliar o efeito dos COVs emitidos por fungos nematófagos na interação trófica com as diferentes fases do ciclo de vida (ovos e juvenis) de *Meloidogyne* sp. (nematóide de galhas). No primeiro artigo, foi desvendado o papel dos COVs emitidos pelo fungo nematófago *Pochonia chlamydosporia* (Pc-10) na interação trófica com *M. incognita*. Em testes *in vitro* os COVs emitidos por Pc-10 reduziram ($p < 0,05$) a porcentagem de juvenis de segundo estágio (J2) de *M. incognita* eclodidos, quando comparado a testemunha. Ademais, ensaios *in vitro* e *in planta* demonstraram que PC-10 emite COVs atrativos aos J2 de *M. incognita*. Por meio de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa o composto 1,4-dimetoxibenzeno foi identificado com o componente majoritário do volatiloma de Pc-10. Em ensaios *in vitro* e *in planta*, esse composto apresentou atividade nematicida fumigante e não fumigante contra *M. incognita*, além de atrair os J2. No segundo artigo, em testes *in vitro* foi demonstrado que os COVs produzidos por *P. chlamydosporia*, *Purpureocillium lilacinum*, *Arthrobotrys conoides* e *Duddingtonia flagrans* reduzem ($p < 0,05$) a eclosão dos J2 de *M. javanica*. Além disso, os COVs emitidos por *P. chlamydosporia*, *P. lilacinum* e *A. conoides* atraíram ($p < 0,05$) os J2 de *M. javanica*. Por outro lado, COVs de *D. flagrans* repeliram ($p < 0,05$) o nematóide. No volatiloma desses fungos foram identificados 22 COVs. Por meio da análise de componentes principais (PCA) dos voláteis emitidos pelos fungos, três conjuntos diferentes foram formados, sendo um composto por *P. lilacinum* e *A. conoides* e outros dois por *D. flagrans* e *P. chlamydosporia*, respectivamente. No ensaio em casa de vegetação, os COVs emitidos por *P. lilacinum* e o composto 1,4-dimetoxibenzeno controlaram ($p < 0,05$) *M. javanica* e não foram tóxicos para as plantas de jiló (*Solanum aethiopicum*).

Palavras-chave: Compostos orgânico voláteis. Fungos nematófagos. Interação trófica. Nematoides parasitas de plantas.

ABSTRACT

The potential of nematophagous fungi as biological control agents of plant-parasitic nematodes (PPNs) has been extensively studied. However, there is little information about the role of volatile organic compounds (VOCs) produced by nematophagous fungi in the interaction with PPNs. Therefore, this work aimed to evaluate the effect of VOCs emitted by nematophagous fungi on the trophic interaction with the different stages of the life cycle (eggs and juveniles) of *Meloidogyne* sp. (root-knot nematodes). In the first article, the role of VOCs emitted by the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* (Pc-10) in the trophic interaction with *M. incognita* was revealed. The VOCs emitted by *P. chlamydosporia* reduced *M. incognita* eggs hatching and also attracted *M. incognita* second-stage juveniles (J2). The 1,4-dimethoxybenzene compound is the major component of the volatiloma of the *P. chlamydosporia* strain Pc-10. The 1,4-dimethoxybenzene showed fumigant and non-fumigant nematicide activity against *M. incognita*, in addition to attracting the *M. incognita* J2. In the second article, it was demonstrated that VOCs produced by nematophagous fungi (*P. chlamydosporia*, *Purpureocillium lilacinum*, *Arthrobotrys conoides* and *Duddingtonia fragrans*) reduced *M. javanica* eggs hatching. In addition, VOCs emitted by *P. chlamydosporia*, *P. lilacinum* and *A. conoides* attracted *M. javanica* J2. On the other hand, VOCs from *D. fragrans* repelled the nematode. Twenty-two VOCs were identified from the volatiloma of these fungi. The fungi were separated into three different sets by principal component analysis (PCA). One set comprising *P. lilacinum* and *A. conoides* and two other sets with *D. fragrans* and *P. chlamydosporia*, respectively. In the greenhouse test, the VOCs emitted by *P. lilacinum* and the compound 1,4-dimethoxybenzene controlled *M. javanica* and were not toxic to the eggplant plants.

Keywords: Nematophagous fungi. Plant-parasitic nematodes. Trophic interaction. Volatile organic compounds

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	11
1 INTRODUÇÃO GERAL	11
2 REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1 <i>Meloidogyne</i> spp.	12
2.2 Fungos Nematófagos	13
2.3 Compostos orgânicos voláteis microbianos	14
2.3.1 Compostos orgânicos voláteis emitidos por fungos que promovem o crescimento de plantas	15
2.3.2 Compostos orgânicos voláteis emitidos por fungos contra fitopatógenos	16
REFERÊNCIAS	18
SEGUNDA PARTE	26
ARTIGO 1 Attraction and toxicity: Ways volatile organic compounds released by <i>Pochonia chlamydosporia</i> affect <i>Meloidogyne incognita</i>	26
ABSTRACT	27
1 INTRODUCTION	28
2 MATERIAL AND METHODS	29
2.1 Obtaining the inoculum of <i>M. incognita</i>	29
2.2 Obtaining the inoculum of <i>P. chlamydosporia</i> (Pc-10)	30
2.3 <i>Meloidogyne incognita</i> egg hatching under exposure to VOCs emitted by Pc-10	30
2.4 Chemotaxis of <i>M. incognita</i> towards VOCs emitted by Pc-10	31
2.5 Characterization of volatile organic compounds (VOCs) emitted by Pc-10 by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)	32
2.6 <i>Meloidogyne incognita</i> egg-hatching under the effect of 1,4-dimethoxybenzene	33
2.7 Lethal concentration (LC₅₀) of 1,4-dimethoxybenzene against <i>M. incognita</i>	34
2.8 Fumigant activity of 1,4-dimethoxybenzene against <i>M. incognita</i>	34
2.9 Chemotaxis of <i>M. incognita</i> towards 1,4-dimethoxybenzene	35

2.10 Chemotaxis of <i>M. incognita</i> towards VOCs emitted by Pc-10 and 1,4-dimethoxybenzene	35
2.11 Data analysis	37
3 RESULTS	38
3.1 <i>Meloidogyne incognita</i> egg hatching under exposure to VOCs emitted by Pc-10.....	38
3.2 Chemotaxis of <i>M. incognita</i> towards VOCs emitted by Pc-10.....	38
3.3 Characterization of volatile organic compounds (VOCs) emitted by Pc-10 by GC–MS	39
3.4 <i>Meloidogyne incognita</i> egg-hatching under exposure to 1,4-dimethoxybenzene	39
3.5 Lethal concentration (LC ₅₀) of 1,4-dimethoxybenzene against <i>M. incognita</i>	40
3.6 Fumigant activity of 1,4-dimethoxybenzene against <i>M. incognita</i>	41
3.7 Chemotaxis of <i>M. incognita</i> towards 1,4-dimethoxybenzene.....	43
3.8 Chemotaxis of <i>M. incognita</i> towards VOCs emitted by Pc-10 and 1,4-dimethoxybenzene	44
4 DISCUSSION.....	45
5 CONCLUSIONS.....	47
ACKNOWLEDGEMENTS	47
REFERENCES	48
TERCEIRA PARTE	55
ARTIGO 2 Fungos nematófagos emitem compostos orgânicos voláteis que interagem com os ovos e juvenis de segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne javanica</i>	55
RESUMO.....	56
ABSTRACT	57
1 INTRODUÇÃO	58
2 MATERIAL E MÉTODOS	59
2.1 Obtenção do inóculo de <i>M. javanica</i>	59
2.2 Obtenção do inóculo dos fungos nematófagos	59
2.3 Quimiotaxia de <i>M. javanica</i> aos COVs emitidos por fungos nematófagos	60
2.4 Toxicidade dos COVs emitidos por fungos nematófagos aos ovos de <i>M. javanica</i>	61

2.5 Caracterização dos COVs emitidos por <i>P. chlamydosporia</i> , <i>P. lilacinum</i> , <i>A. conoides</i> e <i>D. flagrans</i> por cromatografia gasosa - espectrometria de massa (CG-EM).....	61
2.6 Análise de componentes principais (PCA)	62
2.7 Potenciais de 1,4-dimetoxibenzeno e dos COVs emitidos por <i>P. chlamydosporia</i> e <i>P. lilacinum</i> no controle de <i>M. javanica</i> em casa de vegetação	62
2.8 Análise estatística.....	63
3 RESULTADOS	64
3.1 Quimiotaxia de <i>M. javanica</i> para os COVs emitidos por fungos nematófagos.....	64
3.2 Toxicidade dos COVs emitidos por fungos nematófagos aos ovos de <i>M. javanica</i>	66
3.3 Caracterização dos COVs emitidos por <i>P. chlamydosporia</i> , <i>P. lilacinum</i> , <i>A. conoides</i> e <i>D. flagrans</i> por CG-EM.....	67
3.4 Análise de componentes principais (PCA)	67
3.5 Potencial de 1,4-dimetoxibenzeno e COVs emitidos por <i>P. chlamydosporia</i> e <i>P. lilacinum</i> no controle de <i>M. javanica</i> em casa de vegetação	69
4 DISCUSSÃO	70
5 CONCLUSÕES.....	73
AGRADECIMENTOS	73
REFERÊNCIAS	76

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO GERAL

Globalmente, os nematoides parasitas de plantas (NPPs) causam perdas estimadas em aproximadamente US\$ 157 bilhões e os nematoides de galhas (*Meloidogyne* spp.) são os responsáveis pela maior parte desses prejuízos (Abad et al., 2008). É provável que a estimativa dos prejuízos causados por NPPs no mundo esteja subestimada (Poveda et al., 2020). Muitos produtores desconhecem a presença dos nematoides na área e os sintomas resultantes do seu ataque são geralmente inespecíficos, o que dificulta correlacionar as perdas de produtividade ao parasitismo do nematoide (Jones et al., 2013; Siddique e Grundler, 2018; Poveda et al., 2020). Dentre os nematoides das galhas, *Meloidogyne javanica*, *M. incognita* e *M. arenaria* são as principais espécies tropicais e *M. hapla* é a principal espécie de clima temperado (Jones et al., 2013; Cheng et al., 2017; Cepulytè et al., 2018). Os nematoides de galhas são cosmopolitas, infectam as raízes de quase todas as plantas cultivadas, apresentam alta taxa reprodutiva e podem ter um sinergismo com outros patógenos do solo (Vos et al., 2013). Assim, manter estes patógenos de solo abaixo do nível de prejuízo econômico é uma tarefa complexa e desafiadora em áreas infestadas. Além disso, vários nematicidas químicos fumigantes (dentre eles o brometo de metila) e não fumigantes (dentre eles o aldicarb) foram banidos, por serem altamente prejudiciais a organismos não alvos e ao meio ambiente (Wram e Zasada, 2019; Desaegeer et al., 2020; Schleker et al., 2022).

Atualmente, há um interesse por métodos de manejo de NPPs que priorizem a segurança ambiental e a saúde pública. Dentro do manejo integrado de pragas, o controle biológico dos NPPs com fungos nematófagos se destaca como uma alternativa sustentável e viável (Silva et al., 2018; Francisco et al., 2021). Os fungos nematófagos, são inimigos naturais dos nematoides que podem capturar, matar e digerir o corpo dos nematoides (Nordbring-Hertz et al., 2011). Esses fungos ocorrem em todos os tipos de solo, mas se diferenciam na sua capacidade saprofítica e parasitária (Nordbring-Hertz et al., 2011). No entanto, as informações sobre a ecologia química dos compostos orgânicos voláteis (COVs) produzidos pelos fungos nematófagos sobre os NPPs ainda são escassas. Os COVs podem ter efeito sobre vários NPPs (Campos et al., 2010; Terra et al., 2018; Deng et al., 2022). O efeito desses COVs nos diferentes estádios do ciclo de vida dos NPPs, a caracterização dos compostos voláteis e o efeito isolado ou em misturas desses compostos precisam ser mais bem explorados para que haja uma melhor compreensão dessa interação trófica. Com isso, essas informações auxiliarão na compreensão

de alguns processos ecológicos que envolvem os NPPs e os fungos nematófagos, além de auxiliar no posicionamento desses agentes de biocontrole com maior assertividade.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Meloidogyne* spp.

Os nematoides do gênero *Meloidogyne* são endoparasitas sedentários obrigatórios, conhecidos como nematoides de galhas, e são considerados os nematoides parasitas de plantas (NPPs) mais importantes economicamente (Jones et al., 2013). As espécies dos nematoides de galhas estão amplamente distribuídas em todo o mundo e parasitam uma infinidade de plantas (El-Sappah1 et al., 2019). Esses nematoides induzem a formação de células nutridoras (células gigantes) nos hospedeiros, por meio de secreções sintetizadas nas glândulas esofagianas (Abad et al., 2008; Bartlem et al., 2014). Nas raízes parasitadas com *Meloidogyne* sp. formam-se engrossamentos (galhas) e galhas típicas que interferem na absorção de água e nutrientes pela planta (El-Sappah1 et al., 2019, Francisco et al., 2021). As galhas resultam da hipertrofia e hiperplasia no tecido cortical adjacente ao corpo do nematoide (Ferraz e Brown, 2016, Francisco et al., 2021).

A maioria das espécies de *Meloidogyne* se reproduz assexuadamente por partenogênese meiótica (*M. chitwoodi*, *M. exigua*, *M. fallax* e *M. hapla*) ou por partenogênese mitótica (*M. arenaria*, *M. incognita* e *M. javanica*) (Tapia-Vázquez et al., 2022). No entanto, algumas espécies se reproduzem sexuadamente (*M. carolinensis*, *M. megatyla*, *M. microtyla* e *M. pini*) (Tapia-Vázquez et al., 2022).

O ciclo de vida dos nematoides de galhas é de aproximadamente 25-30 dias, sendo diretamente influenciado pelas condições ambientais (Ferraz e Brown, 2016; Jagdale et al., 2021). As fêmeas de *Meloidogyne* depositam aproximadamente 500 ovos em uma massa gelatinosa. Dentro do ovo ocorre o desenvolvimento embrionário e a formação dos juvenis de primeiro estágio (J1) e de segundo estágio (J2). Dentro do ovo também ocorre a primeira ecdise e o J1 origina o J2 (Ferraz e Brown, 2016; Jagdale et al., 2021; Rusinquet et al., 2021). O J2 (estádio infectivo) eclode dos ovos, migra no solo, seguindo gradientes quimiotáticos do hospedeiro, penetra na raiz, migra entre as células e estabelece o sítio de alimentação (Abad et al., 2008; Goto et al., 2013; Ferraz e Brown, 2016; Diyapoglu et al., 2022; Tapia-Vázquez et al., 2022). Após o estabelecimento do sítio de alimentação, os J2 perdem a mobilidade e passam por mais três ecdises formando os juvenis de terceiro e quarto estágio (J3 e J4) e os adultos

(Ferraz e Brown, 2016). Os J3 e J4 não se alimentam, pois apresentam estilete não funcional e esôfagos malformados (Abad et al., 2008; Ferraz e Brown, 2016). As fêmeas maduras recuperam a capacidade de se alimentar, adquirem um aspecto globoso e iniciam a ovoposição (Ferraz e Brown, 2016).

2.2 Fungos Nematófagos

Os fungos nematófagos são inimigos naturais dos nematoides que apresentam a capacidade de atacar os ovos, juvenis e adultos e utiliza-los como fonte nutricional. (Nordbring-Hertz et al., 2011; Al-Ani et al., 2022). Aproximadamente 700 espécies, pertencentes aos filos Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota, Zygomycota e Oomycota, já foram descritas (Li et al., 2015). Esses fungos estão presentes em diferentes ecossistemas e a maioria das espécies é parasita facultativo dos nematoides, embora alguns sejam parasitas obrigatórios (Hallmann et al., 2009). De acordo com o modo de ação, os fungos nematófagos são classificados em quatro grupos: I) predadores, II) endoparasitas, III) produtores de toxinas e IV) parasitas de ovos e fêmeas sedentárias (Liu et al., 2009; Li et al., 2015).

Os fungos endoparasitas são parasitas obrigatórios, altamente específicos com relação ao hospedeiro e raramente apresentam uma fase saprofítica, sendo exemplos deste grupo: *Catenaria anguillulae*, *Drechmeria coniospora*, *Hirsutella rhossiliensis* e *Haptoglossa* sp. (Li et al., 2015; Francisco et al., 2021). Os esporos (conídio ou zoósporo) podem ser ingeridos pelos nematoides, aderir à cutícula e/ou às estruturas sensoriais ou penetrarem diretamente pela cutícula (Braga e Araújo, 2014). Após a colonização do corpo do nematoide, estruturas reprodutivas do fungo se projetam externamente para a infecção de outros indivíduos (Soares et al., 2016; Devi, 2018; Soares et al., 2018).

Fungos predadores produzem estruturas especializadas denominadas de armadilhas para captura das formas ativas dos nematoides, ao longo das hifas, por exemplo: *Duddingtonia flagrans*, *Arthrobotrys* sp., *Dactylaria* sp., *Dactylella* sp., *Drechlerella* sp., *Monacrosporium* sp. e *Gamsylella* sp. (Francisco et al., 2021; Balbino et al., 2022). Esses fungos que capturam nematoides pertencem a um grupo monofilético da ordem *Orbiliiales* (Ascomycota) (Nordbring-Hertz et al., 2011; Li et al., 2015). As armadilhas são classificadas como hifas adesivas, redes bidimensionais e tridimensionais adesivas, nódulos adesivos, ramos adesivos, anéis constritores ou não constritores (Ferraz et al., 2012; Herrera-Estrella, et al., 2016; Soares et al., 2016). Essas estruturas podem ser formadas espontaneamente ou em resposta a estímulos químicos provenientes do nematoide, motilidade e escassez de água e/ou nutrientes (Balan e

Gerber, 1972; Jansson e Nordbring-Hertz, 1980; Nordbring-Hertz et al., 2011). Os fungos pertencentes a esse grupo possuem menor especificidade com o hospedeiro e após a captura do nematoide, as hifas penetram a cutícula, colonizando e consumindo o conteúdo corporal (Soares et al., 2016; Soares et al., 2018).

Diferentemente dos fungos predadores, os fungos parasita de ovos colonizam os ovos, cistos e fêmeas sedentárias, formando apressórios após o contato da hifa com o hospedeiro, neste grupo temos, por exemplo as espécies fúngicas *Pochonia chlamydosporia* e *Purpureocillium lilacinum* (Lopez Llorca et al., 2008; Soares et al., 2016; Devi, 2018; Francisco et al., 2021). Esses fungos são capazes de produzir enzimas hidrolíticas (proteases e quitinases) que degradam a parede do ovo, facilitando o processo infeccioso (Yang et al., 2007; Soares et al., 2018).

Fungos nematófagos também podem produzir metabolitos tóxicos voláteis e não voláteis, antes de qualquer contato físico com o nematoide, sendo o caso dos fungos: *P. lilacinum*, *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *Pleurotus ostreatus* e *Trichoderma* sp. (Estupiñan-López et al., 2018; Khan et al., 2018; Soares, et al., 2018; Francisco et al., 2021). Essas substâncias podem agir sobre diferentes estádios do ciclo de vida dos fitonematoides, atuando na quimiotaxia, na motilidade, na eclosão, no reconhecimento do hospedeiro ou até mesmo causando morte (López-Llorca et al., 2008; Wang et al., 2010; Soares et al., 2016). Após a imobilização dos nematoides, alguns fungos produtores de metabolitos tóxicos são capazes de penetrar pela cutícula e colonizar o corpo interiormente (Yang e Zhang, 2014; Soares et al., 2018).

Recentemente, foi proposto o grupo de fungos nematófagos produtores de mecanismos especiais de ataque (Liu et al., 2009; Soares et al., 2018). Esses fungos produzem estruturas que causam danos mecânicos a cutícula do nematoide, resultando em extravasamento do conteúdo interno e posteriormente as hifas colonizam por completo o corpo do nematoide. Neste grupo foram incluídos os fungos *Stropharia rugosoannulata* e *Coprinus comatus* (Luo et al., 2006, 2007; Liu et al., 2009; Soares et al., 2018).

2.3 Compostos orgânicos voláteis microbianos

Os microrganismos são capazes de sintetizar uma diversidade de compostos orgânicos voláteis (COVs) a partir de diferentes vias biossintéticas primárias e secundárias (Korpi et al., 2009). COVs são moléculas com baixo peso molecular (< 400 Da), baixo ponto de ebulição (50-260 °C), alta pressão de vapor (102 kPa a 25 °C) e com até 20 átomos de carbono (Morath

et al., 2012; Hung et al., 2015, Schmidt et al., 2015, 2016; Veselova et al., 2019, Poveda, 2021; Diyapoglu et al., 2022). Geralmente os COVs são lipossolúveis e podem atravessar as membranas biológicas livremente, sendo liberados ao meio externo, na ausência de uma barreira de difusão (Pichersky et al., 2006; Morath et al., 2012; Hung et al., 2015). Os COVs são propagados pelo solo e pela rizosfera e atuam em curtas e longas distâncias como infoquímicos (Morath et al., 2012; Veselova et al., 2019, Poveda, 2021). A porosidade do solo, o movimento da solução aquosa e o fluxo de massa de água através do perfil do solo auxiliam na difusão desses compostos (Wheatley, 2002; Hung et al., 2015; Schmidt et al., 2015; Kanchiswamy et al., 2015a; Schmidt et al., 2016).

Mais de 300 COVs já foram relatados a partir das emissões voláteis de fungos (Hung et al., 2015). No entanto, pouca atenção tem sido dada aos voláteis fúngicos e ao seu papel ecológico (Schmidt et al., 2016). A quantidade e a composição dos compostos voláteis produzidas pelos microrganismos podem ser influenciadas pela genética, estágio fisiológico do microrganismo, substrato, temperatura, pH, umidade, oxigênio e interações microbianas interespecíficas (Ezra e Strobel, 2003; Insam e Seewald, 2010; Romoli et al., 2014; Schmidt et al., 2015; Schulz-Bohm et al., 2017; Misztal et al., 2018; Wang et al., 2019; Lozano-Soria et al., 2020; Tilocca et al., 2020; Mäki et al., 2021)

Sabe-se que os COVs produzidos por microrganismos atuam como sinais de comunicação ou como uma possível excreção do excesso de compostos a base de carbono (Kai et al., 2009). Essas moléculas também estão relacionadas no estabelecimento das relações simbióticas e na distribuição dos organismos saprófitas, micorrizicos e patogênicos (Kai et al., 2009; Hung et al., 2015). Os COVs podem estar envolvidos ainda no reconhecimento, defesa e competição por hospedeiro (Hung et al., 2015; Poveda, 2021). Alguns estudos já relataram a capacidade desses compostos em controlar fitopatógenos e insetos pragas, promover o crescimento vegetal, induzir resistência sistêmica e em aumentar a tolerância das plantas ao estresse hídrico (Hung et al., 2013; Paul e Park, 2013; Naznin et al., 2014; Kanchiswamy et al., 2015a; Poveda, 2021). Os compostos voláteis também são capazes de modular o metaboloma, genoma e proteoma (Kanchiswamy et al., 2015b; Poveda, 2021).

2.3.1 Compostos orgânicos voláteis emitidos por fungos que promovem o crescimento de plantas

Os COVs produzidos por microrganismos podem promover o crescimento vegetal, modulando as vias fisiológicas e hormonais da planta para aumentar a produção de biomassa e

produtividade (Sharifi e Ryu, 2018; Tyagi et al., 2018; Poveda, 2021). Com relação aos compostos voláteis emitidos por fungos, You et al. (2022) relataram que os COVs de *Trichoderma koningiopsis* (T-51) aumentaram significativamente o tamanho e o peso das mudas de *Arabidopsis thaliana*. Sánchez-López et al. (2016) demonstraram que os fungos *Alternaria alternata*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus brasiliensis*, *Beauveria bassiana*, *Botrytis aclada*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *F. oxysporum*, *Ophiostoma ips*, *Paecilomyces clavisporus*, *Penicillium chrysogenum*, *P. digitatum*, *P. aurantiogriseum*, *Trichoderma harzianum* e *Verticillium dahliae* e as leveduras *Pichia fermentans* var. *fermentans*, *Saccharomyces cerevisiae* NA33 e *Wickerhamomyces anomalus* aumentaram o peso fresco das plantas *Arabidopsis*, em relação ao controle. No entanto, exceto *A. awamori*, *B. aclada* e *V. dahliae* não induziram a floração precoce (Sánchez-López et al., 2016). Lee et al. (2016) observaram que os COVs emitidos por nove isolados de *Trichoderma* estimularam o desenvolvimento de *A. thaliana* e de plantas de tomate. Hung et al. (2013) obtiveram resultados semelhantes com os COVs emitidos por *T. viride* promovendo o crescimento de *A. thaliana* sem o contato físico direto. Nieto-Jacobo et al. (2017) constataram que os COVs de *Trichoderma* spp. aumentaram a biomassa da parte aérea e do sistema radicular, a produção de raiz e o teor de clorofila em *A. thaliana*, quando cultivados separadamente in vitro. No entanto, alguns isolados de *Trichoderma* reduziram o comprimento da raiz primária de *A. thaliana* quando cultivados em conjunto.

