



**WILLIAN CÉSAR TERRA**

**Meios de cultura, água ou nutrientes adicionados ao solo na produção  
de compostos orgânicos voláteis pela microbiota natural e por  
*Fusarium oxysporum* tóxicos à *Meloidogyne incognita***

**LAVRAS – MG**

**2012**

**WILLIAN CÉSAR TERRA**

**Meios de cultura, água ou nutrientes adicionados ao solo na produção  
de compostos orgânicos voláteis pela microbiota natural e por  
*Fusarium oxysporum* tóxicos à *Meloidogyne incognita***

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

Orientador

Dr. Vicente Paulo Campos

**LAVRAS – MG**

**2012**

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

Terra Willian César.

Meios de cultura, água ou nutrientes adicionados ao solo, na produção de compostos orgânicos voláteis pela microbiota natural e por *Fusarium oxysporum* tóxicos a *Meloidogyne incognita* / Willian César Terra. – Lavras : UFLA, 2012.

37 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.

Orientador: Vicente Paulo Campos.

Bibliografia.

1. Fitonematoides. 2. Controle. 3. COVs. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 632.65182

**WILLIAN CÉSAR TERRA**

**Meios de cultura, água ou nutrientes adicionados ao solo na produção  
de compostos orgânicos voláteis pela microbiota natural e por  
*Fusarium oxysporum* tóxicos à *Meloidogyne incognita***

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

APROVADA em 31 de Julho de 2012.

Prof<sup>a</sup> Dr. Maria Alves Ferreira

UFLA

Prof<sup>a</sup> Dr. Regina Cássia Ferreira

UNIMONTES

Orientador  
Dr. Vicente Paulo Campos

**LAVRAS - MG  
2012**

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, pela oportunidade desta vida, por todo o conhecimento, vivência e amadurecimento conquistados nesta linda, difícil e gratificante caminhada.

Aos meus pais Júlio César Terra e Tereza Cândida da Silva Terra por tudo, a minha irmã Amanda Terra e todos os familiares.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), por me acolher neste tempo intenso de dois anos de mestrado e ao CNPq pela bolsa de estudo.

Ao Prof. Dr. Vicente Paulo Campos, pela orientação, compreensão, paciência e por todos os ensinamentos.

Aos demais professores dos DFP/UFLA e aos funcionários do Departamento de Fitopatologia, pela competência em realizar seus trabalhos.

Aos amigos da nematologia Eduardo Souza Freire, Júlio Carlos, Renata Canuto, Lilian Simara, Cléber, Tarlei, Aline, Davi, Lívia, Esdras Henrique, Felipe, Marina, Luma e Arinaldo pela companhia neste período, pela paciência, apoio. E especialmente, a Taísa pela ajuda nos experimentos.

Aos grandes e saudosos amigos Samuel, Alisson, Bruno Montoani, Glauco, Fábio, André, Eugênio, Fabiano, Gustavo, Helon, Ana Karla e Fernando.

À Marcela pela convivência e pelo carinho.

## RESUMO

Os compostos orgânicos voláteis (COVs) são produzidos pela microbiota do solo, bem como por micro-organismos cultivados em meio de cultura. Porém, a toxicidade desses COVs a fitonematoides é pouco conhecida. Por isso, estudou-se a toxicidade de COVs e da água exposta a eles, a juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita*, bem como o período de exposição de J2 aos COVs produzidos por isolados de *Fusarium oxysporum* quando cultivados em meios com quantidades e fontes diferentes de carbono e nitrogênio. Empregaram-se, nesses ensaios, a técnica desenvolvida com placas bipartidas. Em outros ensaios, em que os COVs tóxicos a J2 de *M. incognita* emitidos pelo solo incorporado com carbono e umidades diferentes foram estudados através da técnica desenvolvida com tubo Supelco® e em copos plásticos. Dos meios utilizados no crescimento de *F. oxysporum* (YES, MA, MAE e SNA) apenas o YES, classificado como muito rico em carbono emitiu COVs que causaram 100% de imobilidade dos J2. Todos os isolados de *F. oxysporum* cultivados em meio YES em que a cultura foi mantida hermética por 3 e 6 dias, os COVs ali acumulados causaram 100% de imobilidade nos J2 a partir de 3 horas de exposição; e a água exposta a esses COVs, bem como aqueles emitidos em meio com peptona crescido com o mesmo fungo causaram 100% de imobilidade dos J2 a partir de 1 h de exposição. Os COVs oriundos da adição de ingredientes dos meios MA, MAE, YES a areia lavada e autoclavada com umidade de 43% e 70% da capacidade de campo (CC) não causaram imobilidade dos J2. Entretanto, a mistura de areia ao solo em partes iguais com adição dos mesmos ingredientes dos meios causou imobilidade de J2 entre 60% e 100% nas misturas com água a 43% e 70% da (CC). Portanto, concluiu-se que nutrientes e umidade do solo são importantes para a produção de COVs tóxicos a *M. incognita*]

Palavras chaves: Fitonematoides; Controle; COVs

## ABSTRACT

Volatiles organic compounds (VOCs) are produced by soil microbiota, as well as by microorganisms cultivated in culture medium. However, the toxicity of those VOCs to plant parasitic nematodes is almost unknown. Thus, studies were undertaken to evaluate the VOCs toxicity and the water exposed to them, to second stage juveniles (J2) of *Meloidogyne incognita*, as well as to the J2 exposure over periods to VOCs produced by *Fusarium oxysporum* isolates when cultivated in media with different quantities and sources of carbon and nitrogen. In these assays the compartmental Petri dishes were used. Other assays, however, used plastic cups and a technic developed with Supelco tubes in which the toxicity of the VOCs emitted by soils incorporated with carbon in different soil humidity levels were evaluated on the mobility of *M. incognita* J2. Amongst the test culture media where *F. oxysporum* was grown (YES, MA, MAE and SNA) only YES medium, classified as rich medium in carbon, enables the fungus to emit VOCs that caused 100% J2 imobility. All *F. oxysporum* isolates cultivated in YES medium and the culture kept hermetically sealed by 3 and 6 days, produced and stored VOCs which caused 100% J2 imobility at 3 hours or longer exposition time to them. Also 100% J2 imobility was obtained since 1 h VOCs exposure when J2s were immersed into water exposed to the fungus VOCs as well as to them produced from peptone medium cultured fungus. The VOCs emitted from washed sand with 43% and 70% of field water capacity plus de medium ingredients of MA, MAE or YES (without agar) caused any J2 immobility. However, the sand and soil mixture (1:1) with the addition of the same medium ingredients and water content caused J2 immobility from 60% to 100% soil. Nutrients and humidity are importants to toxic VOCs production to *M. incognita*.

Keys words: phytonematodes; Control; VOCs

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	7
2 REFERENCIAL TEÓRICO .....	9
2.1 Compostos orgânicos voláteis produzidos no solo por fungos e bactérias .....	9
2.2 Efeito de carbono e nitrogênio na produção de covs tóxicos à fitopatógenos produzidos por fungos e bactérias. ....	10
2.3 Influência da adição de carbono/nitrogênio e a umidade do solo sobre a população de nematoides .....	12
2.4 Resíduos orgânicos e o controle de nematoides .....	14
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1 Influência da composição do meio de cultura na produção de COVs tóxicos a <i>Meloidogyne incognita</i> . ....	15
3.1.1 Culturas de <i>Fusarium oxysporum</i> .....	15
3.1.2 Obtenção de ovos e juvenis de segundo estágio de <i>Meloidogyne incognita</i> .....	15
3.1.3 Produção de compostos orgânicos voláteis tóxicos à <i>Meloidogyne incognita</i> em meios de cultura ricos em carbono e nitrogênio .....	16
3.2 Exposição de juvenis de segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne incognita</i> a diferentes períodos de tempo a compostos orgânicos voláteis produzidos por isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> cultivados no meio YES. ....	17
3.3 Toxicidade da água exposta aos compostos orgânicos voláteis produzidos por isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> aos juvenis de segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne incognita</i> . ....	18
3.4 Influência <i>in vitro</i> da adição de carbono e nitrogênio em solo cafeeiro natural com diferentes níveis de umidade na produção de compostos orgânicos voláteis tóxicos à <i>Meloidogyne incognita</i> . ...	19
3.5 Análise estatística.....	21
4 RESULTADOS.....	21
4.1 Influência da composição do meio de cultura na produção de COVs tóxicos à <i>Meloidogyne incognita</i> . ....	21
4.2 Exposição de juvenis de segundo estágio de <i>Meloidogyne incognita</i> à diferentes períodos de tempo à compostos orgânicos voláteis produzidos por isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> cultivados no meio YES. ....	24
4.3 Toxicidade da água exposta aos compostos orgânicos voláteis produzidos por isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> aos juvenis de segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne incognita</i> . ....	25