2.3.2 Compostos orgânicos voláteis emitidos por fungos contra fitopatógenos

Os nematoides interagem com o ambiente reconhecendo os estímulos ambientais por meio dos órgãos sensoriais (Jones, 2002; Rasmann et al., 2012). Os COVs fúngicos também podem atrair e repelir os nematoides (Rasmann et al., 2012; Perry e Curtis, 2013). Pacheco et al. (2022) demonstram que os COVs de *P. chlamydosporia* (Pc-10) e o composto 1,4-demetoxibenzeno atraem os J2 de *M. incognita*. Hsueh et al. (2017) verificaram que *A. oligospora* produz compostos voláteis atrativos para *C. elegans*. O composto 3-metil-2-butenato de metila, proveniente de *A. oligospora*, mimetiza um feromônio sexual do nematoide (Hsueh et al., 2017). Os indivíduos adultos hermafroditas de *C. elegans* e as fêmeas adultas de *C. remanei*, *C. nigoni* e *C. afra* são atraídos fortemente, e os machos são repelidos, além de interferir no acasalamento de *C. afra* (Hsueh et al., 2017). Wang et al. (2010) observaram que substâncias voláteis de *Esteya vermicola* também participaram da atração de *B. xylophilus*. Yu et al. (2021) relataram que *C. elegans* foi atraído pelos COVs de *D. flagrans*

(CBS 349.94).

Compostos orgânicos voláteis produzidos por fungos também podem ser antagônicos aos fitopatógenos (Kaddes et al., 2019; Tilocca et al., 2020). Mulero-Aparicio et al. (2019) identificaram que *F. oxysporum* (FO12) produz COVs capazes de controlar a murcha de *Verticillium*. O fungo endofítico *Muscodor crispans* produz COVs eficazes contra vários patógenos de plantas, incluindo *Pythium ultimum*, *Phytophthora cinnamomi*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Mycosphaerella fijiensis* e *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, além de alguns patógenos humanos (Mitchell et al., 2010). Lee et al. (2009) observaram que *Oxyporus latemarginatus* EF069 produz COVs capazes de inibir o crescimento de *A. alternata*, *B. cinerea*, *C. gloeosporioides*, *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* e *Rhizoctonia solani* por micofumigação. A partir dos COVs de *O. latemarginatus* obteve-se o composto 5-pentil-196 2-furaldeído que inibiu o crescimento micelial de *B. cinerea* e *R. solani*. Moya et al. (2018) identificaram que os COVs de sete isolados de *T. harzianum* e de um isolado de *T. longibrachiatum* inibiram o crescimento micelial de *Pyrenophora teres* em até 32%.

A toxicidade dos COVs produzidos por fungos para os NPPs foi demonstrada em vários estudos (Campos et al., 2010; Tilocca et al., 2020). Os COVs podem afetar os diferentes estádios (ovos, juvenil e adulto) dos nematoides, agindo como um nematicida de contato, fumigante ou alterando o comportamento (quimiotaxia). Terra et al. (2018) observaram que acetato de 3-metilbutil e o acetato de etila, provenientes de *F. oxysporum* isoaldo 21 (Fo-21), mataram os J2 de *M. incognita* e reduziram a eclosão, além de interferir na infectividade do nematoide. Mas o acetato de 2-metilbutil reduziu o número de galhas de *M. incognita* por grama de raiz de tomateiro (Terra et al., 2018). Pacheco et al. (2022) observaram que os COVs de *P. chlamydosporia* (Pc-10) são tóxicos para os ovos de *M. incognita* e o composto 1,4-dimetoxibenzeno apresentou atividade nematicida fumigante e não fumigante contra *M. incognita*. Mei et al. (2021) verificaram a atividade nematicida dos COVs produzidos por *D. flagrans* (CBS565.50) contra *M. incognita*. Riga et al. (2008) constataram que os COVs de *M. albus* apresentaram ação nematicida e nematostática contra *M. chitwoodi*, *M. hapla*, *Paratrichodorus allius* e *Pratylenchus penetrans*. O composto volátil 6-pentil-2H-piran-2-ona isolado de *Trichoderma* sp. (YMF 1.00416) matou mais de 85% *Panagrellus redivivus*, *Caenorhabditis elegans* e *Bursaphelenchus xylophilus* (Yang et al., 2012). Liarzi et al. (2016) identificaram que os COVs secretados por *Daldinia cf. concentrica* controlou *M. javanica* em experimentos *in vitro* e em plantas de tomate.

REFERÊNCIAS

- Abad, P., Gouzy, J., Aury, J.M., Castagnone-Sereno, P., Danchin, E.G.J., et al., 2008. Genome sequence of the metazoan plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. *Nature Biotechnology* 26, 909-915. <https://doi.org/10.1038/nbt.1482>.
- Al-Ani, L.K.T., Soares, F.E.F., Sharma, A., Santos-Villalobos, S., Valdivia-Padilla, A.V., Aguilar-Marcelino, L., 2022. Strategy of nematophagous fungi in determining the activity of plant parasitic nematodes and their prospective role in sustainable agriculture. *Frontiers in Fungal Biology* 3, 863198. <https://doi.org/10.3389/ffunb.2022.863198>.
- Balan, J., Gerber, N.N., 1972. Attraction and killing of the nematode *Panagrellus redivivus* by the predacious fungus *Arthrobotrys dactyloides*. *Nematology* 18, 163-173. <https://doi.org/10.1163/187529272X00403>.
- Balbino, H.M., Gouveia, A.S., Monteiro, T.S.A., Morgan, T., Freitas, L.G., 2022. Overview of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans*. *Biocontrol Science and Technology* 32, 911-929. <https://doi.org/10.1080/09583157.2022.2094891>.
- Bartlem, D.G., Jones, M.G.K., Hammes, U.Z., 2014. Vascularization and nutrient delivery at root-knot nematode feeding sites in host roots. *Journal of Experimental Botany* 65, 1789-1798. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert415>.
- Braga, F.R., Araújo, J.V., 2014. Nematophagous fungi for biological control of gastrointestinal nematodes in domestic animals. *Applied Microbiology and Biotechnology* 98, 71-82. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5366-z>.
- Campos, V.P., Pinho, R.S.C., Freire, E.S., 2010. Volatiles produced by interacting microorganisms potentially useful for the control of plant pathogens. *Ciência e Agrotecnologia* 34, 525-535. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542010000300001>.
- Deng, X., Wang, X., Li, G., 2022. Nematicidal effects of volatile organic compounds from microorganisms and plants on plant-parasitic nematodes. *Microorganisms* 10, 1201. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10061201>.
- Devi, G., 2018. Utilization of nematode destroying fungi for management of plant-parasitic nematodes. *Biosciences Biotechnology Research Asia* 15,377-396. <http://dx.doi.org/10.13005/bbra/2642>.
- Desaeger, J., Wram, C., Zasada, I., 2020. New reduced-risk agricultural nematicides - rationale and review. *Journal of Nematology* 52, 1-16. <https://doi.org/10.21307/jofnem-2020-091>.
- Diyapoglu, A., Oner, M., Meng, M., 2022. Application potential of bacterial volatile organic compounds in the control of root-knot nematodes. *Molecules* 27, 4355. <https://doi.org/10.3390/molecules27144355>.
- El-Sappah, A.H., Islam, M.M., El-awady, H.H., Yan, S., Qi, S., Liu, J., Cheng, G.T., Liang, Y., 2019. Tomato natural resistance genes in controlling the root-knot nematode. *Genes* 10,

925. <https://doi.org/10.3390/genes10110925>.

Estupiñan-López, L., Campos, V.P., Silva Júnior, J.C., Pedroso, M.P., Terra, W.C., Silva, J.C.P., Paula, L.L., 2018. Volatile compounds produced by *Fusarium* spp. isolated from *Meloidogyne paranaensis* egg masses and corticous root tissues from coffee crops are toxic to *Meloidogyne incognita*. *Tropical Plant Pathology* 43, 183–193. <https://doi.org/10.1007/s40858-017-0202-0>.

Ezra, D., Strobel, G.A., 2003. Effect of substrate on the bioactivity of volatile antimicrobials produced by *Muscodor albus*. *Plant Science* 165, 1229-1238. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(03\)00330-3](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(03)00330-3).

Ferraz, L.C.C.B.; Brown, D.J.F. *Nematologia de plantas: fundamentos e importância*. Manaus: Norma editora, 251p, 2016.

Ferraz, S., Freitas, L.G., Lopes, E.A., Dias-Arieira, C.R. *Manejo Sustentável de Fitonematoides*. 1.ed. Viçosa: Editora UFV, 306p, 2012.

Francisco, B.G.F., Ponce, I.M., Espinosa, M.A.P., Moctezuma, A.M., López, V.E.L., 2021. Advances in the biological control of phytoparasitic nematodes via the use of nematophagous fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 37, 180. <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03151-x>.

Goto, D.B., Miyazawa, H., Mar, J.C., Sato, M., 2013. Not to be suppressed? Rethinking the host response at a root-parasite interface. *Plant Science* 213, 9-17. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2013.08.004>.

Hallmann, J., Davies, K.G., Sikora, R.A. Biological control using microbial pathogens, endophytes and antagonists. In: Perry, R.N., Moens, M., Starr, J.L. (Eds.). *Root-knot nematodes*. Wallingford: CABI Publishing, 380-411, 2009.

Herrera-Estrella, A., Casas-Flores, S., Kubicek, C.P. Nematophagous fungi. In: Esser, K., Druzhinina, I.S., Kubicek, C.P. (Eds.). *The mycota: a comprehensive treatise on fungi as experimental systems for basic and applied research*. Switzerland: Springer International Publishing, 247-268, 2016.

Hsueh, Y.P., Gronquist, M.R., Schwarz, E.M., Nath, R.D., Lee, C.H., Gharib, S., Schroeder, F.C., Sternberg, P.W., 2017. Nematophagous fungus *Arthrobotrys oligospora* mimics olfactory cues of sex and food to lure its nematode prey. *eLife* 6, e20023. <https://doi.org/10.7554/eLife.20023>.

Hung, R., Lee, S., Bennett, J.W., 2013. *Arabidopsis thaliana* as a model system for testing the effect of *Trichoderma* volatile organic compounds. *Fungal Ecology* 6, 19-26. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2012.09.005>.

Hung, R., Lee, S., Bennett, J.W., 2015. Fungal volatile organic compounds and their role in ecosystems. *Applied Microbiology and Biotechnology* 99, 3395-3405. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6494-4>.

Insam, H., Seewald, M.S.A., 2010. Volatile organic compounds (VOCs) in soils. *Biology and*

Fertility of Soils 46, 199-213. <https://doi.org/10.1007/s00374-010-0442-3>.

Jagdale, S., Rao, U., Giri, A.P., 2021. Effectors of root-knot nematodes: an arsenal for successful parasitism. *Frontiers in Plant Science* 12, 80030. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.800030>.

Jansson, H.B., Nordbring-Hertz, B., 1980. Interactions between nematophagous fungi and plant-parasitic nematodes attraction, induction of trap formation and capture. *Nematologica* 26, 383-389. <https://doi.org/10.1163/187529280X00323>.

Jones, J. Nematode sense organs. In: Lee, D.L. (Ed.). *The biology of nematodes*. London and New York: Taylor e Francis 426, 693-722, 2002.

Jones, J.T., Haegeman, A., Danchin, E.G.J., Gaur, H.S., Helder, J., Jones, M.G.K., Kikuchi, T., Manzanilla-López, R., Palomares-Rius, J.E., Wesemael, W.M.L., Perry, R.N., 2013. Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 14, 946-961. <https://doi.org/10.1111/mpp.12057>.

Kaddes, A., Fauconnier, M.L., Sassi, K., Nasraoui, B., Jijakli, M.H., 2019. Endophytic fungal volatile compounds as solution for sustainable agriculture. *Molecules* 24, 1065. <https://doi.org/10.3390/molecules24061065>.

Kai, M., Haustein, M., Molina, F., Petri, A., Scholz, B., Piechulla, B. 2009. Bacterial volatiles and their action potential. *Applied Microbiology and Biotechnology* 81, 1001-1012. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1760-3>.

Kanchiswamy, C.N., Malnoy, M., Maffei, M.E., 2015a. Chemical diversity of microbial volatiles and their potential for plant growth and productivity. *Frontiers in Plant Science* 6, 151. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00151>.

Kanchiswamy, C.N., Malnoy, M., Maffei, M.E., 2015b. Bioprospecting bacterial and fungal volatiles for sustainable agriculture. *Trends in Plant Science* 20, 206-211. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.01.004>.

Khan, M.R., Ahmad, I., Ahmad, F., 2018. Effect of pure culture and culture filtrates of *Trichoderma* species on root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* infesting tomato. *Indian Phytopathology* 71, 265-274. <https://doi.org/10.1007/s42360-018-0031-1>.

Korpi, A., Järnberg, J., Pasanen, A.L., 2009. Microbial volatile organic compounds. *Critical Reviews in Toxicology* 39, 139-193. <https://doi.org/10.1080/10408440802291497>.

Li, J., Zou, C., Xu, J., Ji, X., Niu, X., Yang, J., Huang, X., Zhang, K.Q., 2015. Molecular mechanisms of nematode-nematophagous microbe interactions: basis for biological control of plant-parasitic nematodes. *Annual Review of Phytopathology* 53, 67-95. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080614-120336>.

Lee, S.O., Kim, H.Y., Choi, G.J., Lee, H.B., Jang, K.S., Choi, Y.H., Kim, J.C., 2009. Mycofumigation with *Oxyporus latemarginatus* EF069 for control of postharvest apple decay and *Rhizoctonia* root rot on orchid. *Journal of Applied Microbiology* 106, 1213-1219. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.04087.x>.

- Lee, S., Yap, M., Behringer, G., Hung, R., Bennett, J.W., 2016. Volatile organic compounds emitted by *Trichoderma* species mediate plant growth. *Fungal Biology and Biotechnology* 3, 7. <https://doi.org/10.1186/s40694-016-0025-7>.
- Liarzi, O., Bucki, P., Miyara, S.B., Ezra, D., 2016. Bioactive volatiles from an endophytic *Daldinia cf. concentrica* isolate affect the viability of the plant parasitic nematode *Meloidogyne javanica*. *Plos One* 11, 1-17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168437>.
- Liu, X., Xiang, M., Che, Y., 2009. The living strategy of nematophagous fungi. *Mycoscience* 50, 20-25. <https://doi.org/10.1007/S10267-008-0451-3>.
- Lopez Llorca, L.V., Maciá Vicente, J.G., Jansson, H. B. Mode of action and interactions of nematophagous fungi. In: Ciancio, A., Mukerji, K.G. (Eds.). *Integrated management and biocontrol of vegetable and grain crops nematodes*. Dordrecht: Springer 2, 51-76, 2008.
- Lozano-Soria, A., Picciotti, U., Lopez-Moya, F., Lopez-Cepero, J., Porcelli, F., Lopez-Llorca, L.V., 2020. Volatile organic compounds from entomopathogenic and nematophagous fungi, repel banana black weevil (*Cosmopolites sordidus*). *Insects* 11, 509. <https://doi.org/10.3390/insects11080509>.
- Luo, H., Li, X., Li, G., Pan, Y., Zhang, K., 2006. Acanthocytes of *Stropharia rugosoannulata* function as a nematode-attacking device. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 2982-2987. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.4.2982-2987.2006>.
- Luo, H., Liu, Y., Fang, L., Li, X., Tang, N., Zhang, K., 2007. *Coprinus comatus* damages nematode cuticles mechanically with spiny balls and produces potent toxins to immobilize nematodes. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 3916-3923. <https://doi.org/10.1128/AEM.02770-06>.
- Mäki, M., Mali, T., Hellén, H., Heinonsalo, J., Lundell, T., Bäck, J., 2021. Deadwood substrate and species-species interactions determine the release of volatile organic compounds by wood-decaying fungi. *Fungal Ecology* 54, 101106. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2021.101106>.
- Mei, X., Wang, X., Li, G., 2021. Pathogenicity and volatile nematicidal metabolites from *Duddingtonia flagrans* against *Meloidogyne incognita*. *Microorganisms* 9, 2268. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9112268>.
- Misztal, P.K., Lymperopoulou, D.S., Adams, R.I., Scott, R.A., Lindow, S.E., Bruns, T., Taylor, J.W., Uehling, J., Bonito, G., Vilgalys, R., Goldstein, A.H., 2018. Emission factors of microbial volatile organic compounds from environmental bacteria and fungi. *Environmental Science & Technology* 52, 8272-8282. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b00806>.
- Mitchell, A.M., Strobel, G.A., Moore, E., Robison, R., Sears, J., 2010. Volatile antimicrobials from *Muscodor crispans*, a novel endophytic fungus. *Microbiology* 156, 270-277. <https://doi.org/10.1099/mic.0.032540-0>.
- Morath, S.U., Hung, R., Bennett, J.W., 2012. Fungal volatile organic compounds: A review with emphasis on their biotechnological potential. *Fungal Biology Reviews* 26, 73-83. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2012.07.001>.

- Moya, P., Girotti, J.R., Toledo, A.V., Sisterna, M.N., 2018. Antifungal activity of *Trichoderma* VOCs against *Pyrenophora teres*, the causal agent of barley net blotch. *Journal of Plant Protection Research* 58, 45-53. <https://doi.org/10.24425/119115>.
- Mulero-Aparicio, A., Cernava, T., Turrà, D., Schaefer, A., Pietro, A.D., López-Escudero, F.J., Trapero, A., Berg, G., 2019. The role of volatile organic compounds and rhizosphere competence in mode of action of the non-pathogenic *Fusarium oxysporum* FO12 toward *Verticillium* wilt. *Frontiers in Microbiology* 10, 1808. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01808>.
- Naznin, H.A., Kiyohara, D., Kimura, M., Miyazawa, M., Shimizu, M., Hyakumachi, M., 2014. Systemic resistance induced by volatile organic compounds emitted by plant growth-promoting fungi in *Arabidopsis thaliana*. *Plos One* 9, e86882. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086882>
- Nieto-Jacobo, M. F., Steyaert, J.M., Salazar-Badillo, F.B., Nguyen, D.V., Rostás, M., Braithwaite, M., Souza, J.T., Jimenez-Bremont, J.F., Ohkura, M., Stewart, A., Mendoza-Mendoza, A., 2017. Environmental growth conditions of *Trichoderma* spp. affects indole acetic acid derivatives, volatile organic compounds, and plant growth promotion. *Frontiers in Plant Science* 8, 102. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00102>.
- Nordbring-Hertz, B., Jansson H.B., Tunlid, A., 2011. Nematophagous fungi. *Encyclopedia of Life Sciences*. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0000374.pub3>.
- Pacheco, P.V.M., Campos, V.P., Terra, W.C., Pedroso, M.P., Paula, L.L., Silva, M.S.G., Monteiro, T.S.A., Freitas, L.G., 2022. Attraction and toxicity: Ways volatile organic compounds released by *Pochonia chlamydosporia* affect *Meloidogyne incognita*. *Microbiological Research* 255, 126925. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126925>.
- Paul, D., Park, K., 2013. Identification of volatiles produced by *Cladosporium cladosporioides* CL-1, a fungal biocontrol agent that promotes plant growth. *Sensors* 13, 13969-13977. <https://doi.org/10.3390/s131013969>.
- Perry, R.N., Curtis, R.H.C. Behaviour and sensory perception. In: Perry, R.N., Moens, M. (Eds.). *Plant Nematology*, 2nd Edition. CAB International, 246-273, 2013.
- Pichersky, E., Noel, J.P., Dudareva, N., 2006. Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. *Science* 311, 808-811. <https://doi.org/10.1126/science.1118510>.
- Poveda, J., 2021. Beneficial effects of microbial volatile organic compounds (MCOVs) in plants. *Applied Soil Ecology* 168, 104118. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2021.104118>.
- Poveda, J., Abril-Urias, P., Escobar, C., 2020. Biological control of plant-parasitic nematodes by filamentous fungi inducers of resistance: *Trichoderma*, mycorrhizal and endophytic fungi. *Frontiers in Microbiology* 11, 992. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00992>.
- Rasmann, S., Ali, J.G., Helder, J., van der Putten, W.H., 2012. Ecology and evolution of soil nematode chemotaxis. *Journal of Chemical Ecology* 38, 615-628. <https://doi.org/10.1007/s10886-012-0118-6>

- Riga, E., Lacey, L.A., Guerra, N., 2008. *Muscodor albus*, a potential biocontrol agent against plant-parasitic nematodes of economically important vegetable crops in Washington State, USA. *Biological Control* 45, 380-385. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.01.002>.
- Romoli, R., Papaleo, M.C., De Pascale, D., Tutino, M.L., Michaud, L., LoGiudice, A., Fani, R., Bartolucci, G., 2014. GC–MS volatolomic approach to study the antimicrobial activity of the antarctic bacterium *Pseudoalteromonas* sp. TB41. *Metabolomics* 10, 42-51. <https://doi.org/10.1007/s11306-013-0549-2>.
- Rusique, L., Maleita, C., Abrantes, I., Palomares-Rius, J.E., Inácio, M.L., 2021. *Meloidogyne graminicola* - A threat to rice production: review update on distribution, biology, identification, and management. *Biology* 10, 1163. <https://doi.org/10.3390/biology10111163>.
- Sánchez-López, A.M., Baslam, M., Diego, N.D., Muñoz, F.J., Bahaji, A., Almagro, G., Ricarte-Bermejo, A., García-Gómez, P., Li, J., Humplík, J.F., Novák, O., Spíchal, L., Doležal, K., Baroja-Fernández, E., Pozueta-Romero, J., 2016. Volatile compounds emitted by diverse phytopathogenic microorganisms promote plant growth and flowering through cytokinin action. *Plant, Cell and Environment* 39, 2592-2608. <https://doi.org/10.1111/pce.12759>.
- Schleker, A.S.S., Rist, M., Matera, C. et al., 2022. Mode of action of fluopyram in plant-parasitic nematodes. *Scientific Reports* 12, 11954. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-15782-7>.
- Schmidt, R., Cordovez, V., Boer, W., Raaijmakers, J., Garbeva, P., 2015. Volatile affairs in microbial interactions. *The ISME Journal* 9, 2329-2335. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.42>.
- Schmidt, R., Etalo, D.W., Jager, V., Gerards, S., Zweepers, H., Boer, W., Garbeva, P., 2016. Microbial small talk: volatiles in fungal–bacterial interactions. *Frontiers in Microbiology* 6, 1495. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01495>.
- Schulz-Bohm, K., Martín-Sánchez, L., Garbeva, P., 2017. Microbial volatiles: small molecules with an important role in intra- and inter-kingdom interactions. *Frontiers in Microbiology* 8, 2484. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02484>.
- Sharifi, R., Ryu, C.M., 2018. Revisiting bacterial volatile-mediated plant growth promotion: lessons from the past and objectives for the future. *Annals of Botany* 122, 349-358. <https://doi.org/10.1093/aob/mcy108>.
- Siddique, S., Grundler, F.M., 2018. Parasitic nematodes manipulate plant development to establish feeding sites. *Current Opinion in Microbiology* 46, 102-108. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2018.09.004>.
- Silva, J.C.P., Medeiros, F.H.V., Campos, V.P., 2018. Building soil suppressiveness against plant-parasitic nematodes. *Biocontrol Science and Technology* 28, 423-445. <https://doi.org/10.1080/09583157.2018.1460316>.
- Soares, F.E.F., Sufiate, B.L., Queiroz, J.H., 2018. Nematophagous fungi: Far beyond the endoparasite, predator and ovicidal groups. *Agriculture and Natural Resources* 52, 1-8.

<https://doi.org/10.1016/j.anres.2018.05.010>.

Soares, P.L.M., Santos, J.M., Carvalho, R.B., Barbosa, B.F.F., Martinelli, P.R.P., Paes, V.S. Controle biológico de fitonematoides com fungos nematófagos. In: Halfeld-Vieira, B.A., Marinho-Prado, J.S., Nechet, K.L., Morandi, M.A.B., Bettioli, W. (Eds). Defensivos agrícolas naturais: Uso e perspectivas. Brasília, DF: Embrapa, p.177-213, 2016.

Tapia-Vázquez, I., Montoya-Martínez, A.C., Santos-Villalobos, S.D.L., Ek-Ramos, M.J., Montesinos-Matías, R., Martínez-Anaya, C., 2022. Root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) a threat to agriculture in Mexico: biology, current control strategies, and perspectives. World Journal of Microbiology and Biotechnology 38, 26. <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03211-2>.

Terra, W.C., Campos, V.P., Martins, S.J., Costa, L.S.A.S., Silva, J.C.P., Barros, A.F., Estupiñan-López, L., Santos, T.C.N., Smant, G., Oliveira, D.F., 2018. Volatile organic molecules from *Fusarium oxysporum* strain 21 with nematicidal activity against *Meloidogyne incognita*. Crop Protection 106, 125–131. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2017.12.022>.