4.4 Influência <i>in vitro</i> da adição de carbono e nitrogênio em solo cafeeiro natural com diferentes níveis de umidade na produção de compostos orgânicos voláteis tóxicos a <i>Meloidogyne incognita</i> . ...	26
5 DISCUSSÃO .....	29
5.1 Influência da composição do meio de cultura na produção de COVs tóxicos à <i>Meloidogyne incognita</i> . .....	29
5.2 Exposição de J2 de <i>Meloidogyne incognita</i> à diferentes períodos de tempo a compostos orgânicos voláteis produzidos por isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> cultivados no meio YES e armazenados por 3 ou 6 dias. ....	30
5.3 Toxicidade da água exposta aos compostos orgânicos voláteis produzidos por isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> aos juvenis de segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne incognita</i> . ....	31
5.4 Influência <i>in vitro</i> da adição de carbono e nitrogênio em solo cafeeiro natural com diferentes níveis de umidade na produção de compostos orgânicos voláteis tóxicos a <i>Meloidogyne incognita</i> . ...	32
6 CONCLUSÕES .....	33
REFERÊNCIAS .....	34

## 1 INTRODUÇÃO

Os nematoides de galhas estão incluídos no gênero *Meloidogyne* spp., os quais são parasitas obrigatórios de diversas espécies de plantas (PERRY; MOENS; STARR, 2009). Nesse gênero, a espécie *Meloidogyne incognita* é a espécie mais disseminada nos campos agrícolas, possivelmente, sendo o patógeno de plantas que mais causa perdas na produção de alimentos e fibras no mundo (TRUDGILL; BLOCK, 2001). Este patógeno tem sido controlado, por décadas, através do uso de nematicidas incluindo os fumigantes de solo (RICH; DUNN; NOLING, 2004). Entretanto, em função da alta toxicidade a humanos, contaminação de lençóis freáticos e de alimentos, esses produtos têm sido retirados do comércio (OKA, 2010), reduzindo a disponibilidade deles aos produtores rurais (GRIMME et al., 2007). Juntamente com a retirada desses produtos do comércio, cresceu a demanda por alimentos orgânicos, o que têm estimulado a busca por fontes alternativas de controle para essa atividade agrícola.

Numerosos micro-organismos têm sido relatados como agentes de controle biológico de fitonematoides (AKHTAR; MALIK, 2000). O parasitismo, ao longo do tempo, foi o principal critério de seleção de um possível micro-organismo agente de biocontrole de nematoides (CAMPOS; PINHO; FREIRE, 2010). Entretanto, pesquisas têm demonstrado que compostos orgânicos voláteis (COVs) produzidos por fungos e bactérias habitantes do solo têm potencial para controlar patógenos radiculares (FIDDAMAN; ROSSALL, 1994). Além do mais, Chuankun et al. (2004) demonstraram a capacidade de vários solos em produzir COVs inibidores da germinação de conídios de três fungos habitantes de solo. Botelho (2011) demonstrou a capacidade de solos de lavouras cafeeiras do sul de Minas Gerais na produção de COVs tóxicos a *M. incognita*. Carmo (2012), também trabalhando com solos de lavouras cafeeiras do Sul de Minas Gerais, além de demonstrar a produção de COVs tóxicos a *M. incognita*, demonstraram ainda que a umidade afeta a quantidade de COVs produzidos por esses solos.

COVs produzidos pelo fungo *Muscodor albus* causaram mortalidade de mais de 80% de três espécies de fitonematoides (RIGA; LACEY; GUERRA, 2008).

*Fusarium oxysporum* é uma espécie considerada componente normal das comunidades fúngicas da rizosfera e do solo (GORDON; MARTYN, 1997). Freire et al. (2012) obtiveram 23 isolados de *F. oxysporum* da rizosfera de plantas de café (*Coffea arabica*), os quais demonstraram capacidade variável na produção de COVs tóxicos a *M. incognita*. Alguns deles mataram 100% dos juvenis de segundo estágio (J2) de *M. incognita*.