Tilocca, B., Cao, A., Migheli, Q., 2020. Scent of a killer: microbial volatilome and its role in the biological control of plant pathogens. Frontiers in Microbiology 11, 41. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00041>.

Tyagi, S., Mulla, S.I., Lee, K.J., Chae, J.C., Shukla, P., 2018. VOCs-mediated hormonal signaling and crosstalk with plant growth promoting microbes. Critical Reviews in Biotechnology 38, 1277-1296. <https://doi.org/10.1080/07388551.2018.1472551>.

Veselova, M.A., Plyuta, V.A., Khmel, I.A., 2019. Volatile compounds of bacterial origin: structure, biosynthesis, and biological activity. Microbiology 88, 261-274. <https://doi.org/10.1134/S0026261719030160>.

Vos, C., Schouteden, N., Tuinen, D.V., Chatagnier, O., Elsen, A., Waele, D.D., Panis, B., Gianinazzi-Pearson, V., 2013. Mycorrhiza-induced resistance against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* involves priming of defense gene responses in tomato. Soil Biology and Biochemistry 60, 45-54. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.01.013>.

Wang, C.Y., Wang, Z., Fang, Z.M., Zhang, D.L., Gu, L.J., Liu, L., Sung, C.K. 2010. Attraction of pinewood nematode to endoparasitic nematophagous fungus *Esteya vermicola*. Current Microbiology 60, 387-392. <https://doi.org/10.1007/s00284-009-9556-y>.

Wang, P., Sun, Y., Yang, L., Hu, Y., Li, J., Wang, J., Zhang, F., Liu, Y., 2019. Chemotactic responses of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* to *Streptomyces plicatus*. FEMS Microbiology Letters 366, fnz234. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnz234>.

Wheatley, R. E., 2002. The consequences of volatile organic compound mediated bacterial and fungal interactions. Antonie van Leeuwenhoek 81, 357-364. <https://doi.org/10.1023/a:1020592802234>.

Wram, C., Zasada, I.A., 2019. Short-term effects of sublethal doses of nematicides on *Meloidogyne incognita*. Phytopathology 109, 1605-1613. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-11-18-0420-R>.

- Yang, Y., Yang, E., An, Z., Liu, X., 2007. Evolution of nematode-trapping cells of predatory fungi of the Orbiliaceae based on evidence from rRNA-encoding DNA and multiprotein sequences. *The National Academy of Sciences of the USA* 104, 8379-8384. <https://doi.org/10.1073/pnas.0702770104>.
- Yang, Z., Yu, Z., Lei, L., Xia, Z., Shao, L., Zhang, K., Li, G., 2012. Nematicidal effect of volatiles produced by *Trichoderma* sp. *Journal of Asia-Pacific Entomology* 15, 647-650. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2012.08.002>.
- Yang, J., Zhang, K.Q. Biological control of plant-parasitic nematodes by nematophagous fungi. In: Zhang, K.Q., Hyde, K.D. (Eds.). *Nematode-trapping fungi*. Springer 23, 231-262, 2014.
- You, J., Li, G., Li, C., Zhu, L., Yang, H., Song, R., Gu, W., 2022. Biological control and plant growth promotion by volatile organic compounds of *Trichoderma koningiopsis* T-51. *Journal of Fungi* 8, 131. <https://doi.org/10.3390/jof8020131>.

SEGUNDA PARTE

Artigo publicado na revista Microbiological Research

(<https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126925>).

ARTIGO 1 Attraction and toxicity: Ways volatile organic compounds released by***Pochonia chlamydosporia* affect *Meloidogyne incognita***

Paulo Victor Magalhães Pacheco ^a, Vicente Paulo Campos ^a, Willian César Terra ^a, Marcio Pozzobon Pedroso ^b, Letícia Lopes de Paula ^a, Maysa Siqueira Gonçalves da Silva ^a, Thalita Suelen Avelar Monteiro ^c, Leandro Grassi de Freitas ^c.

^a Federal University of Lavras (UFLA), Department of Plant Pathology, 37200-900, Lavras, MG, Brazil. ^b Federal University of Lavras (UFLA), Department of Chemistry, 37200-900, Lavras, MG, Brazil. ^c Federal University of Viçosa (UFV), Department of Plant Pathology, 36570-900, Viçosa, MG, Brazil

ABSTRACT

The production of volatile organic compounds (VOCs) acting against plant-parasitic nematodes has been characterized in different fungi; however, the role of VOCs emitted by *Pochonia chlamydosporia* in its trophic interaction with *Meloidogyne incognita* is still unknown. The aim of this study was to determine the effects of VOCs emitted by *P. chlamydosporia* strain Pc-10 on different stages (eggs, juveniles and female) of the *M. incognita* life cycle. Exposure of *M. incognita* eggs to VOCs released by Pc-10 resulted in a reduction up to 88 % in the nematode egg hatching, when compared to the control treatments. The VOCs emitted by Pc-10 also attracted *M. incognita* second-stage juveniles (J2). Through gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), three molecules were identified from the volatiles of the strain Pc-10, with 1,4-dimethoxybenzene being the major compound. In tests performed in vitro, 1,4-dimethoxybenzene at a concentration of 1050 $\mu\text{g mL}^{-1}$ inhibited *M. incognita* egg hatching by up to 78.7 % compared to the control (0 $\mu\text{g mL}^{-1}$) and attracted *M. incognita* J2 in all concentrations evaluated (1, 10, 100, 1000, and 10000 $\mu\text{g mL}^{-1}$). The 1,4-dimethoxybenzene also showed fumigant and non-fumigant nematicidal activity against *M. incognita*. This compound presented lethal concentration for 50 % (LC50) of *M. incognita* J2 ranged from 132 to 136 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Fumigation with 1,4-dimethoxybenzene (100 mg) reduced egg hatching by up to 89 % and killed up to 86 % of *M. incognita* J2 compared to the control (0 $\mu\text{g mL}^{-1}$). In vivo, the VOCs produced by Pc-10, 1,4-dimethoxybenzene, and the combination of both (Pc-10 + 1,4-dimethoxybenzene) attracted the *M. incognita* J2, compared to the respective controls. To the best of our knowledge, this is the first report on the attraction of *M. incognita* J2 and the toxicity to eggs and J2 by VOCs from *P. chlamydosporia* in which 1,4-dimethoxybenzene is the main toxin and attractant.

Keywords: 1,4-dimethoxybenzene; attraction; biological control; nematophagous fungi; volatile organic compounds.

1 INTRODUCTION

Plant-parasitic nematodes (PPNs) cause global agricultural losses of approximately US \$ 157 billion (Abad et al., 2018). A large part of these damages is attributed to root-knot nematodes (RKNs) (*Meloidogyne* spp.), which are soil-borne pathogens with a wide range of hosts, worldwide distribution, and high reproductive capacity (Moens et al., 2009). In addition to reducing productivity by damaging the root system, the RKNs suppress the host's defenses, making the plant more susceptible to attacks by other plant pathogens (Goverse and Smart, 2014). Approximately 100 species of *Meloidogyne* have been described and *Meloidogyne incognita* is the species that affects the largest number of crops and stands out for causing yield losses in tropical, subtropical, and temperate areas (Kiewnick and Sikora, 2017; Lu et al., 2017; Sasser, 1980).

In the last few years, the search for sustainable technologies for the management of PPNS has been intensified, products based on biological control agents have been available and have aroused the interest of farmers (Cheng et al., 2017; Lu et al., 2017; Silva et al., 2018; Zhai et al., 2018). Among the biological control agents, the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* is highly efficient against PPNS and had become the active ingredient in several commercial biological products (Monteiro et al., 2020). *P. chlamydosporia* interacts with different stages of the life cycle of nematodes, parasitizing females and eggs (Freire and Bridge, 1985; Manzanilla-López et al., 2017, 2013). This fungus also promotes plant defence, mitigating the negative effects of biotic and abiotic factors (Ghahremani et al., 2019; Larriba et al., 2015; Medeiros et al., 2015; Pentimone et al., 2019). In addition, *P. chlamydosporia* promotes plant growth, is capable of colonizing the root system of several plant species endophytically, and grows in organic matter (Dalle-mole-Giaretta et al., 2015; Larriba et al., 2015, 2014; Manzanilla-López et al., 2013; Mingot-Ureta et al., 2020; Nasu et al., 2018; Pentimone et al., 2019; Zavala-Gonzalez et al., 2015).

Nematodes recognize environmental stimuli through sensory organs, such as amphids and phasmids, which guide them to the source of these stimuli (Curtis, 2008; Perry and Curtis, 2013; Rasmann et al., 2012; Tsai et al., 2020). They are attracted not only by sensory cues from plants but also from bacteria, fungi, insects, and other nematodes (Bilgrami et al., 1985; Grewal and Wright, 1992; Grewal et al., 1993; Jaffe et al., 1989; Jansson and Nordbring-Hertz, 1979; Jansson, 1982; Prot, 1980; Stirling, 2014; Wu and Duncan et al., 2020). Pioneering works have shown that nematodes are attracted to nematophagous fungi (Jansson and Nordbring-Hertz, 1979; Jansson, 1982). Recent studies have emphasized the role of volatile organic compounds

(VOCs) emitted by microorganisms in the orientation of PPNs. The endophytic fungus *Esteya vermicola* emits volatile compounds that attract the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* (Wang et al., 2010). The nematophagous fungus *Arthrobotrys oligospora* produces VOCs capable of attracting *Caenorhabditis elegans* and the methyl 3-methyl-2-butenate was identified as being responsible for this behavior (Hsueh et al., 2017). This compound mimics a sexual pheromone which strongly attracts adult hermaphroditic individuals of *C. elegans* and the adult females of *C. remanei*, *C. nigoni*, and *C. afra*, but repels the males, in addition to interfering in the mating of *C. afra* (Hsueh et al., 2017). The volatile compounds emitted by the actinomycete *Streptomyces plicatus* could influence the chemotaxis of *M. incognita* to the host (Wang et al., 2019). All seven VOCs produced by the bacterium *Pseudomonas putida* repelled *M. incognita* (Zhai et al., 2018). However, few studies are available regarding the role of volatile compounds from nematophagous fungi in the interaction with PPNs and the most studies are related to free-living nematodes (Hsueh et al., 2017; Wang et al., 2018; Wang et al., 2010).

Although *P. chlamydosporia* is one of the best-studied biological control agents, the role of the VOCs emitted by it in the interaction with PPNs is still unknown. Recently, Lozano-Soria et al. (2020) characterized the volatilome and identified that some VOCs from *P. chlamydosporia* strain 123 were repellent to the insect *Cosmopolites sordidus*. We hypothesized that the VOCs produced by *P. chlamydosporia* influence the behavior of *M. incognita* and interfere in some life-cycle stages of the nematode. Therefore, knowing the biological role of VOCs produced by this fungus will help to understand its trophic interaction with PPNs. In this study, we sought to evaluate the role of VOCs emitted by *P. chlamydosporia* and its effect on I) the *M. incognita* egg hatching and II) the attraction of *M. incognita* second-stage juveniles (J2).

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Obtaining the inoculum of *M. incognita*

Meloidogyne incognita was reared in tomato plants (*Solanum lycopersicum*), cultivar Santa Clara, in the greenhouse. The eggs were extracted from tomato roots using the technique described by Hussey and Barker (Hussey and Barker, 1973). The J2 were obtained using the Baermann funnel technique (Baermann, 1917). For the *in vitro* assays, J2 collected 48 h after the establishment of the hatching chamber were used. For the *in vivo* assays, J2 up to five days

after hatching were used. In both cases, the J2 hatched 24 h after the start of the hatching chamber were discarded.

2.2 Obtaining the inoculum of *P. chlamydosporia* (Pc-10)

Pochonia chlamydosporia strain Pc-10 (active component of the commercial product Rizotec[®]) was obtained from the collection of the Laboratory of the Biological Control of Plant-Parasitic Nematode, Department of Plant Pathology, Federal University of Viçosa, Minas Gerais State, Brazil. Strain Pc-10 was isolated from soil naturally infested with *Meloidogyne* spp., where vegetables were grown, in Viçosa, Minas Gerais State, Brazil (DalleMole-Giaretta et al., 2012). The isolate was grown in potato-dextrose-agar culture medium and kept at 28 °C, in a dark environment. For the assays using Pc-10, it was grown on KASVI[®] nutrient-agar medium (NA) for eight days under the same conditions above described.

2.3 *Meloidogyne incognita* egg hatching under exposure to VOCs emitted by Pc-10

Polystyrene two-compartmented Petri dishes (90 x 15 cm) were used. NA culture medium was poured into one compartment of the plates and a 9 mm plug of Pc-10 was placed on its surface (Figure 1). The other compartment remained empty. As a control, we used plates with NA medium and without fungus and empty plates. Next, all the plates cultured with fungus and those used as the control were incubated at 28 °C in the dark. After incubation for eight days, an aqueous suspension (5 mL) containing 5000 eggs of *M. incognita* was injected by a syringe with a needle through a hole in the lid, in the empty compartment. After removal of the needle, the hole was re-sealed with tape. The hole, 2 mm in diameter, was made on the surface of the plate lid (the side opposite the fungal culture) was used to add the eggs inside the plates without removing the lid, thus avoiding loss of VOCs emitted during the first days of fungal growth (Figure 1). The eggs were exposed to VOCs for 3 days. Then, the plates were opened, a 2 mL aliquot was taken and, the number of hatched J2 was determined. Another aliquot containing the same volume was collected and transferred to a polypropylene microtube (2 mL) that was stored under the same conditions mentioned above. After seven days, the number of hatched J2 was quantified again. The experiment was repeated twice, with seven replicates per treatment.



Figure 1: Scheme used to evaluate the *M. incognita* egg hatching after eggs exposure to VOCs released by *P. chlamydosporia* strain Pc-10. The fungus was grown for 8 days on one side of a two-compartment Petri dishes (90 mm). After this period, 5000 eggs of *M. incognita* were placed, with the aid of a syringe with a needle, on the other side of the plate. Eggs were kept exposed to VOCs for 3 days.

2.4 Chemotaxis of *M. incognita* towards VOCs emitted by Pc-10

Chemotaxis assays were performed according to Bargmann et al. (1993) and Wang et al. (2019) with some modifications. Petri dishes with 9 cm diameter containing 2% water-agar medium (WA) were divided into three areas: A) neutral area, located in the center of the plate; B) test area; C) control area (Figure 2). A 9 mm plug in diameter of Pc-10 was placed in position b over a 2 mL microtube cap (sterile), and another plug with only NA medium was added in position c also over a microtube cap. The distance from positions b and c to the edges of the neutral area (A) was 2.5 cm. Plates containing a plug with NA medium (without the fungus, but from the plate containing the isolate Pc-10) in position b and another plug with NA medium (from plates without the fungus) in position c was the control. Plates containing only one disc of the NA medium in position b and plates containing only the WA medium (nothing was deposited on both sides) were also considered as controls. A 20 μ L suspension, containing approximately 100 J2 of *M. incognita*, was deposited in position a. Then, the plates were incubated at 28 °C in the dark. After 16 h, the number of J2 in the test (B) and control (C) areas were quantified with the aid of an inverted optical microscope.

The chemotaxis index (CI) was obtained by subtracting the number of J2 in the test area from the number of J2 in the control area and then dividing by the total number of J2 found outside the neutral area (Bargmann et al., 1993). If $CI \geq 0.2$, VOCs were highly attractive and, if $0.1 \leq CI < 0.2$ were considered slightly attractive. If $-0.1 \leq CI < 0.1$, as a random response. If $-0.2 < CI < -0.1$, VOCs were considered repellent and, a $CI \leq -0.2$ as highly repellent (Wang et al., 2019). The experiment was performed twice, with four replicates each.

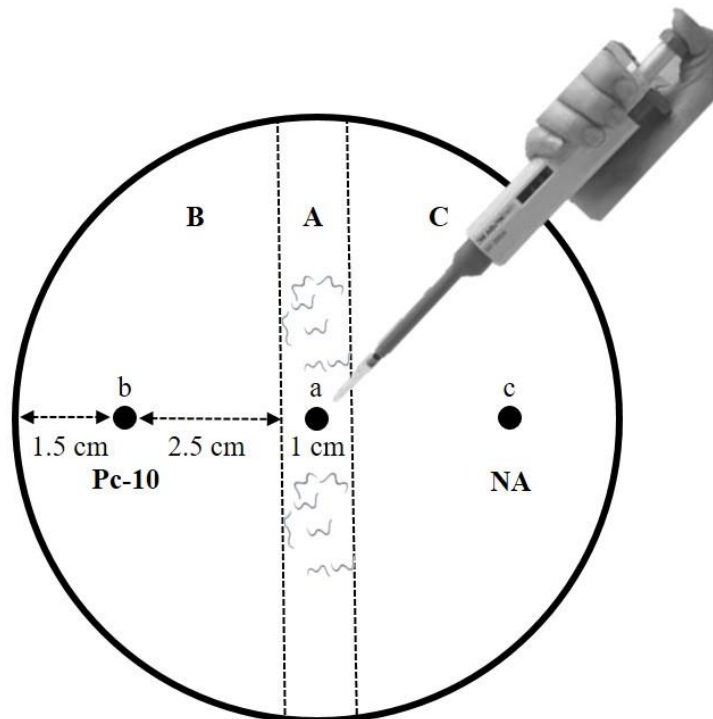


Figure 2: Schematic of the chemotaxis assay for *M. incognita* second-stage juveniles (J2) in a Petri dish (9 cm) containing WA. Three distinct areas were defined: A) neutral area, B) test area, and C) control area. Approximately 100 J2 were deposited in the center of the plate (a). A disc with propagules of the strain Pc-10 and one containing only nutrient-agar (NA) were deposited in positions b and c, respectively. After 16 h, the number of J2 in each area was determined separately. Nematodes that remained in area A were not counted. (Adapted from Wang et al., 2019).

2.5 Characterization of volatile organic compounds (VOCs) emitted by Pc-10 by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)

The *P. chlamydosporia* strain Pc-10 was cultured in 80 x 28 mm SUPELCO™ SPME tubes (Sigma-Aldrich, Bellefonte, PA, USA) with a screw cap attached to a layer of silicone.

For this, 15 mL of NA medium were added to each tube. One 5 mm disc of the Pc-10 culture was deposited on the medium contained inside the tube. The control treatment only consisted of the NA medium without the presence of the fungus. The tubes were prepared in triplicates and kept at 28 °C in the dark for eight days. The identification of volatile molecules was carried at the Center for Analysis and Chemical Prospecting (Department of Chemistry/UFLA, Brazil) using gas chromatography-mass spectrometry (GC–MS). VOCs were extracted via headspace solid-phase microextraction (SPME), using DVB/CAR/PDMS fiber (Divinylbenzene, Carboxen, Polydimethylsiloxane) (Arthur and Pawliszyn, 1990). The temperature and extraction time were 55 °C at 250 rpm for 35 min. The GC–MS QP 2010 Ultra mass spectrometer (Shimadzu, Japan) equipped with an AOC-5000 automatic liquid and gas injector (Shimadzu, Japan) and a HP-5 column of dimensions 30 m × 0.25 mm × 0.25 μm was used for the separation and identification of VOCs (5% phenyl-95% dimethylsiloxane). The temperatures of the injector, interface and the detector ion source were 250 °C, 240 °C and 200 °C, respectively. The injector was operated in splitless mode or split 1:2 mode, according to the peak intensity in the samples. As a drag gas Grade I was used at 1.0 mL min⁻¹. The temperature setting of the GC oven was 40–130 °C at 3 °C min⁻¹ and then up to 240 °C at 10 °C min⁻¹. The mass spectrum of each chromatogram peak was extracted through the Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System (AMDIS) v. 2.63. The VOC identification was performed by comparing the mass spectra of the sample peaks with NIST library spectra by the Mass Spectral Search Program (NIST, Washington, DC, USA) and by comparing experimentally obtained retention indices (RI Exp.) with the retention indices in the literature (RI Lit.) (Adams, 2007; NIST, 2021). The experimental retention indices were obtained by injecting a homologous series of alkanes. The comparison among the mass spectra was performed only for peaks in which the similarity was greater than 80%.

2.6 *Meloidogyne incognita* egg-hatching under the effect of 1,4-dimethoxybenzene

The compound 1,4-dimethoxybenzene was purchased from Sigma-Aldrich (Saint Louis-MO, USA) with 99% purity. Then the effect of different concentrations of this molecule on *M. incognita* J2 hatching was evaluated. The molecule was dissolved in an aqueous solution containing 1% Tween 80[®] (Sigma-Aldrich). Each of the prepared aqueous solutions (1000 μL), along with an aqueous suspension (200 μL) containing 2200 eggs of *M. incognita*, were placed in 2 mL microtubes with screw caps to achieve final concentrations of 150, 450, 750, and 1050 μg mL⁻¹. The negative control was the solution used for compound dissolution, Tween 80[®]

(0.01 g mL⁻¹). The microtubes were then sealed with PVC film and stored at 28 °C in the dark. After ten days, the number of hatched J2 was quantified. The assay was performed twice, with five replicates each.

2.7 Lethal concentration (LC₅₀) of 1,4-dimethoxybenzene against *M. incognita*

To establish 1,4-dimethoxybenzene dose-response curve on *M. incognita* J2, *in vitro* assays were conducted. 1,4-dimethoxybenzene was prepared in eight concentrations (0, 150, 300, 450, 600, 750, 900 and 1050 µg mL⁻¹) to find their lethal concentration for 50% (LC₅₀) of *M. incognita* J2. The molecule was diluted in Tween 80[®] (0.01 g.mL⁻¹). The negative control contained only Tween 80[®]. Then, 500µL of the different 1,4-dimethoxybenzene solutions were added to a microtube (2 mL) together with 100 µL of the aqueous suspension containing approximately 150 *M. incognita* J2, totaling a final volume of 600 µL. The microtubes were closed and sealed with PVC film and incubated at 28 °C in the dark. After 48 h, the microtubes were opened, the content was homogenized and 120 µL of the suspension was transferred to a 96-well polypropylene plate. The plate was kept at room temperature for 24 h, without any sealing, and the J2 that remained immobile with the body fully extended were considered dead. The assay was performed twice, with five replicates each.

2.8 Fumigant activity of 1,4-dimethoxybenzene against *M. incognita*

We used Supelco[®] vials (80 × 28 mm, Sigma-Aldrich, Bellefonte, PA, USA) to evaluate fumigant activity of 1,4-dimethoxybenzene on *M. incognita* eggs and J2 (Barros et al., 2014). To this end, the vials were half-filled with 35g of sterilized dry sand (121 °C, 101 325 kPa pressure for 2 h) plus 1,4-dimethoxybenzene, in doses of 10 and 100 mg. Then, one sterile 600 µL microtube was buried in the sand and 5 mL of distilled and sterilized water was applied to the sand. Vials containing only sand, without the molecule, were used as a negative control. Next, an aqueous suspension (200 µL) containing approximately 150 *M. incognita* eggs was deposited into the microtube. Subsequently, the Supelco[®] vials were closed and sealed with PVC film and stored at 28 °C in the dark. After ten days, the number of hatched J2 was quantified. The assay was performed twice, with six replicates each.

To evaluate the fumigant activity of 1,4-dimethoxybenzene on the of *M. incognita* J2, this same methodology was used, but with some modifications. In this trial, only the 100 mg dose of 1,4-dimethoxybenzene was evaluated. An aqueous suspension (200 µL) containing

approximately 40 J2 was deposited in the microtube. Subsequently, the Supelco® vials were closed and sealed. After 72 h, the contents of the microtubes were transferred to a 96-well polypropylene plate. To determine mortality, the plate was kept at room temperature for another 24 h, without any sealing, and the J2 that remained immobile were considered dead. The assay was performed twice, with six replicates each.

2.9 Chemotaxis of *M. incognita* towards 1,4-dimethoxybenzene

The same methodology described in the previous chemotaxis assay was used here (Bargmann et al., 1993; Wang et al., 2019). Petri dishes (9 cm in diameter) containing 2% WA were divided into a neutral area (A), test area (B), and control area (C) (Figure 2). On opposite sides of the plate, positions b and c, 9 mm diameter holes were opened on the WA medium with a sterile polypropylene tube. The 1,4-dimethoxybenzene molecule was diluted in an aqueous solution containing 1% Tween 80®. The hole located in the test area (B) was filled with 30 µL of 1,4-dimethoxybenzene in concentrations of 1, 10, 100, 1000, or 10,000 µg mL⁻¹. The hole located in the control area (C) was filled with the same volume of the solvent. Plates containing only 30 µL of 1% Tween 80® in one of the holes were considered as controls. A 20 µL aqueous suspension containing approximately 100 J2 of *M. incognita* were deposited in the center of the plate (a). The plates were not sealed with PVC film and remained at 20°C in the dark. After 16 h, the number of J2 in the test (B) and control (C) areas were quantified with the aid of an inverted optical microscope, and the chemotaxis index was determined. The experiment was repeated twice, with four replicates per treatment.

2.10 Chemotaxis of *M. incognita* towards VOCs emitted by Pc-10 and 1,4-dimethoxybenzene

The test was performed in pots as described by Dong et al. (2014) and Wang et al. (2019) with some modifications. The experimental units consisted of two polypropylene pots (300 mL) joined by a polypropylene tube (20 cm long and 9 mm in diameter) (Figure 3). A 2 mm diameter hole was made in the middle of the tube (Figure 3). The pots and tubes were filled with sterile sand (121°C, 101 325 kPa pressure for 2 h) and moistened with 100 and 4 mL of water, respectively. Tomato seedlings (cultivar Santa Clara) 30 days of age were transplanted into the pots and fertilized (Forth Hortaliças®) (15 mL of the fertilizer were diluted in 1 L of water and 20 mL of this solution were applied to each pot). To prevent the tomato roots from invading the

tubes, their ends were covered with 0.025 mm mesh. The treatments consisted of: I) tomato / sand (without tomato), II) Pc-10 + tomato / NA medium + tomato, III) NA medium + tomato / tomato, IV) 1,4-dimethoxybenzene + tomato / Tween 80[®] + tomato, V) Tween 80[®] + tomato / tomato, VI) Pc-10 + 1,4-dimethoxybenzene + tomato / NA medium + Tween 80[®] + tomato, VII) NA medium + Tween 80[®] + tomato / tomato (Figure 3). The treatments involving the fungus consisted of adding six discs containing Pc-10 propagules, which were transferred to the pots at the time of transplanting the tomato seedling. The treatments using the NA medium consisted of adding six discs without the presence of the fungus together with the tomato seedling. The molecule 1,4-dimethoxybenzene was diluted in Tween 80[®] (0.01 g mL⁻¹) to obtain the concentration of 1000 µg mL⁻¹. Then, 5 mL of the molecule or Tween 80[®] (0.01 g mL⁻¹) were applied to the pots at the time of inoculation of the nematodes. This assay was carried out in a growth chamber, type Phytotron, with a temperature of 25°C, 70% humidity, and luminosity of 12h light/12h dark. Approximately 2000 *M. incognita* J2 were injected into the hole in the middle of the tube after 12 days of transplantation. The nematodes were recovered 24 h after being injected. From each end, the tubes were cut into 9.5 cm pieces to collect the content on both sides. The samples were deposited in Falcon tubes (50 mL) and manually shaken for 15 seconds. Then, the sand was poured onto a set of 0.074 and 0.025 mm opening sieves and washed under running tap water. The material retained in the 0.025 mm sieve was collected, and the number of responding J2 (J2 found in the test area plus control area) was quantified to determine the of percentage (%) response of J2. The assay was repeated twice, with four replicates per treatment.

$$\% \text{ response of J2} = \frac{(\text{J2 number in test area or control area}) \times 100}{(\text{J2 number in test area} + \text{J2 number in control area})}$$

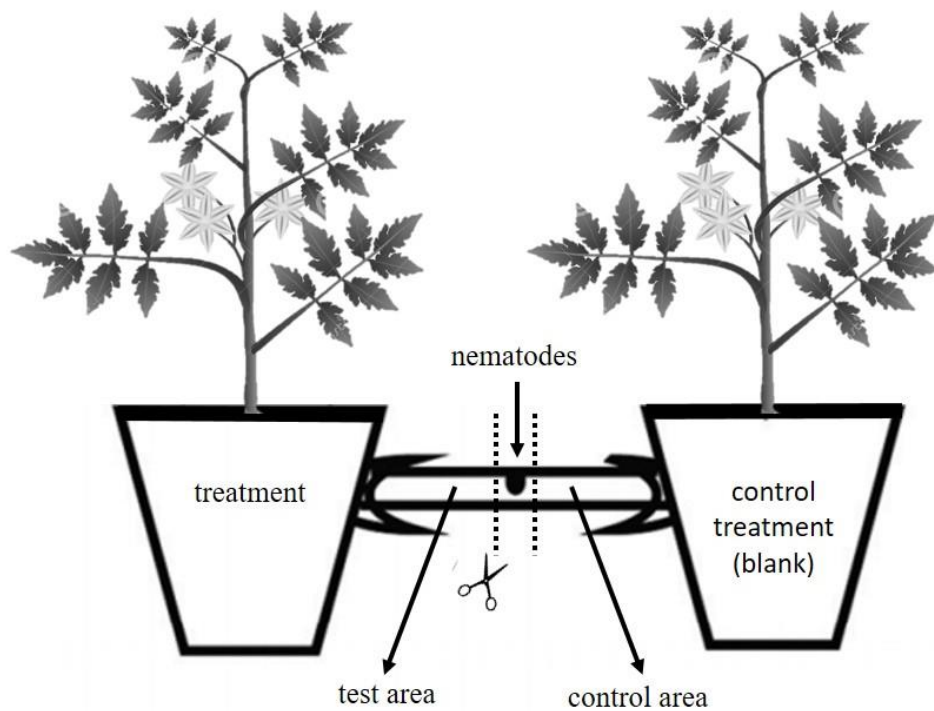


Figure 3: Schematic of the chemotaxis assay for *M. incognita* second-stage juveniles (J2) in pots (300 mL) connected by a tube (20 cm long and 9 mm in diameter). The pots and tubes were filled with sand. Each pot received one tomato plant. Two thousand *M. incognita* J2 were injected into a hole in the middle of the tube and they were recovered after 24 hours. (Adapted from Wang et al., 2019).

2.11 Data analysis

All assays used a completely randomized design. The results of the repetitions of each experiment were submitted to a combined analysis and, when the $P > 0.05$, the data presented were a combination of the two tests. All data were subjected to normality tests (Shapiro-Wilk test) and homogeneity (Bartlett test) and then the F test was applied through analysis of variance (ANOVA). The quantitative variables were subjected to regression, and the model chosen was the one with the best fit. To determine the lethal concentration of 1,4-dimethoxybenzene required to kill 50% of *M. incognita* J2, the generalized linear regression logistic model was used through the drc package in the R program (Ritz et al., 2015), with four parameters. The means of the experiment in pots were submitted to the Student's t-test. The means of the other trials were compared by Tukey or Scott-Knott test ($P < 0.05$). RStudio software (v.3.6.0) and SigmaPlot® version 11 were used for statistical analysis and artwork, respectively.

3 RESULTS

3.1 *Meloidogyne incognita* egg hatching under exposure to VOCs emitted by Pc-10

The exposure of *M. incognita* eggs for 3 days to VOCs emitted by Pc-10 reduced ($P < 0.05$) the egg-hatching by around 60.5% compared to the control treatment (Table 1). When the remaining eggs were transferred to a microtube and stored for seven days, reductions greater than 92% in the hatching of exposed eggs to Pc-10 VOCs occurred. Adding up the number of eggs hatched from both periods resulted in a hatch decrease of more than 88%, when compared to the control treatment (Table 1).

Table 1: Total number of *M. incognita* eggs hatched after exposure of eggs for three days to VOCs emitted by *P. chlamydosporia* strain Pc-10 and controls (NA medium and empty plate).

Treatments	Experiment 1			Experiment 2		
	After 3 days	After 10 days	Total	After 3 days	After 10 days	Total
Empty plate	225 ± 16 a	1845 ± 60.1 a	2068 ± 61.3 a	301 ± 22.1 a	2497 ± 173.6 a	2798 ± 183.3 a
NA medium	280 ± 17.6 a	1038 ± 60.1 b	1390 ± 68.5 b	319 ± 22.1 a	1994 ± 173.6 a	2314 ± 183.3 a
Pc-10	120 ± 14.8 b	116 ± 55.6 c	236 ± 51.8 c	126 ± 22.1 b	189 ± 173.6 b	316 ± 183.3 b

Within columns, means ± SE followed by the same letter do not differ significantly from each other by the Tukey test ($P < 0.05$). The interactions between experiments and treatments were significant ($P < 0.05$), then the data were analyzed separately. Values are means of seven replicates.

3.2 Chemotaxis of *M. incognita* towards VOCs emitted by Pc-10

M. incognita J2 was slightly attracted ($0.1 \leq CI < 0.2$) to VOCs emitted by the strain Pc-10. A random response was observed ($-0.1 \leq CI < 0.1$) in all controls (Table 2).

Table 2. Chemotactic responses of *M. incognita* second-stage juveniles (J2) to *P. chlamydosporia* strain Pc-10.

Treatments	Chemotaxis index
I) Pc-10 / NA medium	0.138
II) NA medium ¹ / NA medium ²	0.010
III) NA medium	-0.081
IV) Only WA medium	-0.079

I) Pc-10 in position b and NA medium (from plates without the strain Pc-10) in position c; II) NA medium¹ (without the fungus, but from the plate containing strain Pc-10) in position b and NA medium² (from plates without the strain Pc-10) in position c; III) Only NA medium (from plates without the strain Pc-10) in position b; IV) No treatment.

3.3 Characterization of volatile organic compounds (VOCs) emitted by Pc-10 by GC–MS

Three VOCs emitted by the *P. chlamydosporia* strain Pc-10 were identified. They belonged to the group of oxides, ketone, and aromatic ether. The 1,4-dimethoxybenzene compound had the highest peak area (Figure 4) and, for this reason, was used in the subsequent studies.

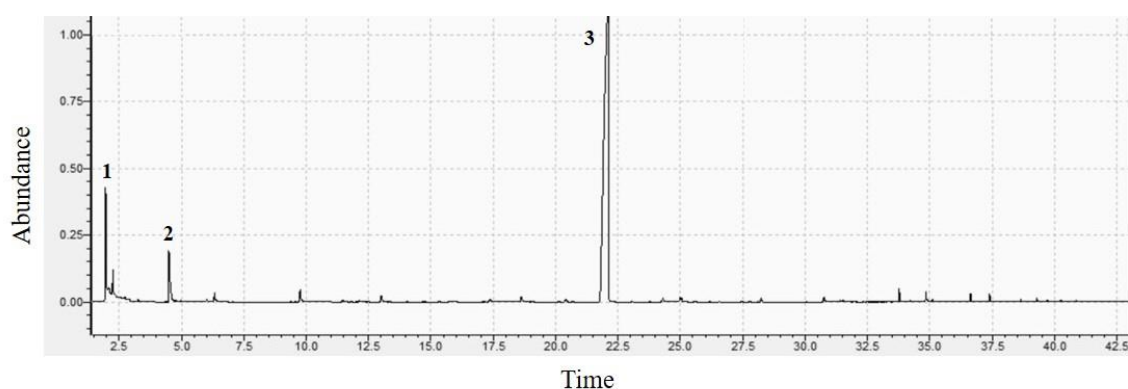


Figure 4. Compounds identified by gas chromatography-mass spectrometry in the volatilome of *P. chlamydosporia* strain Pc-10. Numbers correspond to the following compounds: (1) carbon dioxide, (2) acetone and (3) 1,4-dimethoxybenzene.

3.4 *Meloidogyne incognita* egg-hatching under exposure to 1,4-dimethoxybenzene

The increase in 1,4-dimethoxybenzene concentrations was inversely related to the

hatching of *M. incognita* J2. Reductions of 49.7% and 64.9% in the eggs hatched were obtained with $150 \mu\text{g mL}^{-1}$ of 1,4-dimethoxybenzene in experiments 1 and 2, respectively, compared to the control treatment ($0 \mu\text{g mL}^{-1}$). The highest concentration ($1050 \mu\text{g mL}^{-1}$) of the molecule reduced hatching between 67.1 and 78.7% when compared to the control treatment (Figure 5).

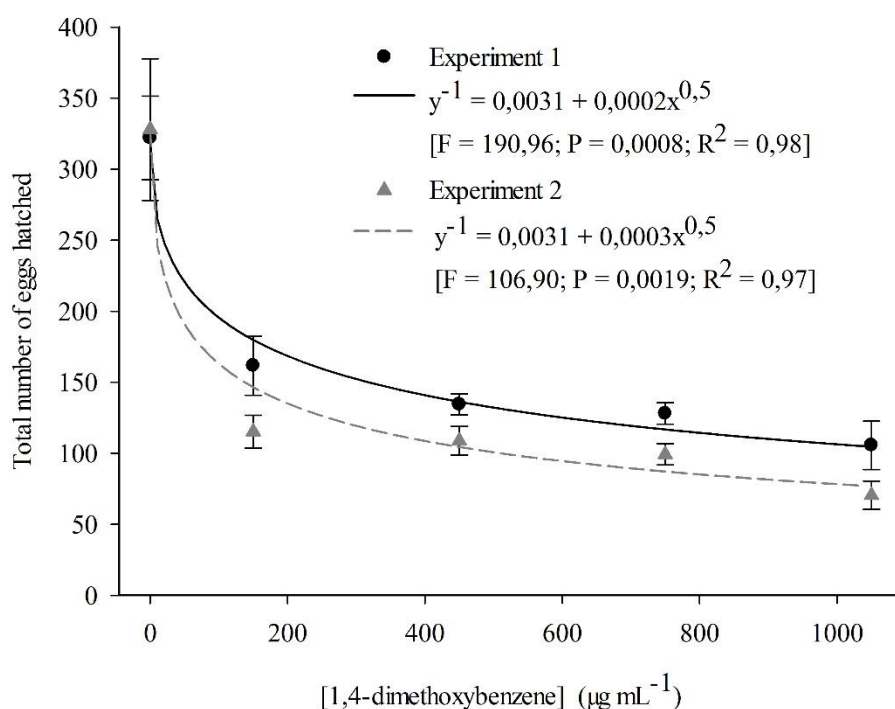


Figure 5. Total number of *M. incognita* eggs-hatched after exposure of eggs for 10 days to 1,4-dimethoxybenzene. The bars represent the standard errors. The interactions between experiments and treatments were significant ($P < 0.05$), then the data were analyzed separately. Values are means of five replicates.

3.5 Lethal concentration (LC_{50}) of 1,4-dimethoxybenzene against *M. incognita*

The 1,4-dimethoxybenzene showed nematicidal activity against the J2. The percentage of J2 dead after exposure to 1,4-dimethoxybenzene was modeled using the logistic regression model with four potential parameters (Table 3 and 4). The parameters were as follows: b, the dose-response curve slope coefficient; c and d the lower and upper asymptotes of the dose-response curve; and e, the dose needed to cause 50% mortality in the population (LC_{50}) (Ritz et al., 2015). The models in both experiments were modeled using two parameters. The LC_{50} of 1,4-dimethoxybenzene was 132 and $136 \mu\text{g mL}^{-1}$ for experiment 1 and 2, respectively.

Table 3. Parameters of logistic equations for the dose-response curves of *M. incognita* second-stage juveniles (J2) exposed to 1,4-dimethoxybenzene.

Molecule	Experiment	Model parameters			
		b^w	c^x	d	e^z
1,4-dimethoxybenzene	1	-2.08 (0.59)*	fixed	fixed	132 (19.59)*
		$P < 0.001$			$P < 0.001$
	2	-3.35 (1.49)*	fixed	fixed	136 (14.0)*
		$P < 0.02$			$P < 0.001$

^w b, indicates the slope coefficient of the dose-response curve.

^x c and d are the lower asymptotes of the dose-response curve set at 0.15 and 0.18 (experiment 1 and 2, respectively) and upper asymptotes set at 0.90 and 0.85 (experiment 1 and 2, respectively).

^z e, corresponds to the dose necessary to cause 50% mortality in the population.

* in parentheses the standard error and *P* value for the parameters.

Table 4. Comparison of doses that resulted in 50% mortality in the *M. incognita* second-stage juveniles (J2) (LC₅₀).

Molecule	Experiment	LC ₅₀ (µg mL ⁻¹) predicted by the model
1,4-dimethoxybenzene	1	132 (93.7 – 170.4)
	2	136 (106.9 – 165,5)

^z 95% confidence interval for each LC₅₀ enclosed in parentheses.

3.6 Fumigant activity of 1,4-dimethoxybenzene against *M. incognita*

The two concentrations (10 and 100 mg) of 1,4-dimethoxybenzene reduced ($P < 0.05$) the of *M. incognita* egg-hatching compared to the control treatment (0 mg) (Figure 6). Reductions of 83.1% and 89.4% in egg-hatched were obtained with 100 mg of 1,4-dimethoxybenzene in experiments 1 and 2, respectively, compared to the control treatment (0 mg). In experiment 1, there was no statistical difference between the two concentrations of the molecule. However, in experiment 2, there was a statistical difference between the two concentrations.

The compound 1,4-dimethoxybenzene (100 mg) caused high toxicity to *M. incognita* J2 compared to the control treatment (0 mg) ($P < 0.05$) (Figure 7). The J2 mortality with fumigation reached values between 86 to 85% in experiments 1 and 2, respectively, compared to the control treatment (0 mg).

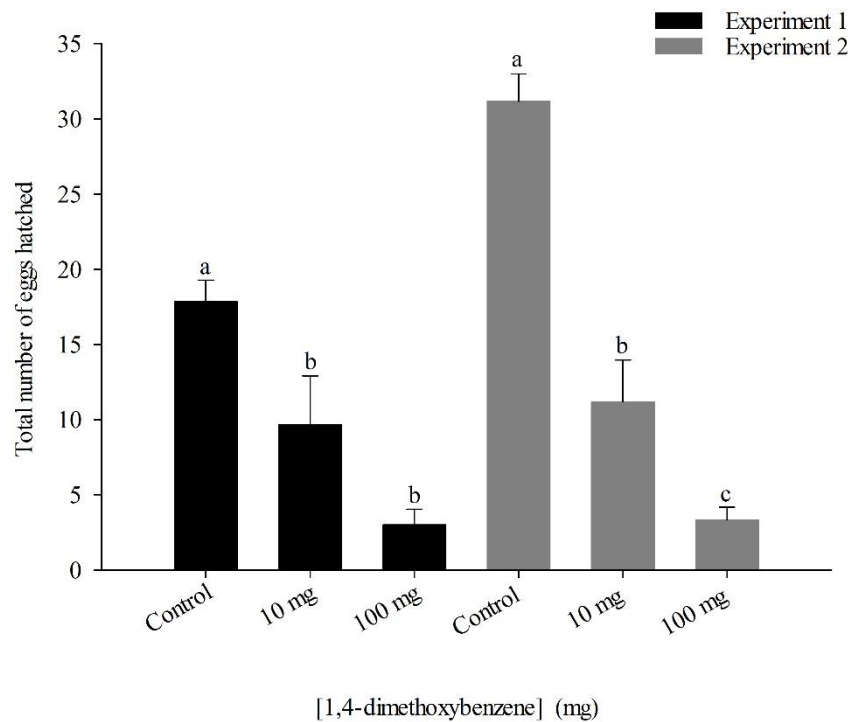


Figure 6. Fumigant activity of 1,4-dimethoxybenzene against *M. incognita* eggs hatched. The bars represent the standard errors. Means followed by the same letter do not differ significantly from each other by the Tukey test ($P < 0.05$). The interactions between experiments and treatments were significant ($P < 0.05$), then the data were analyzed separately. Values are means of six replicates.

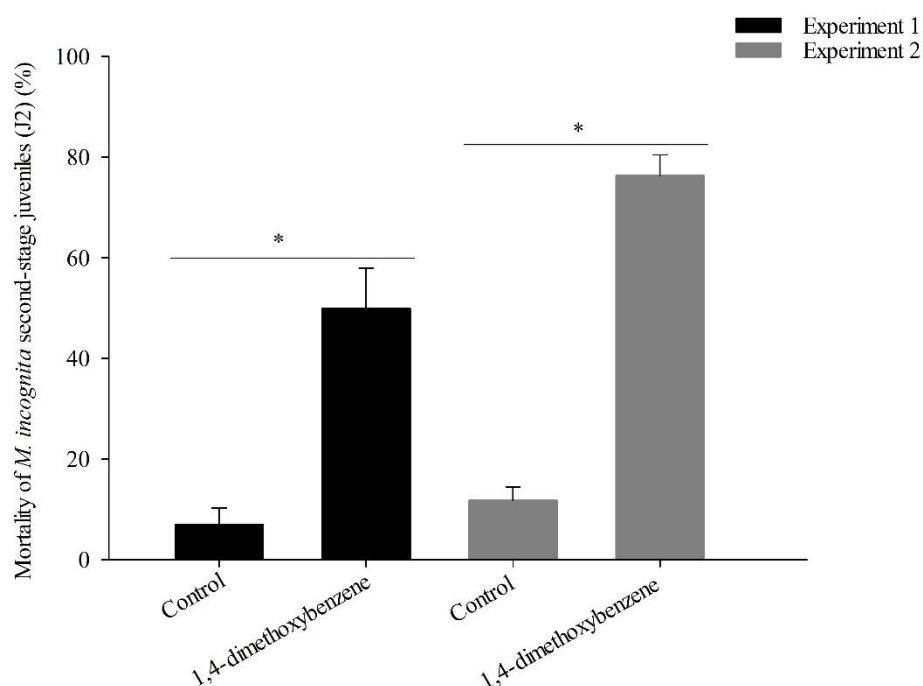


Figure 7. Fumigant activity of 1,4-dimethoxybenzene against *M. incognita* second-stage juveniles (J2). The bars represent the standard errors. * Student's t-test ($P < 0.05$). The interactions between experiments and treatments were significant ($P < 0.05$), then the data were analyzed separately. Values are means of six replicates.

3.7 Chemotaxis of *M. incognita* towards 1,4-dimethoxybenzene

In the two assays, the five concentrations of 1,4-dimethoxybenzene evaluated were highly attractive (chemotaxis index (CI); $CI \geq 0.2$) to *M. incognita* J2 and differed significantly ($P < 0.05$) from the control ($0 \mu\text{g mL}^{-1}$) (Figure 8). In assay 1, the CI of the five concentrations were statistically ($P < 0.05$) similar. In assay 2, the three highest concentrations were more attractive than the others (1 and $10 \mu\text{g mL}^{-1}$) (Figure 8). In both assay, the control resulted in a random response (1% Tween 80[®]).

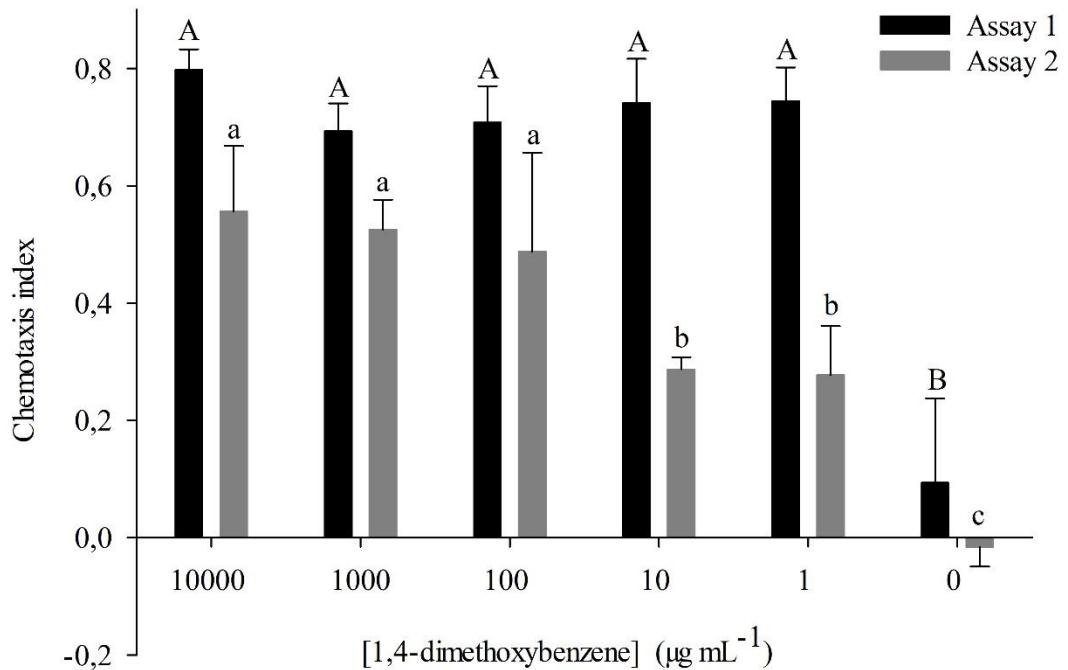


Figure 8. Chemotactic responses of *M. incognita* second-stage juveniles (J2) to 1,4-dimethoxybenzene. The bars represent the standard errors. Means followed by the same letters do not differ significantly from each other by the Scott-Knott test ($P < 0.05$). The interactions between experiments and treatments were significant ($P < 0.05$), then the data were analyzed separately. Values are means of four replicates.

3.8 Chemotaxis of *M. incognita* towards VOCs emitted by Pc-10 and 1,4-dimethoxybenzene

The VOCs emitted by the roots of tomato (I), Pc-10 (II), 1,4-dimethoxybenzene (IV), and by the combination Pc-10 + 1,4-dimethoxybenzene (VI) significantly attracted the *M. incognita* J2 when compared to their respective controls (Figure 9). The Pc-10 isolate applied together with 1,4-dimethoxybenzene (VI) in the same pot attracted 72% of the J2 compared to the control (NA medium + Tween 80[®]). However, the treatments NA medium (III), Tween 80[®] (V), and NA medium + Tween 80[®] (VII) did not attract the nematode ($P > 0.05$) and had a uniform distribution of J2 on both sides of the tube (Figure 9).