A influência da composição do meio de cultura na produção de COVs por micro-organismos tem sido demonstrada em alguns trabalhos (BRUCE et al., 2003; EZRA; STROBEL, 2003; FIDDAMAN; ROSSALL, 1994; LYNCH; HARPER, 1974). Por exemplo, o aumento na quantidade de nitrogênio ou de carbono nesses meios onde os micro-organismos são cultivados aumenta (quantitativamente e qualitativamente) a produção de COVs (FIDDAMAN; ROSSALL, 1994).

Apesar de *F. oxysporum* ser uma espécie sempre encontrada em solos, e ter sua capacidade de produzir COVs comprovada (MINERDI et al., 2009), a toxicidade de seus COVs a fitonematoides tem sido pouco pesquisada, cabendo apenas a Freire et al. (2012) demonstrar sua ação tóxica a *M. incognita*. Buscando entender melhor alguns fatores que condicionam a produção de COVs tóxicos a *M. incognita* por isolados de *F. oxysporum* e pela microbiota natural dos solos objetivou-se neste trabalho: 1) testar diversos meios de cultura empregados tanto para o cultivo de isolados de *F. oxysporum* como aditivos ao solo natural na produção de COVs tóxicos a *M. incognita*; 2) estudar o efeito da umidade do solo quando esses nutrientes são adicionados a ele na produção de COVs tóxicos a *M. incognita*; 3) estudar a sensibilidade de J2 de *M. incognita* aos COVs produzidos por *F. oxysporum* cultivado em diversos meios de cultura, bem como na água anteriormente exposta a eles.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Compostos orgânicos voláteis produzidos no solo por fungos e bactérias**

Compostos orgânicos voláteis (COVs) são substâncias com aproximadamente 20 átomos de carbono e de baixa polaridade. Eles podem atravessar as membranas livremente e são liberados na atmosfera ou no solo, na ausência de uma barreira de difusão (PICHERSKY; NOEL; DUDAREVA, 2006). A maioria dos COVs são lipofílicos, tem pequena massa molecular (menos que 300 Da) e alta pressão de vapor (0,01 kPa ou maior à 20 °C) (LAOTHAWORNKITKUL et al., 2009). Os COVs são caracterizados pelo baixo peso molecular e a habilidade de interagir com receptores olfativos (CHEETHAM, 1997).

Os COVs têm sido estudados nos últimos 90 anos como substâncias que atuam na comunicação (infoquímicos) entre diferentes organismos (INSAM; SEEWALD, 2010). Contudo, a maioria dos estudos com COVs se concentrou na produção destes pelas plantas. Em contraste, pouco se estudou sobre a produção dos COVs no solo. Os COVs são produzidos no solo pelas plantas, micro-organismos e pela decomposição de materiais orgânicos. Recentemente, trabalhos vêm demonstrando a importância destes gases nas interações entre micro-organismos habitantes do solo (CHUANKUN et al., 2004; WHEATLEY, 2002). Nas últimas duas décadas, os COVs têm despertado o interesse dos fitopatologistas. Como consequência, vários trabalhos demonstraram a ação dessas moléculas interferindo no processo de doença em plantas. O efeito tóxico de COVs produzidos por bactérias e fungos a fitonematoides foi demonstrado por Grimme et al. (2007) e Gu et al. (2007), mas são poucos os trabalhos que têm testado o antagonismo dos COVs aos fitonematoides (CAMPOS; PINHO; FREIRE, 2010).

A produção de COVs no solo é influenciada pela composição da microbiota, quantidade e qualidade dos nutrientes presentes, umidade e pelo estado fisiológico dos micro-organismos presentes (CARMO, 2012; INSAM; SEEWALD, 2010).

## **2.2 Efeito de carbono e nitrogênio na produção de covs tóxicos a fitopatógenos produzidos por fungos e bactérias.**

Fiddaman e Rossall (1994), trabalhando com *Bacillus subtilis* demonstraram que o aumento da concentração de glicose no meio de cultura, induziu a formação de COVs que ocasionaram supressão do crescimento de *Rhizoctonia solani*. Foram utilizadas duas fontes prontamente disponíveis de carbono: D-glicose e L-glicose. A D-glicose foi mais eficiente em estimular o aumento da produção de COVs em comparação com L-glicose. Quando se testaram fontes de carboidratos complexas, maior produção de COVs ocorreu com o uso de amido de batata. Apesar de os carboidratos complexos estimularem a produção de COVs, as formas mais simples induziram maior produção de COVs. Os mesmos autores estudaram em meio de cultura fontes de nitrogênio (peptonas) e seu efeito na produção de COVs por *B. subtilis*. A peptona micológica foi a que permitiu maior produção de COVs tóxicos a *R. solani*. A produção de COVs por *B. subtilis* também foi estudada em areia esterilizada. Para tanto, em 20 g de areia, foi adicionada uma suspensão de  $10^7$  ufc ml<sup>-1</sup> de *B. subtilis* seguida da adição de glicose, peptona bacteriológica ou água destilada. Com a adição de glicose ou peptona na areia, a inibição do crescimento de *R. solani* foi muito maior comparado com o controle sem a adição de carbono ou nitrogênio.

Ezra e Strobel (2003) estudaram o efeito de cinco meios de cultura na produção de COVs por *Muscodor albus*. Os meios selecionados variavam na concentração de carboidratos e nitrogênio. O crescimento de *M. albus* foi pequeno nos meios com baixa concentração de carbono. Nos meios com alta concentração de carbono o crescimento foi adensado, os quais induziram a

produção diversificada de COVs e em maiores concentrações. Ficou também evidenciada a relação direta entre a composição do meio de cultura e a diversidade de COVs. Portanto, a mudança na composição do meio de cultura interferiu na composição e na quantidade de COVs, produzidos por *M. albus*, inibindo ou matando os micro-organismos testados. Por exemplo, a presença de sacarose no meio agar-água (AA) aumentou a atividade dos COVs em aproximadamente 50% em relação ao meio AA.

Bruce et al. (2003) estudaram a influência de diferentes meios de cultura na produção de COVs por bactérias e leveduras antagonistas a fungos decompositores de madeira. A produção de COVs se mostrou claramente dependente da composição do meio de cultura. O meio que proporcionou maior produção de COVs tóxicos aos fungos foi o TSA. Neste meio, três isolados bacterianos inibiram em 100% o crescimento de todos os fungos decompositores de madeira testados. Nos demais meios testados ocorreu baixa ou nenhuma inibição. Os COVs de um isolado bacteriano se mostraram muito seletivo, tornando efetivos apenas contra um isolado fúngico alvo e apenas quando cultivado em meio TSA. Isto indica que a combinação entre bactéria e o meio de cultura é essencial para a produção de COVs efetivos contra um alvo específico.

Lynch e Harper (1974) mostraram que a produção de etileno por *Mucor hiemalis* é diretamente afetada pelo substrato e pela quantidade de oxigênio presente no meio. Os autores testaram vários meios de cultura indutores da formação de etileno. Concluíram que apenas os meios com metionina + glicose e etionina + glicose foram capazes de induzir a formação de etileno. A metionina provavelmente não está prontamente disponível no solo como um aminoácido livre, porém peptídios presentes no solo contém metionina, e estes parecem ser precursores mais eficientes do etileno que a metionina. Diferentes restos de cultura acumulam diferentes quantidades de carboidratos e proteínas no solo. Portanto, o histórico de cultivos numa determinada área de plantio é provavelmente um importante determinante da capacidade do solo de produzir etileno.

### **2.3 Influência da adição de carbono/nitrogênio e a umidade do solo sobre a população de nematoides**

Os primeiros trabalhos com adição de compostos que disponibilizam carbono logo após sua adição ao solo com o intuito de controlar fitonemadoides começaram a ser realizados a partir da metade do século passado. Feder (1960) provou a ação nematicida da adição de sacarose ao solo e sugeriram que o aumento da pressão osmótica na solução do solo levou a desidratação dos nematoides e conseqüente morte. Santiago et al. (2005) corroborando com os resultados de Feder (1960), concluíram que a sacarose tem ação direta sobre os nematoides, independentemente da ação sobre micro-organismos do solo. A ação direta da sacarose, causando alteração da pressão osmótica do solo, tem pouca aplicação prática, já que a sua utilização como nematicida requer o emprego de grande quantidade para um controle efetivo. Feder, Hutchins e Eichhorn (1964) ressaltaram ainda que a quantidade a ser utilizada vai depender da umidade do solo. A quantidade necessária de sacarose para que ocorra supressão de populações de nematoides chega a uma concentração na solução do solo comparada com a de ponto de murcha permanente (BLAKE, 1961), portanto, inviabilizando a sua aplicação em áreas em cultivo, podendo ser realizada apenas, e se economicamente viável, em área sob alqueive.