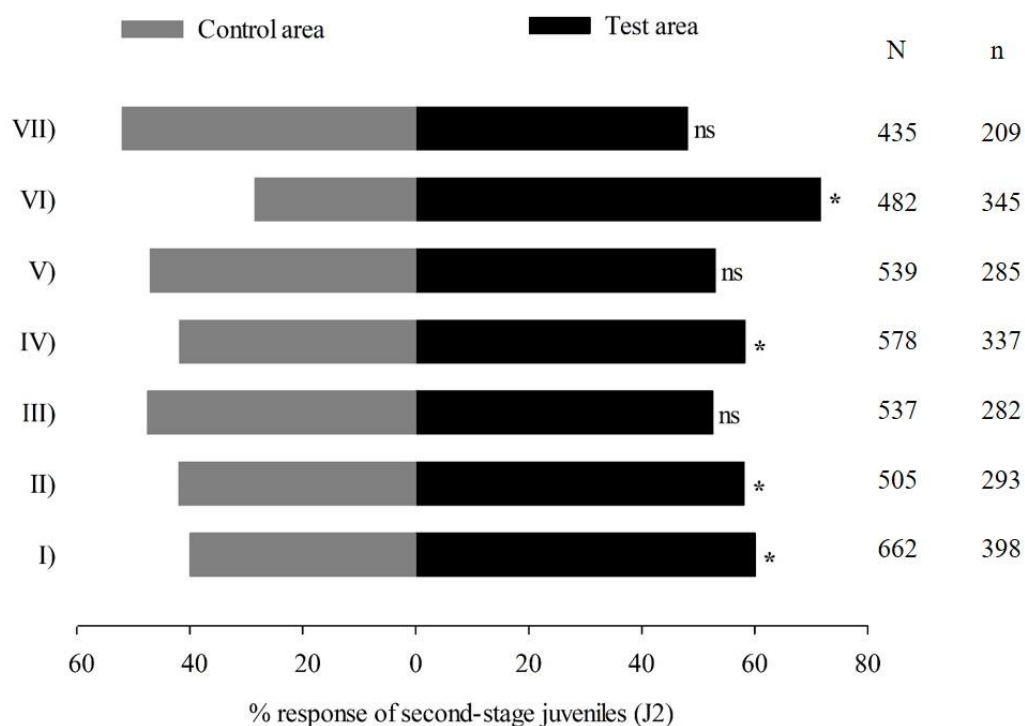


Figure 9. Responses of *M. incognita* second-stage juveniles (J2) to VOCs emitted by *P. chlamydosporia* strain Pc-10 and 1,4-dimethoxybenzene. Pots were connected by a tube and filled with sand. I) tomato / pots containing only sand, II) Pc-10 + tomato / NA medium + tomato, III) NA medium + tomato / tomato, IV) 1,4-dimethoxybenzene + tomato / Tween 80[®] + tomato, V) Tween 80[®] tomato / tomato, VI) Pc-10 + 1,4-dimethoxybenzene + tomato / NA medium + Tween 80[®] + tomato, VII) NA medium + Tween 80[®] + tomato / tomato. * Student's t-test ($P < 0.05$). ns = not significant ($P > 0.05$). N is the total number of responding J2 (J2 found in the test area and in the control area) and n is the number of J2 in the test area. Interaction between experiments were not significant ($P > 0.05$), then pooled results were presented (means two experiments with four replicates each).

4 DISCUSSION

Several studies have demonstrated that microorganisms emit volatile compounds to enhance their parasitic capacity against nematodes (Cheng et al., 2017; Niu et al., 2010; Wang et al., 2018). However, there is no information about the effects of VOCs emitted by the efficient biological control agent *P. chlamydosporia* on PPNs. Moreover, studies analyzing the effects of individual compounds emitted by this fungus on the different stages of PPNs life cycle are lacking. The efficiency of the *P. chlamydosporia* strain Pc-10 in the control of PPNs has been reported in several studies (Barbosa et al., 2019; Nasu et al., 2018; Pacheco et al.,

2020; Podestá et al., 2016; Viggiano et al., 2014; Xavier et al., 2017). Here, we show that the VOCs produced by Pc-10 are attractive to *M. incognita* J2 and inhibits egg hatching. Based on the GC-MS analysis performed on volatile emissions of Pc-10, as well as the *in vitro* and *in vivo* tests, we conclude that the compound 1,4-dimethoxybenzene is the primary compound responsible for this effect. We also proved that the tomato roots exude volatile molecules that are attractive to *M. incognita*, a fact in line with the literature (Shivakumara et al., 2019; Wang et al., 2019).

Pochonia chlamydosporia is a nematophagous fungus that produces a variety of hydrolytic enzymes involved in its multitrophic lifestyle (Larriba et al., 2014; Lopez-Moya et al., 2017). In this study, we demonstrated that the *P. chlamydosporia* strain Pc-10 also produces short-chain carbon molecules that can assist it in the process of parasitism against the nematode. Corroborating with our results, other studies have shown that soil microorganisms release VOCs toxic to eggs and J2 (Huang et al., 2020; Liarzi et al., 2016; Terra et al., 2018). If in nature, the VOCs emitted by the *P. chlamydosporia* strain Pc-10 inhibit *M. incognita* hatching, as in our *in vitro* assays, the eggs, which are the fungus' preferred food source, can remain available in the environment for a longer period. Due to the volatile nature of these compounds, it can easily dissipate through the soil and the negative effect on hatching may occur in eggs close to *P. chlamydosporia* (emitter of VOCs), as well as on those more distant eggs.

Interestingly, the PC-10 volatiles toxic to eggs are, also attractive to the J2. Nematodes are attracted to olfactory cues released by their host, by their predators, and by the biological components present in the place where they will probably find a host (Ali et al., 2010, 2011; Delory et al., 2016; Hsueh et al., 2017; Shivakumara et al., 2019; Sikder and Vestergard, 2020; Wang et al., 2018; Wu and Duncan, 2020). The findings herein suggest that the presence of *P. chlamydosporia* in the rhizosphere of the tomato plants can make this region even more attractive to the *M. incognita* J2, maximizing the tritrophic interaction (*M. incognita* - *P. chlamydosporia* - tomato) and the success of the fungus parasitism. However, the roots of the tomato can also be infected with a greater amount of *M. incognita* J2. Some studies have shown that fungi and bacteria release volatile compounds to attract the nematode and enhance its parasitism, e.g., *C. elegans* is attracted by the volatile emissions released by fungi and bacteria (Niu et al., 2010; Wang et al., 2018).

A great diversity of VOCs has been identified from the volatile emissions of microorganisms (Cheng et al., 2017; Estupiñan-López et al., 2018; Lozano-Soria et al., 2020; Terra et al., 2018). Here, we identified only three compounds (carbon dioxide, acetone, and 1,4-dimethoxybenzene) in the volatile emissions of Pc-10. In contrast, 66 VOCs emitted by *P.*

chlamydosporia strain 123 were identified (Lozano-Soria et al., 2020). Variations in the amount of VOCs released by different isolates belonging to the same species may be related to three factors: culture medium, colony age, and genetic variations among isolates (Bruce et al., 2003; Ezra and Strobel, 2003; Fiddaman and Rossall, 1994).

The compound 1,4-dimethoxybenzene produced by strain Pc-10, showed fumigant and non-fumigant nematicidal activity on *M. incognita* eggs and J2, in addition to attracting *M. incognita* J2. This compound is found in volatile flower emissions and is used as an attractive synthetic pheromone in traps for some pests (Baroffio et al., 2018; Dotterl et al., 2005; Marques et al., 2009; Mecca et al., 2021; Owens et al., 2017; Ventura et al., 2007; Wibe et al., 2014). However, its isomer 1,3-dimethoxybenzene repelled the insect *C. sordidus* (Lozano-Soria et al., 2020). Regarding the acetone also released by Pc-10, studies have indicated that it is attractive to *M. incognita* (Cheng et al., 2017; Shivakumara et al., 2019). However, acetone was not toxic to *M. incognita*, even at a concentration of 1,000 mg/L (Cheng et al., 2017). Many studies have shown that carbon dioxide, also found in the volatile emissions of the strain Pc-10, can attract several species of nematodes, including *M. incognita* (Dillman et al., 2012; Perry, 2005; Pline and Dusenbery, 1987; Rasmann et al., 2012; Robinson, 1995).

5 CONCLUSIONS

Overall, the VOCs emitted by *P. chlamydosporia* strain Pc-10 mediate the fungus interaction with *M. incognita*. The most intense volatile VOC in the emission of Pc-10, 1,4-dimethoxybenzene, proved to be toxic to *M. incognita* eggs and J2, and at the same time, it was attractive to J2. In future studies, the efficacy of different *P. chlamydosporia* isolates as agents of biological control of PPNs should involve VOCs as a characteristic related to the effectiveness of control.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors gratefully acknowledge financial support and fellowships from: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

REFERENCES

- Abad, P., Gouzy, J., Aury, J.M., Castagnone-Sereno, P., Danchin, E.G.J., et al., 2018. Genome sequence of the metazoan plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. *Nature Biotechnology* 26, 909-915. <https://doi.org/10.1038/nbt.1482>.
- Adams, R.P., 2007. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry, 4th Edition. Allured Publ, Carol Stream.
- Ali, J.G., Alborn, H.T., Stelinski, L.L., 2011. Constitutive and induced subterranean plant volatiles attract both entomopathogenic and plant parasitic nematodes. *Journal of Ecology* 99, 26-35. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2745.2010.01758.x>.
- Ali, J.G., Alborn, H.T., Stelinski, L.L., 2010. Subterranean herbivore-induced volatiles released by citrus roots upon feeding by *Diaprepes abbreviatus* recruit entomopathogenic nematodes. *Journal of Chemical Ecology* 36, 361-368. <https://doi.org/10.1007/s10886-010-9773-7>.
- Arthur, C.L., Pawliszyn, J., 1990. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Analytical Chemistry* 62, 2145-2148. <https://doi.org/10.1021/ac00218a019>.
- Baermann, G., 1917. Eine einfache methode zur auffindung von *Ancylostomum* (Nematoden) larven in erdproben, *Gennesk. Tijds Ned Ind* 57, 131-137.
- Barbosa, R.T., Monteiro, T.S.A., Coutinho, R.R., Silva, J.G., Freitas, L.G., 2019. *Pochonia chlamydosporia* no controle do nematoide de galhas em bananeira. *Nematropica* 49, 99-106.
- Bargmann, C.I., Hartweg, E., Horvitz, H.R., 1993. Odorant-selective genes and neurons mediate olfaction in *C. elegans*. *Cell Press* 74, 515-527. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)80053-H](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)80053-H).
- Baroffio, C.A., Sigsgaard, L., Ahrenfeldt, E.J., Borg-Karlson, A.K., Bruun, S.A., Cross, J.V., Fountain, M.T., Hall, D., Mozuraitis, R., Ralle, B., Trandem, N., Wibe, A., 2018. Combining plant volatiles and pheromones to catch two insect pests in the same trap: Examples from two berry crops. *Crop Protection* 109, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2018.02.025>.
- Barros, A.F., Campos, V.P., Silva, J.C.P., Pedroso, M.P., Medeiros, F.H.V., Pozza, E.A., Reale, A.L., 2014. Nematicidal activity of volatile organic compounds emitted by *Brassica juncea*, *Azadirachta indica*, *Canavalia ensiformis*, *Mucuna pruriens* and *Cajanus cajan* against *Meloidogyne incognita*. *Applied Soil Ecology* 80, 34-43. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2014.02.011>.
- Bilgrami, A.L., Ahmad, I., Jairajpuri, M.S., 1985. Responses of adult *Hirschmanniella oryzae* towards different plants roots. *Revue de Nématologie* 8, 265-272.
- Bruce, A., Stewart, D., Verrall, S., Wheatley, R.E., 2003. Effect of volatiles from bacteria and yeast on the growth and pigmentation of sapstain fungi. *International Biodeterioration and Biodegradation* 51, 101-108. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(02\)00088-4](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(02)00088-4).

- Cheng, W., Yang, J., Nie, Q., Huang, D., Yu, C., Zheng, L., Cai, M., Thomashow, L.S., Weller, D.M., Yu, Z., Zhang, J., 2017. Volatile organic compounds from *Paenibacillus polymyxa* KM2501-1 control *Meloidogyne incognita* by multiple strategies. *Scientific Reports* 7, 1-11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16631-8>.
- Curtis, R.H.C., 2008. Plant-nematode interactions: environmental signals detected by the nematode's chemosensory organs control changes in the surface cuticle and behavior. *Parasite* 8, 310-316. <https://doi.org/10.1051/parasite/2008153310>.
- Dallemole-Giaretta, R., Freitas, L.G., Lopes, E.A., Silva, M.C.S., Kasuya, M.C.M., Ferraz, S., 2015. *Pochonia chlamydosporia* promotes the growth of tomato and lettuce plants. *Acta Scientiarum* 37, 417-423. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v37i4.25042>.
- Dallemole-Giaretta, R., Freitas, L.G., Lopes, E.A., Pereira, O.L., Zooca, R.J.F., Ferraz, S., 2012. Screening of *Pochonia chlamydosporia* Brazilian isolates as biocontrol agents of *Meloidogyne javanica*. *Crop Protection* 42, 102-107. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2012.06.002>.
- Delory, B.M., Delaplace, P., Fauconnier, M-L., Jardin, P.D., 2016. Root-emitted volatile organic compounds: can they mediate belowground plant-plant interactions?. *Plant and Soil* 402, 1-26. <https://doi.org/10.1007/s11104-016-2823-3>.
- Dillman, A.R., Guillermin, M.L., Lee, J.H., Kim, B., Sternberg, P.W., Hallem, E.A., 2012. Olfaction shapes host-parasite interactions in parasitic nematodes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 31, 2324-2333. <https://doi.org/10.1073/pnas.1211436109>.
- Dong, L., Li, X., Huang, L., Gao, Y., Zhong, L., Zheng, Y., Zuo, Y., 2014. Lauric acid in crown daisy root exudate potently regulates root-knot nematode chemotaxis and disrupts *Mi-flp-18* expression to block infection. *Journal of Experimental Botany* 65, 131-141. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert356>.
- Dotterl, S., Fussel, U., Jurgens, A., Aas, G., 2005. 1,4-dimethoxybenzene, a floral scent compound in willows that attracts an oligolectic bee. *Journal of Chemical Ecology* 31, 2993-2998. <https://doi.org/10.1007/s10886-005-9152-y>.
- Estupiñan-López, L., Campos, V.P., Silva Júnior, J.C., Pedrosa, M.P., Terra, W.C., Silva, J.C.P., Paula, L.L., 2018. Volatile compounds produced by *Fusarium* spp. isolated from *Meloidogyne paranaensis* egg masses and corticous root tissues from coffee crops are toxic to *Meloidogyne incognita*. *Tropical Plant Pathology* 43, 183-193. <https://doi.org/10.1007/s40858-017-0202-0>.
- Ezra, D., Strobel, G.A., 2003. Effect of substrate on the bioactivity of volatile antimicrobials produced by *Muscodor albus*. *Plant Science* 165, 1229-1238. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(03\)00330-3](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(03)00330-3).
- Fiddaman, P.J., Rossall, S., 1994. Effect of substrate on the production of antifungal volatiles from *Bacillus subtilis*. *Journal of Applied Bacteriology* 76, 395-405. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1994.tb01646.x>.

Freire, F.C.O., Bridge, J., 1985. Parasitism of eggs, females and juveniles of *Meloidogyne incognita* by *Paecilomyces lilacinus* and *Verticillium chlamydosporium*. *Fitopatologia Brasileira* 10, 577-596.

Ghahremani, Z., Escudero, N., Saus, E., Gabaldón, T., Sorribas, F.J., 2019. *Pochonia chlamydosporia* induces plant-dependent systemic resistance to *Meloidogyne incognita*. *Frontiers in Plant Science* 10, 1-8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00945>.

Grewal, P.S., Gaugler, R., Lewis, E.E., 1993. Host recognition behavior by entomopathogenic nematodes during contact with insect gut contents. *The Journal of Parasitology* 79, 495-503. <https://doi.org/10.2307/3283373>.

Grewal, P.S., Wright, D.J., 1992. Migration of *Caenorhabditis elegans* (Nematoda: Rhabditidae) larvae towards bacteria and the nature of the bacterial stimulus. *Fundamental and Applied Nematology* 15, 159-166.

Goverse, A., Smant, G., 2014. The activation and suppression of plant innate immunity by parasitic nematodes. *Annual Review of Phytopathology* 52, 243-265. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-102313-050118>.

Hsueh, Y.P., Gronquist, M.R., Schwarz, E.M., Nath, R.D., Lee, C.H., Gharib, S., Schroeder, F.C., Sternberg, P.W., 2017. Nematophagous fungus *Arthrobotrys oligospora* mimics olfactory cues of sex and food to lure its nematode prey. *eLife* 6, 1-21. <https://doi.org/10.7554/eLife.20023.001>.

Huang, D., Yu, C., Shao, Z., Cai, M., Li, G., Zheng, L., Yu, Z., Zhang, J., 2020. Identification and characterization of nematicidal volatile organic compounds from deep-sea *Virgibacillus dokdonensis* MCCC 1A00493. *Molecules* 25, 1-14. <https://doi.org/10.3390/molecules25030744>.

Hussey, R.S., Barker, K.R., 1973. Comparison of methods for collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. *Plant Disease Reporter* 57, 1025-1028.

Jansson, H-B., 1982. Attraction of nematodes to endoparasitic nematophagous fungi. *Transactions of the British Mycological Society* 79, 25-29. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(82\)80187-3](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(82)80187-3).

Jansson, H-B., Nordbring-Hertz, B., 1979. Attraction of nematodes to living mycelium of nematophagous fungi. *Journal of General Microbiology* 112, 89-93. <https://doi.org/10.1099/00221287-112-1-89>.

Jaffe, H., Huettel, R.N., Demilo, A.B., Hayes, D.K., Rebois, R.V., 1989. Isolation and identification of a compound from soybean cyst nematode, *Heterodera glycines*, with sex pheromone activity. *Journal of Chemical Ecology* 15, 2031-2043. <https://doi.org/10.1007/BF01207435>.

Kiewnick, S., Sikora, R.A., 2017. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* by *Paecilomyces lilacinus* strain 251. *Biological Control* 38, 179-187. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2005.12.006>.

- Larriba, E., Jaime, M.D.L.A., Nislow, C., Martín-Nieto, J., Lopez-Llorca, L.V., 2015. Endophytic colonization of barley (*Hordeum vulgare*) roots by the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* reveals plant growth promotion and a general defense and stress transcriptomic response. *Journal of Plant Research* 128, 665-678. <https://doi.org/10.1007/s10265-015-0731-x>.
- Larriba, E., Jaime, M.D.L.A., Carbonell-Caballero, J., Conesa, A., Dopazo, J., Nislow, C., Martín-Nieto, J., Lopez-Llorca, L.V., 2014. Sequencing and functional analysis of the genome of a nematode egg-parasitic fungus, *Pochonia chlamydosporia*. *Fungal Genetics and Biology* 65, 69-80. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2014.02.002>.
- Liarzi, O., Bucki, P., Miyara, S.B., Ezra, D., 2016. Bioactive volatiles from an endophytic *Daldinia cf. concentrica* isolate affect the viability of the plant parasitic nematode *Meloidogyne javanica*. *Plos One* 20, 1-17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168437>.
- Lopez-Moya, F., Escudero, N., Lopez-Llorca, L.V., 2017. *Pochonia chlamydosporia*: Multitrophic lifestyles explained by a versatile genome, in: Manzanilla-López, R.H., Lopez-Llorca, L.V. (Eds), *Perspectives in sustainable nematode management through Pochonia chlamydosporia applications for root and rhizosphere health*. Springer, pp.197-207.
- Lozano-Soria, A., Picciotti, U., Lopez-Moya, F., Lopez-Cepero, J., Porcelli, F., Lopez-Llorca, L.V., 2020. Volatile organic compounds from entomopathogenic and nematophagous fungi, repel banana black weevil (*Cosmopolites sordidus*). *Insects* 11, 1-19. <https://doi.org/10.3390/insects11080509>.
- Lu, H., Xu, S., Zhang, W., Xu, C., Li, B., Zhang, D., Mu, W., Liu, F., 2017. Nematicidal activity of trans-2-hexenal against southern root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) on tomato plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 65, 544-550. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b04091>.
- Manzanilla-López, R.H., Esteves, I., Devonshire, J., 2017. Biology and management of *Pochonia chlamydosporia* and plant-parasitic nematodes, in: Manzanilla-López, R.H., Lopez-Llorca, L.V. (Eds), *Perspectives in sustainable nematode management through Pochonia chlamydosporia applications for root and rhizosphere health*. Springer, pp.47-76.
- Manzanilla-López, R.H., Esteves, I., Finetti-Sialer, M.M., Hirsch, P.R., Ward, E., Devonshire, J., Hidalgo-Díaz, L., 2013. *Pochonia chlamydosporia*: Advances and challenges to improve its performance as a biological control agent of sedentary endo-parasitic nematodes. *Journal of Nematology* 45, 1-7.
- Marques, F.A., Wendler, E.P., Macedo, A., Wosch, C.L., Maia, B.H.S., Mikami, A.Y., Arruda-Gatti, I.C., Pissinati, A., Mingotte, F.L.C., Alves, A., Ventura, M.U., 2009. Response of *Diabrotica speciosa* (Coleoptera: Chrysomelidae) to 1,4-dimethoxybenzene and analogs in common bean crop. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 52, 1333-1340. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132009000600003>.
- Mecca, M., Racioppi, R., Romano, V.A., Viggiani, L., Lorenz, R., D'Auria, M., 2021. Volatile organic compounds from *Orchis* species found in Basilicata (Southern Italy). *Compounds* 1, 83-93. <https://doi.org/10.3390/compounds1020008>.

- Medeiros, H.A., Resende, A.R.S., Ferreira, F.C., Freitas, L.G., Rodrigues, F.A., 2015. Induction of resistance in tomato against *Meloidogyne javanica* by *Pochonia chlamydosporia*. *Nematoda* 2, 1-7.
- Mingot-Ureta, C., Lopez-Moya, F., Lopez-Llorca, L.V., 2020. Isolates of the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* are endophytic in banana roots and promote plant growth. *Agronomy* 10, 1-11. <https://doi.org/10.3390/agronomy10091299>.
- Moens, M., Perry, R.N., Starr, J.L., 2009. *Meloidogyne* species - a diverse group of novel and important plant parasites, in: Perry, R.N., Moens, M., Starr, J.L. (Eds), *Root-knot nematodes*. Wallingford, CABI Publishing, pp.1–17.
- Monteiro, T.S.A., Pacheco, P.V.M., Gouveia, A.S., Balbino, H.M., Freitas, L.G., 2020. *Pochonia*, in: Amaresan, N., Senthil, K.M., Annapurna, K., Kumar, K., Sankaranarayanan, A. (Eds), *Beneficial Microbes in Agro-Ecology: Bacteria and Fungi*. Elsevier, Academic Press, pp.669–682.
- Nasu, E.G.C., Amora, D.X., Monteiro, T.S.A., Alves, P.S., Podestá, G.S., Ferreira, F.C., Freitas, L.G., 2018. *Pochonia chlamydosporia* applied via seed treatment for nematode control in two soil types. *Crop Protection* 114, 106-112. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2018.08.010>.
- NIST, Chemistry Webook–National Institute of Standards and Technology. <https://webbook.nist.gov/chemistry/> (accessed 13 May 2021).
- Niu, Q., Huang, X., Zhang, L., Xu, J., Yang, D., Wei, K., Niu, X., An, Z., Bennett, J.W., Zou, C., Yang, J., Zhang, K.Q., 2010. A trojan horse mechanism of bacterial pathogenesis against nematodes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 16631–16636. <https://doi.org/10.1073/pnas.1007276107>.
- Owens, D., Cherry, R., Karounos, M., Nuessly, G.S., 2017. Evaluation of lures for monitoring silk flies (Diptera: Ulidiidae) in sweet corn. *Florida Entomologist* 100, 251-256. <https://doi.org/10.1653/024.100.0218>.
- Pacheco, P.V.M., Monteiro, T.S.A., Coutinho, R.R., Balbino, H.M., Freitas, L.G., 2020. Fungal biocontrol reduces the populations of the lesion nematode, *Pratylenchus brachyurus*, in soybean and corn. *Nematology* 23, 1-8. <https://doi.org/10.1163/15685411-bja10064>.
- Pentimone, I., Colagieiro, M., Ferrara, M., Nigro, F., Rosso, L.C., Ciancio, A., 2019. Time-dependent effects of *Pochonia chlamydosporia* endophytism on gene expression profiles of colonized tomato roots. *Applied Microbiology and Biotechnology* 103, 8511-8527. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10058-z>.
- Perry, R.N., Curtis, R.H.C., 2013. Behaviour and sensory perception, in: Perry, R.N., Moens, M. (Eds), *Plant Nematology* 2nd Edition. CAB International, pp.246-273.
- Perry, R.N., 2005. An evaluation of types of attractants enabling plant-parasitic nematodes to locate plant roots. *Russian Journal of Nematology* 13, 83-88.
- Pline, M., Dusenbery, D.B., 1987. Responses of plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita* to carbon dioxide determined by video camera-computer tracking. *Journal of*

Chemical Ecology 13, 873-888. <https://doi.org/10.1007/BF01020167>.

Podestá, G.S., Amora, D.X., Maffia, L.A., Nasu, E.G.C., Ferraz, S., Freitas, L.G., 2016. Effect of time between soil infestation with *Pochonia chlamidosporia* and planting on the efficacy of the fungus in managing *Meloidogyne javanica*. Crop Protection 90, 77-83. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.08.029>.

Prot, J.C., 1980. Migration of plant-parasitic nematodes towards roots. Revue de Nematologie 3, 305-318.

Rasmann, S., Ali, J.G., Helder, J., van der Putten, W.H., 2012. Ecology and evolution of soil nematode chemotaxis. Journal of Chemical Ecology 38, 615-628. <https://doi.org/10.1007/s10886-012-0118-6>.

Ritz, C., Baty, F., Streibig, J.C., Gerhard, D., 2015. Dose-response analysis using R. Plos One 10, 1-13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146021>.

Robinson, A.F., 1995. Optimal release rates for attracting *Meloidogyne incognita*, *Rotylenchulus reniformis*, and other nematodes to carbon dioxide in sand. Journal of Nematology 27, 42-50.

Sasser, J.N., 1980. Root-knot nematodes: a global menace to crop production. Plant Disease 64, 36-41. <http://dx.doi.org/10.1094/PD-64-36>.

Shivakumara, T.N., Dutta, T.K., Chaudhary, S., Reuss, S.H.V., Williamson, V.M., Rao, U., 2019. Homologs of *Caenorhabditis elegans* chemosensory genes have roles in behavior and chemotaxis in the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. Molecular Plant-Microbe Interactions 32, 876-887. <https://doi.org/10.1094/MPMI-08-18-0226-R>.

Sikder, M.M., Vestergard, M., 2020. Impacts of root metabolites on soil nematodes. Frontiers in Plant Science 10, 1-18. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01792>.

Silva, J.C.P., Medeiros, F.H.V., Campos, V.P., 2018. Building soil suppressiveness against plant-parasitic nematodes. Biocontrol Science and Technology 28, 423-445. <https://doi.org/10.1080/09583157.2018.1460316>.

Stirling, G.R., 2014. Biological control of plant-parasitic nematodes (2nd edition): Soil ecosystem management in sustainable agriculture. Wallingford, UK: CAB International, p.536.

Terra, W.C., Campos, V.P., Martins, S.J., Costa, L.S.A.S., Silva, J.C.P., Barros, A.F., Estupiñan-Lopez, L., Santos, T.C.N., Smant, G., Oliveira, D.F., 2018. Volatile organic molecules from *Fusarium oxysporum* strain 21 with nematicidal activity against *Meloidogyne incognita*. Crop Protection 106, 125-131. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2017.12.022>.

Tsai, A.Y-L., Oota, M., Sawa, S., 2020. Chemotactic host-finding strategies of plant endoparasites and endophytes. Frontiers in Plant Science 11, 1-12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01167>.

Ventura, M.U., Pereira, T., Nunes, D.H., Arruda, I.C., 2007. Attraction of *Astylus variegatus*

(Germ.) (Coleoptera: Melyridae) by volatile floral attractants. *Scientia Agricola* 64, 305-307. <https://doi.org/10.1590/S0103-90162007000300016>.

Viggiano, J.R., Freitas, L.G., Lopes, E.A., 2014. Use of *Pochonia chlamydosporia* to control *Meloidogyne javanica* in cucumber. *Biological Control* 69, 72-77. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2013.11.004>.

Xavier, M.D., Dallemole-Giaretta, R., Freitas, L.G., Lopes, E.A., Gardiano, C.G., Ferraz, S., 2017. Combination of isolates of *Pochonia chlamydosporia* for the control of *Meloidogyne javanica* in tomato. *Chilean Journal of Agricultural and Animal Sciences* 33, 24-27. <http://dx.doi.org/10.4067/S0719-38902017005000103>.

Wang, P., Sun, Y., Yang, L., Hu, Y., Li, J., Wang, J., Zhang, F., Liu, Y., 2019. Chemotactic responses of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* to *Streptomyces plicatus*. *FEMS Microbiology Letters* 366, 1-7. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnz234>.

Wang, B-L., Chen, Y-H., He, J-N., Xue, H-X., Yan, N., Zeng, Z-J., Bennett, J.W., Zhang, K-Q., Niu, X-M., 2018. Integrated metabolomics and morphogenesis reveal volatile signaling of the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. *Applied and Environmental Microbiology* 84, 1-19. <https://doi.org/10.1128/AEM.02749-17>.

Wang, C.Y., Wang, Z., Fang, Z.M., Zhang, D.L., Gu, L.J., Liu, L., Sung, C.K., 2010. Attraction of pinewood nematode to endoparasitic nematophagous fungus *Esteya vermicola*. *Current Microbiology* 60, 387-392. <https://doi.org/10.1007/s00284-009-9556-y>.

Wibe, A., Borg-Karlson, A.K., Cross, J., Bichão, H., Fountain, M., Liblikas, I., Sigsgaard, L., 2014. Combining 1,4-dimethoxybenzene, the major flower volatile of wild strawberry *Fragaria vesca*, with the aggregation pheromone of the strawberry blossom weevil *Anthonomus rubi* improves attraction. *Crop Protection* 64, 122-128. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2014.06.016>.

Wu, S-Y., Duncan, L.W., 2020. Recruitment of an insect and its nematode natural enemy by olfactory cues from a saprophytic fungus. *Soil Biology and Biochemistry* 144, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2020.107781>.

Zavala-Gonzalez, E.A., Escudero, N., Lopez-Moya, F., Aranda-Martinez, A., Exposito, A., Ricaño-Rodríguez, J., Naranjo-Ortiz, M.A., Ramírez-Lepe, M., Lopez-Llorca, L.V., 2015. Some isolates of the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* promote root growth and reduce flowering time of tomato. *Annals of Applied Biology* 166, 472-483. <https://doi.org/10.1111/aab.12199>.

Zhai, Y., Shao, Z., Cai, M., Zheng, L., Li, G., Huang, D., Cheng, W., Thomashow, L.S., Weller, D.M., Yu, Z., Zhang, J., 2018. Multiple modes of nematode control by volatiles of *Pseudomonas putida* 1A00316 from antarctic soil against *Meloidogyne incognita*. *Frontiers in Microbiology* 9, 1-11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00253>.

TERCEIRA PARTE

Artigo de acordo com as normas da revista Rhizosphere.

ARTIGO 2 Fungos nematófagos emitem compostos orgânicos voláteis que interagem com os ovos e juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica*.

Paulo Victor Magalhães Pacheco ^a, Vicente Paulo Campos ^a, Willian César Terra ^a, Marcio Pozzobon Pedroso ^b, Leticia Fagundes Pereira ^b, Letícia Lopes de Paula ^a, Daniele de Brum ^a, Larissa Fernanda Andrade Souza ^a, Pâmella de Sá Caetano ^a.

^a Federal University of Lavras (UFLA), Department of Plant Pathology, 37200-900, Lavras, MG, Brazil. ^b Federal University of Lavras (UFLA), Department of Chemistry, 37200-900, Lavras, MG, Brazil.

RESUMO

O efeito dos compostos orgânicos voláteis (COVs) produzidos por fungos nematófagos na interação com os nematoides parasitas de plantas (NPPs) ainda precisa ser melhor compreendido e explorado. Neste estudo, foi demonstrado por meio de ensaios *in vitro* que a exposição dos ovos de *Meloidogyne javanica* aos COVs emitidos pelos fungos nematófagos *Pochonia chlamydosporia* (Pc), *Purpureocillium lilacinum* (Pl), *Arthrobotrys conoides* (Ac) e *Duddingtonia flagrans* (Df) reduz ($P < 0.05$) a eclosão dos juvenis de segundo estágio (J2) do nematoide. Ensaios de quimiotaxia, *in vitro*, revelaram que os COVs emitidos por Pc, Pl e Ac são atrativos aos J2 de *M. javanica*. Por outro lado, os J2 de *M. javanica* foram repelidos pelos COVs liberados por Df. Por meio da cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM), 22 COVs foram identificados no volatiloma (conjunto de compostos voláteis liberados) desses fungos. A análise de componentes principais separou os fungos em três conjuntos diferentes, sendo um deles composto por *P. lilacinum* e *A. conoides* e outros dois por *D. flagrans* e *P. chlamydosporia*, respectivamente. No ensaio em casa de vegetação, os COVs emitidos por *P. lilacinum* e o composto 1,4-dimetoxibenzeno controlaram ($P < 0.05$) *M. javanica* e não foram tóxicos para as plantas de jiló. Portanto, os COVs liberados por *P. chlamydosporia*, *P. lilacinum*, *A. conoides* e *D. flagrans* participam da interação trófica com *M. javanica*.

Palavras-chave: compostos orgânicos voláteis; controle; fungos nematófagos; nematoide de galhas; quimiotaxia, toxicidade.

ABSTRACT

The effect of volatile organic compounds (VOCs) produced by nematophagous fungi on the interaction with plant parasitic nematodes (PPNs) still needs to be better understood and explored. In this study, it was demonstrated by *in vitro* assays that exposure of *Meloidogyne javanica* eggs to VOCs emitted by the nematophagous fungi *Pochonia chlamydosporia* (Pc), *Purpureocillium lilacinum* (Pl), *Arthrobotrys conoides* (Ac) and *Duddingtonia flagrans* (Df) reduces ($P < 0.05$) the eggs hatching of the nematode. *In vitro* chemotaxis assays revealed that VOCs emitted by Pc, Pl and Ac are attractive to *M. javanica* second-stage juveniles (J2). On the other hand, the *M. javanica* J2 were repelled by the VOCs released by Df. Through gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS), 22 VOCs were identified in the volatilome (set of volatile compounds released) of these fungi. The principal component analysis separated the fungi into three different sets, one of which was composed of *P. lilacinum* and *A. conoides* and the other two by *D. flagrans* and *P. chlamydosporia*, respectively. In the greenhouse test, the VOCs emitted by *P. lilacinum* and the compound 1,4-dimethoxybenzene controlled ($P < 0.05$) *M. javanica* and were not toxic to the eggplant plants. Therefore, the VOCs released by *P. chlamydosporia*, *P. lilacinum*, *A. conoides* and *D. flagrans* participate in the trophic interaction with *M. javanica*.

Keywords: chemotaxis; control; nematophagous fungi; root-knot nematode; toxicity; volatile organic compounds.

1 INTRODUÇÃO

A produtividade agrícola global e a segurança alimentar são constantemente ameaçadas pelos nematoides parasitas de plantas (NPPs). Dentre eles, os nematoides de galhas (RKNs, *Meloidogyne* spp.) são considerados os mais importantes, parasitando praticamente todas as espécies vegetais cultivadas (Jones et al., 2013). Nas últimas décadas, devido a uma tendência mundial, o manejo dos NPPs tem priorizado estratégias de controle ecologicamente corretas, sustentáveis e eficazes. Neste contexto, o potencial dos fungos nematófagos contra os NPPs tem sido amplamente explorado (Yang e Zhang, 2014). No Brasil, por exemplo, vários produtos comerciais, com ingrediente ativo a base de fungos, foram registrados no Ministério de Agricultura Pecuária e Abastecimento nos últimos anos (AGROFIT, 2022). Os fungos nematófagos são habitantes do solo e inimigos naturais dos NPPs. Alguns são parasitas obrigatórios de nematoides, mas a maioria é saprófita facultativo (Al-Ani et al., 2022; Zhang et al., 2020).

O modo de ação dos fungos nematófagos contra os RKNs envolve, principalmente, o parasitismo de ovos e fêmeas e, a predação dos juvenis de segundo estágio (J2), por meio de estruturas especializadas na captura do nematoide. Além disso, os fungos nematófagos produzem compostos voláteis e não voláteis com atividade nematicida (Pacheco et al., 2022).

Compostos orgânicos voláteis (COVs) são moléculas à base de carbono (até C20), com baixo peso molecular (< 400 Da), baixo ponto de ebulição (50-260 °C), baixa solubilidade em água e alta pressão de vapor (102 kPa a 25 °C), evaporando facilmente em temperaturas e pressões atmosféricas normais (Hung et al. 2015, Schmidt et al., 2016; Veselova et al. 2019, Guo et al., 2020; Poveda, 2021; Diyapoglu et al., 2022). Essas características físico-químicas facilitam a difusão desses compostos não só na atmosfera, mas também através dos poros presentes solo e na rizosfera. Dessa forma, eles atuam na interação entre microrganismo em curta e longas distâncias (Schmidt et al., 2015; Veselova et al., 2019; Tilocca et al., 2020). Semioquímicos, como os COVs, produzidos pelos microrganismos como, fungos, bactérias e nematoides atuam nas interações tróficas com os NPPs (Hung et al., 2015; Cheng et al., 2017; Hsueh et al., 2017; Zhai et al., 2018; Wang et al., 2019; Tilocca et al., 2020; Deng et al., 2022).

Apesar de pouco explorado, estudos realizados nos últimos anos começaram a desvendar o efeito dos COVs emitidos por fungos nematófagos sobre os nematoides. Mei et al. (2021) demonstraram que os COVs produzidos por *Duddingtonia flagrans* (CBS565.50) apresentaram forte atividade nematicida contra *M. incognita*. Yu et al. (2021) relataram que os COVs de *D. flagrans* (CBS 349.94) atraíram *Caenorhabditis elegans*. Pacheco et al. (2022)

identificaram que *Pochonia chlamydosporia* (Pc-10) emite COVs atrativos aos J2 de *M. incognita*. Mas ao mesmo tempo, estes voláteis podem ser tóxicos aos ovos e ao J2 de *M. incognita*. De acordo com os resultados apresentados por Estupiñan-López et al., 2018, isolados dos fungos *Fusarium oxysporum* e *F. solani* produziram compostos voláteis com atividade antagônica a *M. incognita*. Hsueh et al. (2017) relataram que *Arthrobotrys oligospora* produz COVs que interfere na quimiotaxia de *Caenorhabditis* sp.

A abundância e a diversidade dos COVs de origem fúngica são menos conhecidas se comparadas aos compostos voláteis de origem bacteriana e vegetal (Hung et al., 2015). Quando se trata do papel ecológico dos COVs produzidos por fungos nematófagos na interação com os NPPs o cenário é ainda mais obscuro. Dessa forma, os objetivos do presente estudo foram: *i*) identificar por meio de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) o volatiloma dos fungos *Purpureocillium lilacinum* isolado UFLA-PL01, *Pochonia chlamydosporia* isolado PC-10, *Duddingtonia flagrans* isolado UFLA-DF01 e *Arthrobotrys conoides* isolado UFLA-AC01; *ii*) avaliar, *in vitro*, a quimiotaxia dos J2 de *M. javanica* aos COVs emitidos por estes fungos; *iii*) avaliar o efeito destes compostos na eclosão dos J2; *iv*) verificar, em estudos *in planta*, o potencial dos COVs emitidos por *P. lilacinum* UFLA-PL01, *P. chlamydosporia* PC-10 e do composto 1,4-dimetoxibenzeno no controle de *M. javanica*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção do inóculo de *M. javanica*

Meloidogyne javanica foi multiplicado em plantas de tomateiro (*Solanum lycopersicum*, cultivar Santa Clara), em casa de vegetação. Os ovos foram extraídos das raízes com galhas e massas de ovos utilizando o método descrito por Hussey e Barker (1973). Os J2 foram obtidos por meio da técnica de funil de Baermann (Baermann, 1917). Os J2 eclodidos nas primeiras 24 h, após o estabelecimento da câmara de eclosão, foram descartados. Para os bioensaios, J2 foram coletados diariamente e armazenados a 8 °C. Foram utilizados apenas J2 coletados em um intervalo de 72 h. A identificação da espécie do nematoide foi confirmada por meio da técnica de eletroforese de isoenzimas observando o fenótipo da enzima esterase (Carneiro e Almeida, 2001).

2.2 Obtenção do inóculo dos fungos nematófagos

Os fungos nematófagos *P. lilacinum* UFLA-PL01 (Pl), *A. conoides* UFLA-AC01 (Ac) e *D. flagrans* UFLA-DF01 (Df) pertencem a coleção micológica do Laboratório de Nematologia da Universidade Federal de Lavras, Brasil. *P. chlamydosporia* Pc-10 (Pc) pertence ao Laboratório de Controle Biológico de Nematoides Parasitas de Plantas da Universidade Federal de Viçosa, Brasil. Todos os isolados foram mantidos em batata-dextrose-ágar (BDA) no escuro a 26 °C. Para os bioensaios, os fungos foram cultivados em BDA por sete dias, nas mesmas condições descritas.

2.3 Quimiotaxia de *M. javanica* aos COVs emitidos por fungos nematófagos

A quimiotaxia de J2 de *M. javanica* aos COVs emitidos por *P. chlamydosporia* (Pc), *P. lilacinum* (Pl), *A. conoides* (Ac) e *D. flagrans* (Df) foi determinada de acordo Bargmann et al. (1993), Wang et al. (2019) e Pacheco et al. (2022) com algumas modificações. Placas de Petri (9 cm) contendo ágar-água (2%) foram divididas em uma área teste (+), uma área controle (-) e uma área neutra (região central). No primeiro bioensaio, um disco (9 mm) com micélio de um dos fungos (Pc, Pl, Ac e Df) foi colocado na área teste (+). Outro disco (9 mm) com apenas BDA, foi colocado na área controle (-). No segundo bioensaio, os fungos foram confrontados entre si nas diferentes combinações possíveis (Pc/Ac, Pc/Df, Pc/Pl, Ac/Df, Ac/Pl, Df/Pl). Um disco com micélio de um dos fungos foi colocado na área teste (+) e outro disco, com micélio do fungo confrontante, foi colocado na área controle (-). Em ambos os bioensaios, 20 µL de uma suspensão aquosa, contendo aproximadamente 100 J2 de *M. javanica*, foram depositados na área neutra de cada placa. Após 16 h em temperatura ambiente, o número de J2 na área teste (+) e na área controle (-) foi quantificado. No primeiro bioensaio, o índice de quimiotaxia (IQ) foi utilizado para comparar os efeitos dos COVs emitidos pelos fungos no comportamento dos J2, em que:
$$IQ = (J2 \text{ na área teste} - J2 \text{ na área controle}) / (J2 \text{ na área teste} + J2 \text{ na área controle})$$
 (Bargmann et al., 1993). Foi considerado altamente atrativo se $IQ \geq 0,2$; pouco atrativo se $0,2 > IQ \geq 0,1$; resposta aleatória se $0,1 > IQ \geq -0,1$; levemente repelente se $-0,1 > IQ > -0,2$ e altamente repelente se $IQ \leq -0,2$ (Wang et al., 2019). No segundo bioensaio, o número de J2 na área teste (+) e na área controle (-) foram contabilizados para determinar a porcentagem (%) de J2 que responderam a algum estímulo.
$$\% \text{ de J2} = (\text{número de J2 na área teste ou controle}) / (\text{número de J2 na área teste} + \text{número de J2 na área controle}) \times 100$$
. Os dois bioensaios foram repetidos por duas vezes, com quatro repetições cada.

2.4 Toxicidade dos COVs emitidos por fungos nematófagos aos ovos de *M. javanica*

Foi avaliado o efeito dos COVs emitidos por *P. chlamydosporia* (Pc), *P. lilacinum* (Pl), *A. conoides* (Ac) e *D. flagrans* (Df) na eclosão de *M. javanica* conforme descrito por Pacheco et al. (2022). Para tanto, em um dos compartimentos de uma placa de Petri com dois compartimentos (90×15 cm), foi adicionado BDA e na sua superfície, um disco (9 mm) contendo micélio de um dos fungos (Pc, Pl, Ac e Df). O outro compartimento permaneceu vazio. Placas contendo apenas BDA (sem fungo) e placas totalmente vazias foram consideradas como controles. Para acúmulo dos COVs, todas as placas foram vedadas com filme de PVC e incubadas no escuro a 26 ° C. Após 5 dias de crescimento fúngico, 3 mL de uma suspensão aquosa contendo 8000 ovos de *M. javanica* foi injetada, com o auxílio de uma seringa, no compartimento vazio. Este procedimento foi possível uma vez que na tampa da placa foi feito um furo, que permaneceu completamente vedado após retirada da agulha. Decorridos 3 dias de exposição dos ovos aos COVs, uma alíquota de 2 mL, contendo aproximadamente 5,333 ovos, foi retirada da placa de Petri e transferida para um microtubo de polipropileno (2 mL). Então, os microtubos foram armazenados por 7 dias em incubadora a 26 ° C. Ao final desse período o número de J2 foi quantificado. Esse bioensaio foi repetido por duas vezes, com 5 repetições por tratamento.

2.5 Caracterização dos COVs emitidos por *P. chlamydosporia*, *P. lilacinum*, *A. conoides* e *D. flagrans* por cromatografia gasosa - espectrometria de massa (CG-EM)

Os COVs emitidos pelos fungos nematófagos, *P. chlamydosporia*, *P. lilacinum*, *A. conoides* e *D. flagrans* foram caracterizados por cromatografia gasosa-espectrometria de massas (CG-EM), no Centro de Análises e Prospecção Química (CAPQ) da Universidade Federal de Lavras – Brasil. O meio BDA (5 mL) e um disco (5 mm) da cultura do fungo foram transferidos para tubos SUPELCO™ SPME (Sigma - Aldrich, Bellefonte, PA, EUA) de 80 × 28 mm com tampa rosqueada acoplada e uma camada de silicone. Os tubos foram vedados com filme PVC e armazenados por 6 dias a 26 °C, no escuro. O controle consistiu de tubos contendo apenas o meio BDA, sem a presença do fungo. Todos os tratamentos foram preparados em triplicatas. Os COVs foram extraídos por microextração em fase sólida no modo *headspace* (HS-SPME). As extrações foram conduzidas com uma fibra de divinilbenzeno, carboxen e polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS), à 55 °C por 35 min e o tempo de dessorção no injetor do GC foi de 2 min. O cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas utilizado foi

um CG-EM QP 2010 Ultra (Shimadzu, Japan), equipado com um sistema automático de injeções de líquidos e gases AOC-5000 (Shimadzu, Japan). Uma coluna RTX-5MS (5% phenyl-95% dimethylsiloxane) 30 m × 0.25 mm × 0.25 µm foi utilizada para separação dos COVs. As temperaturas do injetor, interface e detector de íons foram de 250°C, 240°C e 200°C, respectivamente. As injeções ocorreram no modo splitless e o gás de arraste foi 5.0 He com fluxo de 1.0 mL min⁻¹. A temperatura do forno do CG iniciou a 40°C, sendo acrescida a 3°C min⁻¹ até 160°C, e a 10°C min⁻¹ até 240°C. A identificação dos COVs foi feita comparando os espectros de massas obtidos para as amostras com os espectros da biblioteca da NIST, com auxílio dos softwares Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System (AMDIS) v. 2.6 e Mass Spectral Search Program v. 1.7 (NIST, Washington DC, USA). Foram consideradas similaridades mínimas de 80% entre os espectros. Para complementar a identificação, foram obtidos os índices de retenção experimental (RIExp) dos compostos a partir da injeção de uma série homóloga de alcanos, os quais foram comparados com os índices de retenção reportados na literatura (RI Lit) (Adams 2007; Nist 2013). A área de cada pico identificado é relativa à média das triplicatas.

2.6 Análise de componentes principais (PCA)

Os cromatogramas de íons totais de cada replicata foram organizados em uma matriz com 12 amostras × 6240 sinais cromatográficos. A partir desses resultados, uma análise de componentes principais (PCA) foi realizada por meio do software Chemoface versão 1.64 para obtenção dos gráficos de componentes principais (PC) e de *loadings*. Não foi realizado nenhum alinhamento ou pré-tratamento dos dados previamente à PCA.