A ação nematicida que ocorre no solo após a adição de sacarose, todavia, não é apenas resultado do aumento da pressão osmótica que leva a morte por desidratação. Vawdrey e Stirling (1997) sugerem que a adição de sacarose ao solo aumenta a população de micro-organismos antagonistas a nematoides. Hollis e Rodríguez-Kábana (1966) relataram rápida supressão de nematoides em solo inundados aos quais foi adicionado sacarose ou fubá em relação aos solos inundados sem adição desses ingredientes. Essa rápida supressão foi devido aos produtos da fermentação anaeróbica por bactérias. Browning et al. (1999) estudaram a umidade do solo e a adição de carbono, e

concluíram que nos solos com 100% da capacidade de campo CC, pequenas doses de glicose ou melão já aumentam a eficiência de controle de fitonematoides. Estudaram ainda, o efeito da adição de fontes de carbono combinada a diferentes regimes de umidades do solo sobre populações dos nematoides *Tylenchorhynchus* spp. e *Hoplolaimus galeatus*. A umidade combinada com a adição de carbono afetou as populações de nematoides de formas independentes, assim como a interação das duas. Sete dias após o início dos tratamentos, o solo que não havia recebido nenhuma fonte de carbono, mas que estava com 100% da CC, reduziu a população de *Tylenchorhynchus* spp. em 81% em comparação com o solo com 60% da capacidade de campo. Não houve diferença significativa entre o número de nematoides nos solos com 100 e 150 % da CC. A adição de carbono correlacionou-se negativamente com as populações de nematoides em todas as umidades testadas. O tratamento mais eficiente na redução da população de nematoides foi a adição de peptona. Em solos com 100% ou 150% da CC, baixas quantidades de glicose (0,3 e 0,7 g/ 100 g de solo), melão (0,3 g/100 g de solo) e peptona (0,3 g/100 g de solo) foram eficientes para diminuir a população de nematoides quando comparado com solos com as mesmas umidades, porém que não receberam fontes de carbono. Johnston (1959) demonstrou que em solos inundados a produção de ácidos orgânicos por bactérias anaeróbias é responsável pela diminuição da população de nematoides ao invés de falta de oxigênio. Dessa forma, as fontes de carbono adicionadas ao solo serviram como substrato para o crescimento dessas bactérias. As altas doses de glicose e melão afetaram os nematoides quando a umidade foi mantida em 60% da CC, devido ao estabelecimento de sítios de anaerobiose no solo e, conseqüentemente, produção de ácidos orgânicos, além do efeito osmótico. Em relação ao meio com peptona, sua eficiência no controle de nematoides, provavelmente, foi devido a outro mecanismo, qual sejam a produção e o acúmulo de grandes quantidades de amônia em níveis tóxicos (BROWNING et al., 1999).



## 2.4 Resíduos orgânicos e o controle de nematoides

A aplicação de resíduos orgânicos no campo é uma prática utilizada pelos agricultores há milhares de anos. Além de disponibilizar nutrientes para as plantas e melhorar a estrutura do solo, esses resíduos também são utilizados para o controle de patógenos habitantes do solo. A elucidação do mecanismo de redução populacional de patógenos, que ocorre com a alteração orgânica do solo, pode levar ao desenvolvimento de técnicas de maior eficiência de controle, embora o efeito dos resíduos orgânicos na comunidade microbiana, nos nematoides, nas plantas e no ambiente do solo sejam muito complexas. Os possíveis mecanismos envolvidos na supressão de nematoides pelos resíduos orgânicos são: 1- liberação de composto nematicida pré-existente no material orgânico, 2- geração de possíveis compostos nematicidas, tais como amônia e ácidos graxos, durante a degradação do material, 3- aumento e/ou introdução de antagonistas, 4- aumento da tolerância ou resistência das plantas, 5- mudança na química do solo que o torna inviável para a sobrevivência dos nematoides. Além da ação individual de cada um deles a combinação desses mecanismos, torna mais eficaz a supressão a nematoides (OKA, 2010).

Várias são as fontes de resíduos testadas quanto ao potencial no controle de fitonematoides (RODRÍGUEZ-KÁBANA, 1986), porém, as principais incluem subprodutos da indústria de processamento, esterco, compostagem e resíduos vegetais (OKA, 2010).