2.7 Potenciais de 1,4-dimetoxibenzeno e dos COVs emitidos por *P. chlamydosporia* e *P. lilacinum* no controle de *M. javanica* em casa de vegetação

Para avaliar o efeito dos COVs liberados pelos fungos no controle de *M. javanica* uma técnica foi desenvolvida e descrita a seguir. A parte superior (bico) de uma garrafa de 500 mL de polietileno tereftalato (PET) foi coberta por uma malha plástica com abertura igual a 0.025 mm. Na sequência, a parte inferior da garrafa foi removida (Figura 1). As garrafas foram preenchidas com uma mistura de areia esterilizada (121 °C, pressão de 101 325 kPa por 2 h) e substrato comercial Tropstrato HT Hortaliças[®] na proporção 1:1 (v/v). A seguir, frascos de vidro com volume de 60 mL receberam 10 mL de BDA. Após o resfriamento, um disco (9 mm)

contendo micélio do fungo foi depositado sobre o meio de cultura. A seguir, os frascos foram vedados com filme PVC e armazenados a 26 °C no escuro. Após sete dias, a garrafa PET com o substrato foi acoplada ao frasco de vidro. Filme PVC foi utilizado para garantir a união das duas partes. Em seguida, uma muda de jiló (*Solanum gilo*), com 30 dias após germinação, foi transplantada no substrato, que foi então infestado com 3000 ovos de *M. javanica*. Os tratamentos consistiram de frascos com BDA mais *P. chlamydosporia* ou *P. lilacinum*, frascos sem BDA e frascos que receberam 100 mg de 1,4-dimetoxibenzeno. O controle consistiu de frascos completamente vazios. Após 45 dias da infestação do solo, foram avaliados o peso da raiz, o peso da parte aérea fresca e seca, o número de ovos por raiz e por grama de raiz. Esse ensaio, foi realizado com seis repetições por tratamento.

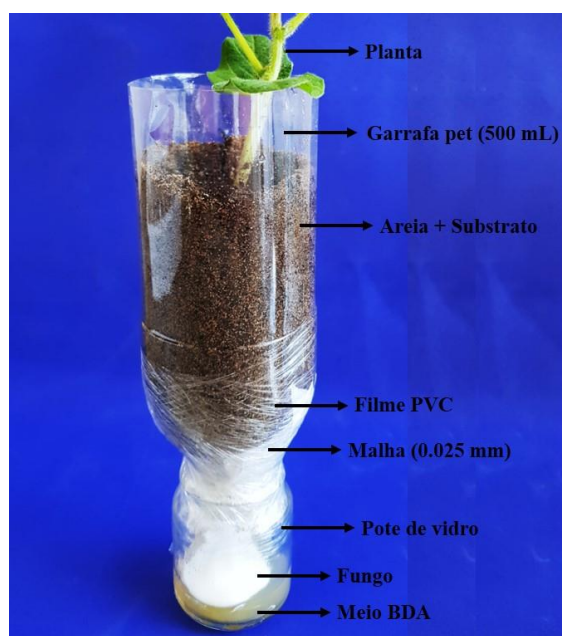


Figura 1: Esquema do bioensaio em frascos de vidro (60 mL) conectados com a parte superior de uma garrafa PET para avaliar o potencial de 1,4-dimetoxibenzeno e dos compostos orgânicos voláteis emitidos por *P. chlamydosporia* e *P. lilacinum* no controle de *Meloidogyne javanica* em jiló (*Solanum gilo*).

2.8 Análise estatística

Todos os ensaios foram organizados em delineamento inteiramente casualizado. Nos ensaios que foram realizados por duas vezes, em tempos distintos, uma análise combinada entre eles foi realizada. Nesse caso, quando $P > 0.05$, os resultados apresentados representam dados combinados (ensaio 1 + ensaio 2). Os dados foram previamente submetidos aos testes de

normalidade (teste de Shapiro-Wilk) e homogeneidade (teste de Bartlett). Em seguida, foi aplicado o teste F por meio de análise de variância (ANOVA). As médias dos bioensaio de quimiotaxia foram submetidas ao teste t de Student ($P < 0.05$). As médias dos outros ensaios foram comparadas pelo teste de Scott-Knott ($P < 0.05$). A análise estatística e a confecção dos gráficos foram realizadas nos softwares RStudio (v.3.6.0) e SigmaPlot® versão 11, respectivamente.

3 RESULTADOS

3.1 Quimiotaxia de *M. javanica* para os COVs emitidos por fungos nematófagos

Os J2 de *M. javanica* foram altamente atraídos ($IQ \geq 0.2$) pelos COVs emitidos por *P. chlamydosporia* (Pc). Os COVs emitidos pelos isolados *P. lilacinum* (Pl) e *A. conoides* (Ac) foram pouco atrativos ($0.1 \leq IQ < 0.2$) aos J2 de *M. javanica*. Os J2 de *M. javanica* foram altamente repelidos ($IQ \leq -0.2$) na presença dos COVs produzidos pelo isolado *D. flagrans* (Df) (Figura 2).

O comportamento dos J2 de *M. javanica* quando expostos simultaneamente aos COVs de dois fungos nematófagos, revelou que os J2 foram repelidos pelos COVs de Df em todas as combinações e atraídos ($P < 0.05$) em direção aos outros fungos (Pc, Pl e Ac) (Figura 3). No entanto, houve uma distribuição uniforme ($P > 0.05$) dos J2 de *M. javanica* quando eles foram colocados em placas contendo Pl e Ac e quando Pl foi confrontado com Ac (Figura 3).

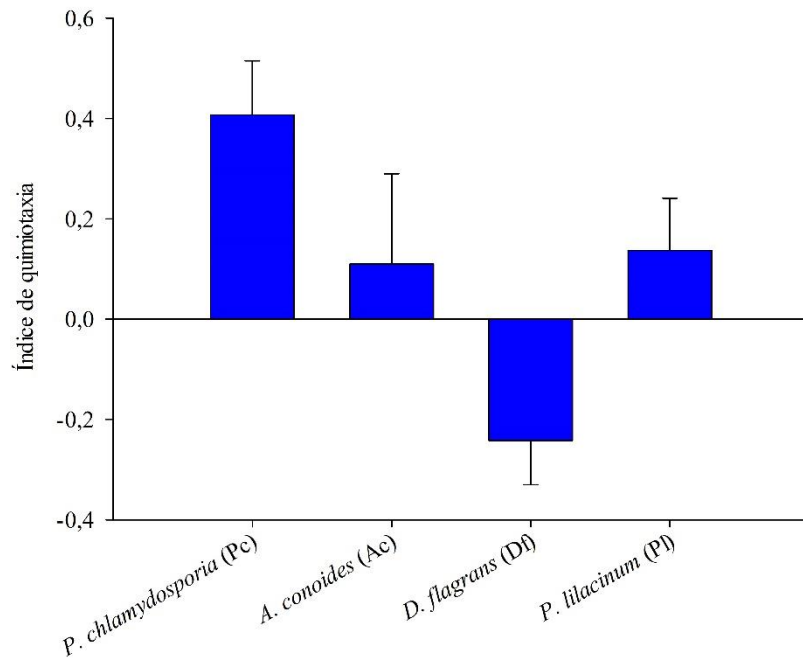


Figura 2: Índice de quimiotaxia de juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* expostos por 16 h aos compostos orgânicos voláteis emitidos pelos fungos nematófagos *Pochonia chlamydosporia* (Pc), *Arthrobotrys conoides* (Ac), *Purpureocillium lilacinum* (Pl) e *Duddingtonia flagrans* (Df). As barras representam o erro padrão. A interação entre os bioensaios não foi significativa ($P > 0.05$). Dessa forma, o resultado agrupado foi apresentado, significando dois experimentos com quatro repetições cada ($n = 8$).

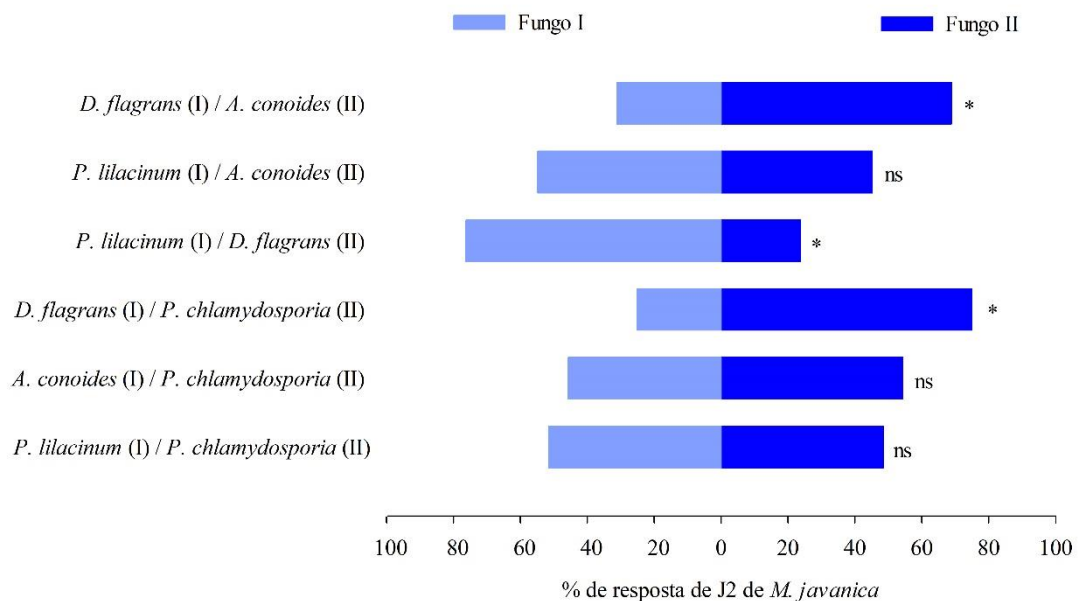


Figura 3: Resposta quimiotática de juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica*

quando expostos por 16 h aos compostos orgânicos voláteis de diferentes fungos nematófagos. Em placas de Petri (9 cm) preenchidas com ágar-água os fungos *Pochonia chlamyosporia* (Pc), *Arthrobotrys conoides* (Ac), *Purpureocillium lilacinum* (Pl) e *Duddingtonia flagrans* (Df) foram colocados em dupla nas diferentes combinações possíveis. A interação entre os bioensaios não foi significativa ($P > 0.05$), então o resultado agrupado foi apresentado, significando dois experimentos com quatro repetições cada ($n = 8$).

3.2 Toxicidade dos COVs emitidos por fungos nematófagos aos ovos de *M. javanica*

Os COVs emitidos por todos os fungos nematófagos reduziram significativamente ($P < 0.05$) a eclosão dos J2 de *M. javanica* ao final de 10 dias em relação aos controles (placa vazia e meio BDA). A exposição dos ovos de *M. javanica* aos COVs de *P. lilacinum* (Pl) resultou na maior toxicidade ($P < 0.05$), reduzindo a eclosão em 90% em relação ao controle (placa vazia). Os COVs de *A. conoides* (Ac) reduziram ($P < 0.05$) a eclosão em 73.5% em relação ao controle (placa vazia). *P. chlamyosporia* (Pc) e *D. flagrans* (Df) reduziram ($P < 0.05$) número de J2 de *M. javanica* eclodidos em 58% em relação ao controle (placa vazia) (Figura 4). Houve diferença significativa no número de J2 de *M. javanica* eclodidos entre os controles com placas vazias e com meio BDA.

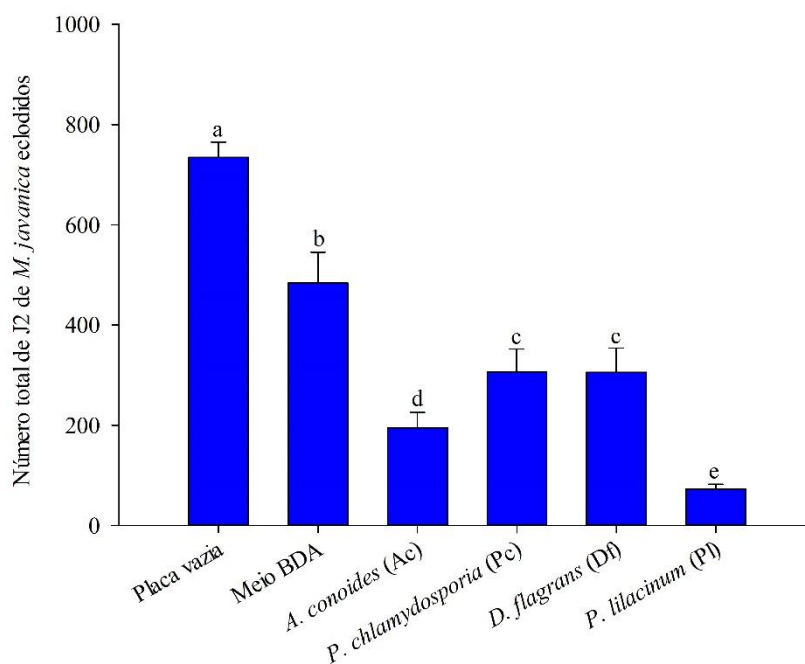


Figura 4: Número total de juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* eclodidos, após exposição dos ovos aos compostos orgânicos voláteis emitidos pelos fungos nematófagos

Pochonia chlamydosporia (Pc), *Arthrobotrys conoides* (Ac), *Purpureocillium lilacinum* (Pl) e *Duddingtonia flagrans* (Df). As barras representam o erro padrão. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($P < 0.05$). A interação entre os bioensaios não foi significativa ($P > 0.05$), então o resultado agrupado significa dois experimentos com cinco repetições cada ($n = 10$).

3.3 Caracterização dos COVs emitidos por *P. chlamydosporia*, *P. lilacinum*, *A. conoides* e *D. flagrans* por CG-EM

Foram identificados 22 COVs a partir das emissões voláteis dos fungos *P. chlamydosporia* (Pc), *P. lilacinum* (Pl), *A. conoides* (Ac) e *D. flagrans* (Df) (Tabela 1). A variedade e a intensidade dos COVs produzidos pelos fungos foram diferentes entre os fungos. Pc produziu 4 compostos (acetona, 1,4-dimetoxibenzeno, α -trans-bergamoteno e β -trans-bergamoteno), Pl produziu 14 compostos (etanol, acetona, 2-metil-1-propanol, 3-metil-1-butanal, 2-metilbutanal, 3-metil-1-butanol, 2-metil-1-butanol, 3-metil-2-pentanona, 2,3-butanodiol, acetato de 3-metil-1-butil, acetato de 2-metil-1-butila, 2-octanona, heptenoato de etila e álcool fenetílico), Ac produziu 11 compostos (acetato de etila, 3-metil-1-butanal, 2-metilbutanal, 3-metil-1-butanol, 2-metil-1-butanol, 3-metil-2-butenato, acetato de 3-metil-1-butil, 1-octen-3-ol, 3-octanona, álcool fenetílico e 1,4-dimetoxibenzeno) e Df produziu 9 compostos (3-metil-1-butanal, 2-metilbutanal, 3-metil-1-butanol, 2-metil-1-butanol, 1-octen-3-ol, 3-octanona, 6-metil-5-hepten-2-ol, álcool fenetílico e 1,4-dimetoxibenzeno).

3.4 Análise de componentes principais (PCA)

Na PCA, os COVs emitidos pelos quatro fungos nematófagos foram representados em um espaço bidimensional conforme os componentes principais (PC) 1 e 2. O gráfico de scores (Figura 5, A) foi capaz de discriminar *P. chlamydosporia* (Pc), *P. lilacinum* (Pl), *A. conoides* (Ac) e *D. flagrans* (Df) em três conjuntos diferentes. Um conjunto formado por Pl e Ac e outros dois conjuntos com Df e Pc, respectivamente, em função da presença de determinados compostos e suas intensidades.

Com relação a PC1 (Figura 5, A), os fungos Ac e Pl agruparam-se mais à esquerda (valores mais negativos), enquanto que Pc e Df agruparam-se mais à direita (valores menos negativos). Na PC2 (Figura 5, A), Pc está localizada na parte inferior (valores mais negativos), enquanto os demais fungos estão acima (valores menos negativos). Dessa forma, os gráficos de

loadings da PC1 e da PC2 (Figura 5, B e C) apresentam os principais compostos responsáveis por esses agrupamentos. Cada um dos números apresentados nas figuras 5B e C, representam um composto químico, conforme tabela 1.

O gráfico de *loadings* da PC1 (Figura 5, A e B), mostra que os compostos etanol (1) e 2-metil-1-propanol (4) foram emitidos em maiores proporções por Pl. Por outro lado, os compostos 3-metil-1-butanol (7) e o 2-metil-1-butanol (8) foram emitidos em maiores proporções por Pl e Ac (Figura 5, A e B). Em menor intensidade, heptenoato de etila (18) foi produzido por Pl e álcool fenetílico (19) por Pl e Ac (Figura 5, A e B). Dessa forma, Pc e Df não produziram ou produziram concentrações muito baixas desses compostos, resultando em amostras situadas em valores menos negativos da PC1 (Figura 5, A e B).

No gráfico de *loadings* da PC2 (Figura 5, A e C), os picos negativos pertencem aos COVs que foram produzidos em maior intensidade por Pc e os picos positivos foram relacionados aos demais fungos. Os compostos α -trans-bergamotene (21) e β -trans-bergamotene (22) foram produzidos exclusivamente por Pc (Figura 5, A e C). Os compostos 1,4-dimetoxibenzeno (20) e acetona (2) foram produzidos em maior intensidade por Pc em comparação aos outros fungos (Figura 5, A e C). Os compostos 3-metil-1-butanol (7), 2-metil-1-butanol (8) e com álcool fenetílico (19) foram produzidos por todos os fungos, com exceção de Pc, e contribuíram para que Pl, Ac e Df ficassem na região mais acima da PC2 e Pc na região mais negativa da PC2 (Figura 5, A e C). Além disso, heptenoato de etila (18) também contribui para que Pl ficasse na região positiva da PC2 (Figura 5, A e C).

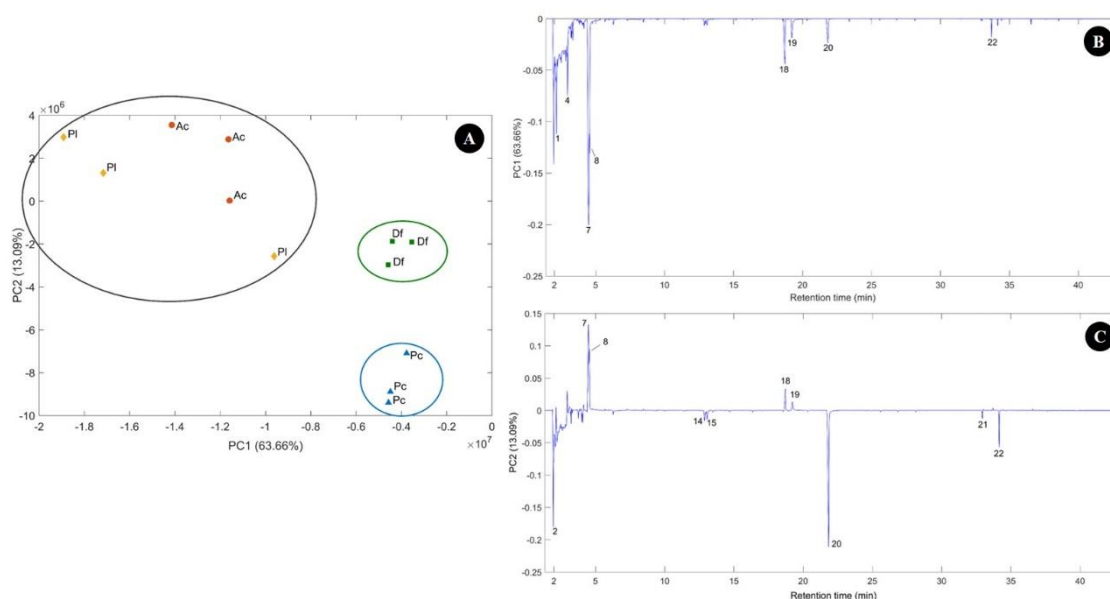


Figura 5: Gráfico de scores (A) e gráficos de loadings (B e C) das componentes principais (PC)

1 e 2 para os compostos orgânicos voláteis (COVs) emitidos por *Pochonia chlamydosporia* (Pc), *Arthrobotrys conoides* (Ac), *Purpureocillium lilacinum* (Pl) e *Duddingtonia flagrans* (Df). Os números apresentados em B e C referem-se aos COVs listados na Tabela 1.

3.5 Potencial de 1,4-dimetoxibenzeno e COVs emitidos por *P. chlamydosporia* e *P. lilacinum* no controle de *M. javanica* em casa de vegetação

Os COVs emitidos por *P. lilacinum* (Pl) e o composto 1,4-dimetoxibenzeno na quantidade de 100 mg reduziram significativamente ($P < 0.05$) a reprodução de *M. javanica*, em 33.5% e 32.6%, respectivamente, em relação ao controle (frascos vazios) (Figura 6). O peso da raiz, da parte aérea fresca e seca de jiló não foram incrementados ($P < 0.05$) na presença dos COVs de *P. chlamydosporia* (Pc) e *P. lilacinum* (Pl) e do composto 1,4-dimetoxibenzeno (100 mg), indicando que esses compostos não foram tóxicos para as plantas de jiló (Figura 7).

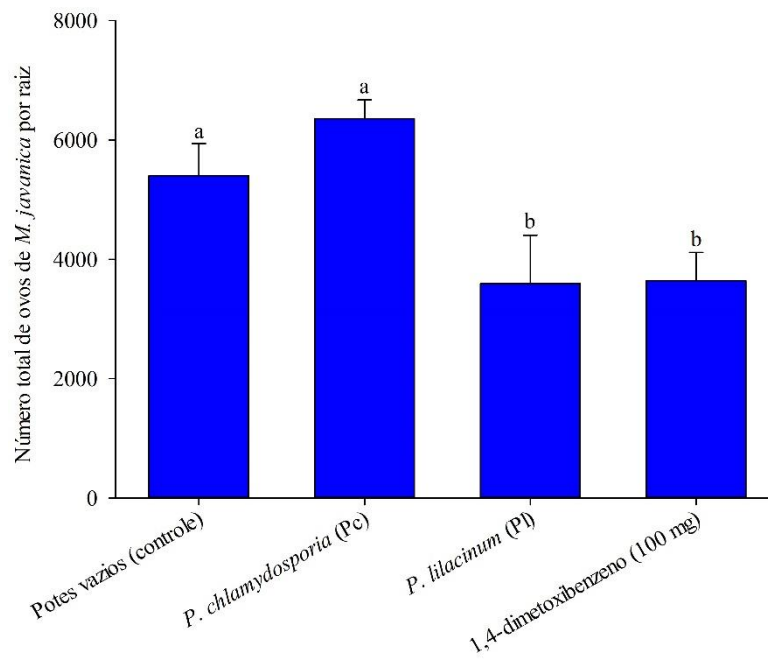


Figura 6: Número de ovos de *Meloidogyne javanica* por raiz de jiló (*Solanum gilo*). Em casa de vegetação, a mistura de areia e substrato comercial, infestada com ovos de *M. javanica*, foi exposta aos compostos orgânicos voláteis (COVs) de *Pochonia chlamydosporia* (Pc) e *Purpureocillium lilacinum* (Pl) e ao composto 1,4-dimetoxibenzeno por 45 dias. As barras representam o erro padrão. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ($P < 0.05$).

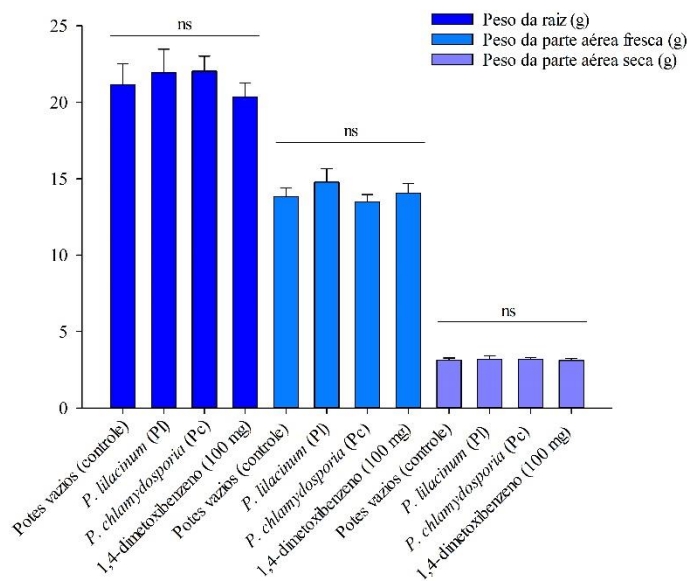


Figura 7: Peso da raiz, da parte aérea fresca e seca de jiló. Em casa de vegetação, a mistura de areia e substrato comercial, infestada com ovos de *M. javanica*, foi exposta aos compostos orgânicos voláteis (COVs) de *Pochonia chlamydosporia* (Pc) e *Purpureocillium lilacinum* (Pl) e ao composto 1,4-dimetoxibenzeno por 45 dias. As barras representam o erro padrão. ns = não significativo pelo teste de Scott-Knott ($P > 0.05$).

4 DISCUSSÃO

Os fungos em geral emitem uma grande diversidade de compostos voláteis que atuam em vários processos ecológicos e biológicos (Hung et al., 2015). Os estudos conduzidos por Liarzi et al. (2016), Pacheco et al. (2022) e Terra et al. (2018) relataram o papel desses compostos, isolados ou em mistura, na interação com NPPs. No entanto, pouco tem sido estudado sobre o efeito dos COVs emitidos pelos fungos nematófagos sobre os NPPs. Ademais, o volatiloma (conjunto de compostos voláteis liberado pelo fungo) destes fungos ainda não foi totalmente desvendado. No presente trabalho, foi demonstrado que os COVs emitidos por *P. chlamydosporia* (Pc), *P. lilacinum* (Pl), *A. conoides* (Ac) e *D. flagrans* (Df) são diversificados e consistem em um sinal químico ao J2 de *M. javanica*, interferindo na quimiotaxia do nematoide. Contudo, ao mesmo tempo, esses compostos inibem a eclosão do J2 de *M. javanica*. Além disso, foi evidenciado que os COVs emitidos por Pl e o composto 1,4-dimetoxibenzeno apresentam potenciais para serem utilizados no controle de *M. javanica* em jiló.

Vários estudos demonstraram que os NPPs são sensíveis aos COVs emitidos por

microrganismos, podendo ser observado os comportamentos de atração, repelência ou toxicidade (Cheng et al., 2017; Mei et al., 2021; Wang et al., 2019; Zhai et al., 2018). Nos ensaios *in vitro* realizados no presente estudo verificou-se que os COVs emitidos pelas quatro espécies fúngicas (Pc, Pl, Ac e Df) foram tóxicos aos ovos de *M. javanica* e corroborando com os resultados apresentados por Pacheco et al. (2022). Se no ambiente natural, os COVs produzidos por Pc e Pl, especializados em parasitar ovos, forem capazes de manter o inóculo de *M. javanica* no estágio de ovo, a eficiência do parasitismo destes fungos poderá ser potencializada.

Pelo ponto de vista ecológico, a atração dos J2 de *M. javanica* aos COVs emitidos por Ac, facilitaria a captura do nematoide pelo fungo. Além disso, a presença do nematoide induz a morfogênese do fungo, mudando o estilo de vida saprofítico para o predatório (Hsueh et al., 2013). Em contrapartida, os nematoides também desenvolveram sistemas nervosos sofisticados para detectar e evitar os fungos predadores (Zhang et al., 2020), o que justificaria a repelência observada dos J2 de *M. javanica* em relação aos COVs emitidos por Df. No entanto, Yu et al. (2021) demonstraram que *D. flagrans* (CBS 349.94) produziu COVs que atraem *C. elegans*

Dos 22 COVs emitidos por Pl, Ac, Pc e Df, o potencial atrativo, repulsivo e tóxico de alguns deles para os nematoides tem sido relatado na literatura (Tabela 1). Estudos realizados por pesquisadores de diferentes regiões do mundo indicam que a acetona, acetato de etila e 1,4-dimetoxibenzeno são compostos capazes de atrair os J2 de *Meloidogyne incognita* (Cheng et al., 2017; Pacheco et al., 2022; Shivakumara et al., 2019). Os compostos 2-metil-1-butanol e 6-metil-5-hepten-2-ol foram atraentes ao nematoide *C. elegans* (Höckelmann et al., 2004; Hsueh et al., 2017). Zhai et al. (2018) relataram que o composto 2-octanona repele o J2 de *M. incognita*. Por outro lado, os compostos 1-octen-3-ol e 3-octanona, em baixas concentrações, atraem os J2 de *Meloidogyne hapla* (Khoja et al., 2021). Esses mesmos compostos em altas concentrações são repelentes a *M. hapla* (Khoja et al., 2021). Alguns desses compostos (Tabela 1) também apresentam atividades nematocidas como é o caso do etanol, acetato de etila, 2-metil-1-propanol, 3-metil-1-butanol, 2-metil-1-butanol, acetato de 3-metil-1-butila, acetato de 2-metil-1-butila, 1-octen-3-ol, 3-octanona, 2-octanona e 1,4-dimetoxibenzeno (Khoja et al., 2021; Liarzi et al., 2016; Pacheco et al., 2022; Silva et al., 2017; Silva et al., 2020; Terra et al., 2018; Zhai et al., 2018) (Tabela 1). É importante salientar que a produção de COVs por microrganismos é complexa e dinâmica (Hung et al., 2015; Tilocca et al., 2020; Wang et al., 2013). Além disso, vários fatores (fisiológicos, genéticos e ambientais) podem interferir na concentração e na composição dos COVs emitidos pelos microrganismos e consequentemente na capacidade de controlar os NPPs (Ezra e Strobel, 2003; Hung et al., 2015; Misztal et al.,

2018; Wang et al., 2019; Lozano-Soria et al., 2020; Tilocca et al., 2020; Mäki et al., 2021).

No presente estudo *in planta*, apenas os COVs de PI e o composto 1,4-dimetoxibenzeno reduziram o número de ovos de *M. javanica* (Figura 6). Pacheco et al. (2022) já haviam relatado a atividade nematicida fumigante e não fumigante de 1,4-dimetoxibenzeno contra *M. incognita*. Mas os COVs produzidos por PI foram mais eficientes em afetar a eclosão (*in vitro*) dos J2 e controlar *M. javanica* em jiló em relação aos compostos voláteis de Pc. Esses resultados permitem inferir que o volatiloma proveniente de PI, nas condições experimentais desse estudo, foi mais tóxico ao nematoide. Esta é a primeira evidência do efeito isolado dos COVs de PI e de 1,4-dimetoxibenzeno, na supressão de *M. javanica*, em casa de vegetação. Por outro lado, os compostos voláteis também podem estimular o crescimento das plantas ou causar fitotoxicidade (Nieto-Jacobo et al., 2017; Silva et al., 2021). Nossos resultados revelaram que os COVs produzidos por PI e Pc e o composto 1,4-dimetoxibenzeno não foram tóxicos para as plantas de jiló, mas, ao mesmo tempo, não foi observado promoção de crescimento nas plantas. Lee et al. (2015) relataram que a promoção do crescimento de *Arabidopsis thaliana* pelos COVs de *Trichoderma atroviride* (GJS 01-209) é dependente da idade da planta e da cultura fúngica.

Os fungos nematófagos são classificados, com base no mecanismo de ação, em: predadores (capturam nematoides), endoparasitas, parasitas de ovos e produtores de metabólicos tóxicos (Al-Ani et al., 2022; Zhang et al., 2020). Df e Ac pertencem ao grupo dos fungos que produzem estruturas especializadas na captura dos nematoides (armadilhas) (Balbino et al., 2022; Yang et al., 2007). Já Pc e PI são fungos que parasitam ovos e fêmeas sedentárias (Manzanilla-López et al., 2013; Xie et al., 2016). Nesse trabalho não houve uma correlação entre o mecanismo de ação dos fungos com a análise de componentes principais (PCA). PI e Ac formaram um agrupamento, Df e Pc formaram outros dois agrupamentos, separadamente. Por outro lado, os agrupamentos formados na PCA pelos fungos nematófagos podem ser associados aos resultados obtidos no teste de eclosão (Figura 4), no qual PI e Ac foram os fungos que causaram maior toxicidade aos ovos de *M. javanica*. O agrupamento formado por PI e Ac pode ser atribuído principalmente aos compostos 3-metil-1-butanol, 2-metil-1-butanol e álcool fenetílico que são produzidos em maior quantidade por esses fungos quando comparados aos demais. Liarzi et al. (2016) relataram que 3-metil-1-butanol e 2-metil-1-butanol são tóxicos a *M. javanica*. Dessa forma, é possível associar a maior toxicidade de PI e Ac a presença desses compostos. Os compostos etanol, 2-metil-1-propanol e o heptenoato de etila são produzidos apenas por PI, o que explicaria a maior toxicidade sobre *M. javanica*. Com exceção do heptenoato de etila, a atividade nematicida do etanol foi relatada para *M. incognita* e *Heterodera glycines* e a do composto 2-metil-1-propanol apenas para *M. incognita* (Pedroso

et al., 2019; Silva et al., 2020; Silva et al., 2017).

O fungo Pc, situado na região menos negativa da PC1 e mais negativa da PC2, apresentou a maior capacidade em atrair os J2 de *M. javanica* em comparação com Pl, Ac e Df. Verifica-se uma grande influência dos compostos acetona, 1,4-dimetoxibenzeno, α -trans-bergamotene e β -trans-bergamotene, produzidos em maior quantidade por Pc, na sua separação na PCA. Pacheco et al. (2022) relataram que J2 de *M. incognita* foram atraídos por diferentes concentrações (1 a 10000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) de 1,4-dimetoxibenzeno. A acetona também é atraente para *M. incognita* (Cheng et al., 2017).

5 CONCLUSÕES

Os fungos nematófagos *P. chlamydosporia* (Pc), *P. lilacinum* (Pl), *A. conoides* (Ac) e *D. flagrans* (Df) emitiram 22 COVs diferentes que reduziram a eclosão dos J2 de *M. javanica*. Na quimiotaxia os COV de Pc e Df atraíram e repeliram fortemente os J2 de *M. javanica*, respectivamente. Os COVs emitidos por Pl reduziram significativamente o número de ovos de *M. javanica* em raízes de jiló, ao mesmo nível do composto 1,4-dimetoxibenzeno, e sem causar fitotoxidez a planta.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio financeiro e bolsas da: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

Tabela 1. Compostos orgânicos voláteis identificados nos volatílomas de *Arthrotrrys conoides* (Ac), *Duddingtonia flagrans* (Df), *Pochonia chlamydosporia* (Pc) e *Purpureocillium lilacinum* (Pl) por cromatografia gasosa–espectrometria de massa (CG-EM), quimiotaxia e atividade nematocida desses COVs.

Nº do composto	Compostos	Nº CAS	IR (exp.)	IR (lit.)	Ac	Df	Pc	Pl	Quimiotaxia	Atividade nematocida	Referências
1	Etanol	64-17-5	-	427				1141709		x	Silva et al., 2017; Pedroso et al., 2020
2	Acetona	67-64-1	-	545			515761	144336	A		Cheng et al., 2017
3	Acetato de etila	141-78-6	609	606	538255				A	x	Terra et al., 2018; Shivakumara et al., 2019
4	2-metil-1-propanol	78-83-1	612	622				1763924		x	Silva et al., 2019
5	3-metil-1-butanal	590-86-3	649	658	180384	692491		64788			
6	2-metil-1-butanal	96-17-3	656	654	244055	230195		204676			
7	3-metil-1-butanol	123-51-3	731	731	3706944	529026		3597613		x	Liarzi et al., 2016
8	2-metil-1-butanol	137-32-6	734	724	1855184	268654		1911607	A	x	Liarzi et al., 2016; Hsueh et al., 2017
9	3-metil-2-pentanona	565-61-7	746	752				161088			
10	2,3-butanodiol	513-85-9	788	785				295877			
11	3-metil-2-butenolato	924-50-5	839	831	97577						
12	acetato de 3-metil-1-butila	123-92-2	873	869	39798			83489		x	Terra et al., 2018
13	acetato de 2-metil-1-butila	624-41-9	874	869				21345		x	Terra et al., 2018
14	1-octen-3-ol	3391-86-4	979	974	104415	1063213			A ¹ / R ¹	x	Khoja et al., 2021
15	3-octanona	106-68-3	984	979	42826	558223			A ¹ / R ¹	x	Khoja et al., 2021
16	2-octanona	111-13-7	989	988				96311	R	x	Zhai et al., 2018
17	6-metil-5-hepten-2-ol	1569-60-4	993	989		83930			A		Höckelmann et al., 2004.
18	Heptenoato de etila	-	1102	-				1043698			
19	Fenil álcool	60-12-8	1114	1107	1181437	55492		547130			
20	1,4-dimetoxibenzeno	150-78-7	1168	1170	154081	111240	2778624		A	x	Pacheco et al., 2022
21	α-trans-bergamoteno	13474-59-4	1438	1432			49045				

22 β -trans-bergamoteno 15438-94-5 1488 1479 181387

IR (exp.) = índice de retenção experimental. IR (lit.) = índice de retenção de literatura. A = atração. A¹ = atraente em baixas concentração. R = repelente. R¹ = repelente em altas concentração. x = atividade nematicida relatada na literatura.

REFERÊNCIAS

Adams, R.P. 2007. Identification of essential oil components by gas chromatography /mass spectrometry, 4th edn. Allured Publishing, Corporation, Carol Stream.

AGROFIT. Sistemas de agrotóxicos fitossanitários. Disponível em: https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em 23 de outubro de 2022.

Al-Ani, L.K.T., Soares, F.E.F., Sharma, A., Santos-Villalobos, S., Valdivia-Padilla, A.V., Aguilar-Marcelino, L., 2022. Strategy of nematophagous fungi in determining the activity of plant parasitic nematodes and their prospective role in sustainable agriculture. *Frontiers in Fungal Biology* 3, 863198. <https://doi.org/10.3389/ffunb.2022.863198>.

Balbino, H.M., Gouveia, A.S., Monteiro, T.S.A., Morgan, T., Freiras, L.G., 2022. Overview of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans*. *Biocontrol Science and Technology*, 1-19. <https://doi.org/10.1080/09583157.2022.2094891>.

Bargmann, C.I., Hartweg, E., Horvitz, H.R., 1993. Odorant-selective genes and neurons mediate olfaction in *C. elegans*. *Cell Press* 74, 515–527. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)80053-H](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)80053-H).

Carneiro, R.M.D.G., Almeida, M.R.A., 2001. Técnica de eletroforese usada no estudo de enzimas dos nematoides de galhas para identificação de espécies. *Nematologia Brasileira* 25, 35–44.

Cheng, W., Yang, J., Nie, Q., Huang, D., Yu, C., Zheng, L., Cai, M., Thomashow, L.S., Weller, D.M., Yu, Z., Zhang, J., 2017. Volatile organic compounds from *Paenibacillus polymyxa* KM2501-1 control *Meloidogyne incognita* by multiple strategies. *Scientific Reports* 7, 16213. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16631-8>.

Deng, X., Wang, X., Li, G., 2022. Nematicidal effects of volatile organic compounds from microorganisms and plants on plant-parasitic nematodes. *Microorganisms* 10, 1201. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10061201>.

Diyapoglu, A., Oner, M., Meng, M., 2022. Application potential of bacterial volatile organic compounds in the control of root-knot nematodes. *Molecules* 27, 4355. <https://doi.org/10.3390/molecules27144355>.

Estupiñan-López, L., Campos, V.P., Silva Júnior, J.C., Pedroso, M.P., Terra, W.C., Silva, J.C.P., Paula, L.L., 2018. Volatile compounds produced by *Fusarium* spp. isolated from *Meloidogyne paranaensis* egg masses and corticous root tissues from coffee crops are toxic to *Meloidogyne incognita*. *Tropical Plant Pathology* 43, 183–193. <https://doi.org/10.1007/s40858-017-0202-0>.

Ezra, D., Strobel, G.A., 2003. Effect of substrate on the bioactivity of volatile antimicrobials produced by *Muscodor albus*. *Plant Science* 165, 1229-1238. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(03\)00330-3](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(03)00330-3).

Guo, Y., Jud, W., Ghirardo, A., Antritte, F., Benz, J.P., Schnitzler, J.P., Rosenkranz, M., 2020. Sniffing fungi – phenotyping of volatile chemical diversity in *Trichoderma* species. *New Phytologist* 227, 244-259. <https://doi.org/10.1111/nph.16530>.

Höckelmann, C., Moens, T., Jüttner, F., 2004. Odor compounds from cyanobacterial biofilms acting as attractants and repellents for free-living nematodes. *Limnology and Oceanography* 49, 1809-1819. <https://doi.org/10.4319/lo.2004.49.5.1809>.

Hsueh, Y.P., Mahanti, P., Schroeder, F.C., Sternberg, P.W., 2013. Nematode-trapping fungi eavesdrop on nematode pheromones. *Current Biology* 23, 83-86. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.11.035>.

Hsueh, Y.P., Gronquist, M.R., Schwarz, E.M., Nath, R.D., Lee, C.H., Gharib, S., Schroeder, F.C., Sternberg, P.W., 2017. Nematophagous fungus *Arthrobotrys oligospora* mimics olfactory cues of sex and food to lure its nematode prey. *eLife* 6, e20023. <https://doi.org/10.7554/eLife.20023>.

Hung, R., Lee, S., Bennett, J.W., 2015. Fungal volatile organic compounds and their role in ecosystems. *Applied Microbiology and Biotechnology* 99, 3395-3405. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6494-4>.

Jones, J.T., Haegeman, A., Danchin, E.G.J., Gaur, H.S., Helder, J., Jones, M.G.K., Kikuchi, T., Manzanilla-López, R., Palomares-Rius, J.E., Wesemael, W.M.L., Perry, R.N., 2013. Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 14, 946-961. <https://doi.org/10.1111/mpp.12057>.

Khoja, S., Eltayef, K.M., Baxter, I., Myrta, A., Bull, J.C., Butt, 2021. Volatiles of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium brunneum*, attract and kill plant parasitic nematodes. *Biological Control* 152, 104472. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104472>.

Lee, S., Hung, R., Yap, M., Bennett, J.W., 2015. Age matters: the effects of volatile organic compounds emitted by *Trichoderma atroviride* on plant growth. *Archives of Microbiology* 197, 723-727. <https://doi.org/10.1007/s00203-015-1104-5>.

Liarzi, O., Bucki, P., Miyara, S.B., Ezra, D., 2016. Bioactive volatiles from an endophytic *Daldinia cf. concentrica* isolate affect the viability of the plant parasitic nematode *Meloidogyne javanica*. *PLoS One* 11(12): e0168437. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168437>.

Lozano-Soria, A., Picciotti, U., Lopez-Moya, F., Lopez-Cepero, J., Porcelli, F., Lopez-Llorca, L.V., 2020. Volatile organic compounds from entomopathogenic and nematophagous fungi, repel banana black weevil (*Cosmopolites sordidus*). *Insects* 11, 509. <https://doi.org/10.3390/insects11080509>.

Mäki, M., Mali, T., Hellén, H., Heinonsalo, J., Lundell, T., Bäck, J., 2021. Deadwood substrate and species-species interactions determine the release of volatile organic compounds by wood-decaying fungi. *Fungal Ecology* 54, 101106. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2021.101106>.

Manzanilla-López, R.H., Esteves, I., Finetti-Sialer, M.M., Hirsch, P.R., Ward, E., Devonshire,

- J., Hidalgo-Díaz, L., 2013. *Pochonia chlamydosporia*: advances and challenges to improve its performance as a biological control agent of sedentary endo-parasitic nematodes. *Journal of Nematology* 45, 1–7.
- Mei, X., Wang, X., Li, G., 2021. Pathogenicity and volatile nematicidal metabolites from *Duddingtonia flagrans* against *Meloidogyne incognita*. *Microorganisms* 9, 2268. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9112268>.
- Misztal, P.K., Lymeropoulou, D.S., Adams, R.I., Scott, R.A., Lindow, S.E., Bruns, T., Taylor, J.W., Uehling, J., Bonito, G., Vilgalys, R., Goldstein, A.H., 2018. Emission factors of microbial volatile organic compounds from environmental bacteria and fungi. *Environmental Science & Technology* 52, 8272-8282. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b00806>.
- Nieto-Jacobo, M.F., Steyaert, J.M., Salazar-Badillo, F.B., Nguyen, D.V., Rostás, M., Braithwaite, M., Souza, J.T., Jimenez-Bremont, J.F., Ohkura, M., Stewart, A., Mendoza-Mendoza, A., 2017. Environmental growth conditions of *Trichoderma* spp. affects indole acetic acid derivatives, volatile organic compounds, and plant growth promotion. *Frontiers in Plant Science* 8, 102. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00102>.
- Pacheco, P.V.M., Campos, V.P., Terra, W.C., Pedroso, M.P., Paula, L.L., Silva, M.S.G., Monteiro, T.S.A., Freitas, L.G., 2022. Attraction and toxicity: Ways volatile organic compounds released by *Pochonia chlamydosporia* affect *Meloidogyne incognita*. *Microbiological Research* 255, 126925. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126925>.
- Pedroso, L.A., Campos, V.P., Barros, A.F., Silva, J.C.P., Assis, G.M., Ribeiro, C.R., 2020. Nematicidal activity of ethanol solutions on soybean cyst nematode *Heterodera glycines*. *Nematology* 22, 111-121. <https://doi.org/10.1163/15685411-00003288>.
- Poveda, J., 2021. Beneficial effects of microbial volatile organic compounds (MCOVs) in plants. *Applied Soil Ecology* 168, 104118. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2021.104118>.
- Schmidt, R., Cordovez, V., Boer, W., Raaijmakers, J., Garbeva, P., 2015. Volatile affairs in microbial interactions. *The ISME Journal* 9, 2329-2335. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.42>.
- Schmidt, R., Etalo, D.W., Jager, V., Gerards, S., Zweepers, H., Boer, W., Garbeva, P., 2016. Microbial small talk: volatiles in fungal–bacterial interactions. *Frontiers in Microbiology* 6, 1495. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01495>.
- Shivakumara, T.N., Dutta, T.K., Chaudhary, S., Reuss, S.H.V., Williamson, V.M., Rao, U., 2019. Homologs of *Caenorhabditis elegans* chemosensory genes have roles in behavior and chemotaxis in the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 32, 876–887. <https://doi.org/10.1094/MPMI-08-18-0226-R>.
- Silva, J.C.P., Campos, V.P., Freire, E.S., Terra, W.C., Estupiñan-López, L., 2017. Toxicity of ethanol solutions and vapours against *Meloidogyne incognita*. *Nematology* 19, 271-280. <https://doi.org/10.1163/15685411-00003046>.
- Silva, M.F., Campos, V.P., Barros, A.F., Terra, W.C., Pedroso, M.P., Gomes, V.A., Ribeiro, C.R., Silva, F.J., 2020. Volatile emissions of watercress (*Nasturtium officinale*) leaves and

passion fruit (*Passiflora edulis*) seeds against *Meloidogyne incognita*. Pest Management Science 76, 1413-1421. <https://doi.org/10.1002/ps.5654>.

Silva, M.S.G., Campos, V.P., Terra, W.C., Pacheco, P.V.M., Paula, L.L., Barros, A.F., Pedroso, M.P., 2021. Volatile fatty acids from whey volatilome as potential soil fumigants to control *Meloidogyne incognita*. Crop Protection 143, 105567. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2021.105567>.

Terra, W.C., Campos, V.P., Martins, S.J., Costa, L.S.A.S., Silva, J.C.P., Barros, A.F., Estupiñan-López, L., Santos, T.C.N., Smant, G., Oliveira, D.F., 2018. Volatile organic molecules from *Fusarium oxysporum* strain 21 with nematicidal activity against *Meloidogyne incognita*. Crop Protection 106, 125–131. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2017.12.022>.

Tilocca, B., Cao, A., Migheli, Q., 2020. Scent of a killer: microbial volatilome and its role in the biological control of plant pathogens. Frontiers in Microbiology 11, 41. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00041>.

Veselova, M.A., Plyuta, V.A., Khmel, I.A., 2019. Volatile compounds of bacterial origin: structure, biosynthesis, and biological activity. Microbiology 88, 261-274. <https://doi.org/10.1134/S0026261719030160>.

Xie, J., Li, S., Mo, C., Xiao, X., Peng, D., Wang, G., Xiao, Y., 2016. Genome and transcriptome sequences reveal the specific parasitism of the nematophagous *Purpureocillium lilacinum* 36-1. Frontiers in Microbiology 7, 1084. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01084>.

Wang, P., Sun, Y., Yang, L., Hu, Y., Li, J., Wang, J., Zhang, F., Liu, Y., 2019. Chemotactic responses of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* to *Streptomyces plicatus*. FEMS Microbiology Letters 366, fnz234. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnz234>.

Wang, C., Wang, Z., Qiao, X., Li, Z., Li, F., Chen, M., Wang, Y., Huang, Y., Cui, H., 2013. Antifungal activity of volatile organic compounds from *Streptomyces alboflavus* TD-1. FEMS Microbiology Letters 341, 45-51. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12088>.

Yang, J., Li, J., Liang, L., Tian, B., Zhang, Y., Cheng, C., Zhang, K.Q., 2007. Cloning and characterization of an extracellular serine protease from the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys conoides*. Archives of Microbiology 188, 167-174. <https://doi.org/10.1007/s00203-007-0233-x>.

Yang, J., Zhang, K.Q. Biological control of plant-parasitic nematodes by nematophagous fungi. In: Zhang, K.Q., Hyde, K.D. (Eds). Nematode-trapping fungi. Springer, p.231-262, 2014.

Yu, X., Hu, X., Pop, M., Wernet, N., Kirschhöfer, F., Brenner-Weiß, G., Keller, J., Bunzel, M., Fischer, R., 2021. Fatal attraction of *Caenorhabditis elegans* to predatory fungi through 6-methyl-salicylic acid. Nature Communications 12, 5462. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25535-1>.

Zhai, Y., Shao, Z., Cai, M., Zheng, L., Li, G., Huang, D., Cheng, W., Thomashow, L.S., Weller, D.M., Yu, Z., Zhang, J., 2018. Multiple modes of nematode control by volatiles of *Pseudomonas putida* 1A00316 from antarctic soil against *Meloidogyne incognita*. Frontiers in

Microbiology 9, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00253>.

Zhang, Y., Li, S., Li, H., Wang, R., Zhang, K.Q., Xu, J., 2020. Fungi-nematode interactions: diversity, ecology, and biocontrol prospects in agriculture. *Journal of Fungi* 6, 206. <https://doi.org/10.3390/jof6040206>.