Poucos estudos têm sido conduzidos sobre a volatilidade de compostos pela microflora induzida pela adição de nutrientes ao solo, seja carbono como nitrogênio, e também sobre o efeito desses voláteis nas populações de nematoides de grande importância como espécies do gênero *Meloidogyne* spp.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Influência da composição do meio de cultura na produção de COVs tóxicos à *Meloidogyne incognita*.**

##### **3.1.1 Culturas de *Fusarium oxysporum***

Utilizaram-se nos ensaios três isolados de *F. oxysporum* (3, 13 e 21) da rizosfera cafeeira obtidos em trabalho anterior (FREIRE et al., 2012) em que esses isolados produziram COVs com diferentes capacidades de toxicidade a J2 de *M. incognita*. Por exemplo, os COVs do isolado 21 causaram 100 % de mortalidade dos J2, enquanto os isolados 3 e 13 causaram 30 e 0 % de mortalidade, respectivamente. Os isolados de *F. oxysporum* estavam armazenados em BOD a 25 °C. Para os estudos propostos, esses isolados das culturas estoques foram repicados para meio de cultura MA e incubados por seis dias. A seguir, da borda das colônias, foram novamente repicados para outras placas com o meio MA e mantidos a 25 °C até o uso nos ensaios.

##### **3.1.2 Obtenção de ovos e juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne incognita***

Raízes de tomateiros (*Lycopersicon esculentum* cv Santa Clara) cultivados em casa de vegetação e infectadas com *M. incognita*, foram lavadas cuidadosamente e cortadas em pedaços de 1 cm. Foram então trituradas em liquidificador por 20 segundos em solução de hipoclorito de sódio a 0,5 %, seguindo-se a técnica de Hussey e Barker (1973). Em seguida, foram colocados nos tubos contendo a suspensão de ovos, aproximadamente 3 g de caulim, e centrifugados, realizando-se a sua limpeza pela técnica de Coolen e Herde (1972). Os ovos que ficaram retidos na peneira de 0,025 mm

foram recolhidos em béquer de 200 mL, com auxílio de uma pisseta com água destilada. A suspensão de ovos foi colocada em câmara de eclosão e mantida à temperatura de 28 °C. Foram utilizados nos ensaios apenas os J2 eclodidos a partir do terceiro dia na câmara de eclosão.

### **3.1.3 Produção de compostos orgânicos voláteis tóxicos à *Meloidogyne incognita* em meios de cultura ricos em carbono e nitrogênio**

No primeiro ensaio foram testadas quatro fontes de carbono para a constituição dos meios de cultura com a seguinte composição: 1. SNA - syntetic nutrient-poor agar (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g, KNO<sub>3</sub> 1 g, MgSO<sub>4</sub> 0,5 g, KCl 0,5 g, glicose 0,2 g, sacarose 0,2 g, ágar 20,0 g); 2. MAE - malte agar enriquecido (malte 20 g, dextrose 20 g e ágar 20 g); 3. YES Yeast extract sucrose agar (extrato de levedura 20 g, sacarose 150 g, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0.5 g e ágar 20 g); 4. MA - malte-agar (malte 20 g e ágar 20 g). O meio SNA é considerado pobre em carbono e os meios MAE e YES são ricos. Também é rico o meio MA, mas foi incluído no teste por ter sido empregado anteriormente por Freire et al. (2012), no teste de produção de COVs por diversos fungos isolados da rizosfera cafeeira e aqui servirá de comparativo para a eficácia dos demais (controle).

No segundo ensaio, foram testadas três fontes de nitrogênio representadas por peptonas, a saber: peptona bacteriológica (PB), micológica (PM) e protease (PP) adicionadas ao meio agar-água (AA) na proporção de 2% (p/v), além do meio tryptic soy agar (TSA) (peptona de caseína 15 g, peptona de farinha de soja 5 g, cloreto de sódio 5 g, agar 15 g). Como controle, utilizou-se o meio AA sem adição de peptona. Portanto, foram testados cinco meios de cultura (três deles com AA mais as fontes de peptona, denominados PB, PM e PP, além de TSA e AA). Também nesse ensaio foram empregados os mesmos isolados de *F. oxysporum* dos testes com carboidratos.

Para a produção de COVs e posteriores testes de toxicidade em J2 de *M. incognita* utilizaram-se, nos dois ensaios, a técnica desenvolvida com placas bipartidas (FERNANDO et al., 2005). Em um dos compartimentos colocou-se o meio de cultura a testar e no centro foi repicado um disco de 5 mm de diâmetro retirado das bordas da cultura de *F. oxysporum* (isolado 3, 13 ou 21) anteriormente cultivado em meio MA. A seguir, as placas foram fechadas e deixadas em BOD no escuro a 28 °C. Quando as colônias fúngicas atingiram 3,0 cm de diâmetro, as placas foram abertas e no compartimento contíguo colocaram-se aproximadamente 250 J2 de *M. incognita* em 1,5 ml de suspensão. Como controle, colocou-se o meio de cultura utilizado para o crescimento fúngico em um compartimento, porém sem repicagem fúngica, e no compartimento contíguo colocou-se a mesma concentração de J2 em água. As placas foram imediatamente vedadas com Parafilm<sup>®</sup>, para se evitar o escape de COVs, e colocadas em BOD a 28 °C no escuro por 48 horas.

Os COVs emitidos pelas colônias fúngicas ou mesmo pelo meio de cultura sem crescimento fúngico (controle) chegariam ao compartimento contíguo, onde estavam os J2 de *M. incognita*, apenas pelo ar.

Após a incubação por 48 horas, as placas foram abertas e duas alíquotas de 200 µL da suspensão de J2 expostas aos COVs foram coletadas e depositadas em células da placa de polipropileno. Com auxílio de um microscópio de objetiva invertida quantificou-se o número dos J2 móveis e imóveis e calculou-se a porcentagem de imobilidade.

### **3.2 Exposição de juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita* à diferentes períodos de tempo à compostos orgânicos voláteis produzidos por isolados de *Fusarium oxysporum* cultivados no meio YES.**

Para este ensaio foi empregado o meio YES (rico em carboidratos) e os isolados 3, 13 e 21 de *F. oxysporum*, como fornecedores de COVs.

Como no ensaio anterior, empregou-se a técnica da placa bipartida (FERNANDO et al., 2005), porém, na tampa foi feito um furo de 2 mm de diâmetro que foi vedado com fita adesiva Adelbras®. Desta forma, após o crescimento fúngico em um compartimento, a suspensão de J2 de *M. incognita* pôde ser introduzida no compartimento contíguo com a câmara de gás formada, através do furo estabelecido com o uso de uma seringa, evitando a perda dos COVs produzidos durante os primeiros dias de crescimento.

O meio de cultura YES foi colocado num compartimento da placa bipartida, seguido da repicagem de *F. oxysporum* (isolado 3, 13 ou 21) e no compartimento oposto uma suspensão de J2 foi depositada após o crescimento fúngico por três e seis dias incubada em BOD a 28 °C no escuro. Os J2 foram expostos aos COVs produzidos por *F. oxysporum* por 0,5 h, 3 h, 6 h e 24 h. Como controle, utilizou-se os meios de cultura sem a repicagem fúngica. A introdução dos J2 nas placas foi realizada através da injeção com seringa (5 ml de volume interno) de uma suspensão aquosa de 1,5 mL com 250 J2 através do orifício realizado na tampa da placa como, descrito anteriormente. Após a retirada da seringa, o orifício voltou a ser vedado com fita adesiva.

Após o período de exposição dos J2 aos COVs das culturas fúngicas, as placas foram abertas e de cada repetição foram coletadas duas alíquotas de 500 µL e transferidas para células da placa de polipropileno. Com o auxílio de microscópio de objetiva invertida quantificou-se o número dos J2 móveis e imóveis e calculou-se a porcentagem de imobilidade.

### **3.3 Toxicidade da água exposta aos compostos orgânicos voláteis produzidos por isolados de *Fusarium oxysporum* aos juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita*.**

Empregou-se a técnica de placas bipartidas de Fernando et al. (2005) modificada com perfuração da tampa. Em um compartimento foi colocado o

isolado de *F. oxysporum* (3, 13 ou 21) e no compartimento contíguo colocou-se 1,0 ml de água destilada. Das bordas da colônia de cada isolado de *F. oxysporum* cultivado em meio MA foi retirado um disco de 5 mm de diâmetro, transferido para o centro do compartimento da placa bipartida com o meio de cultura AA acrescido de peptona bacteriológica ou o meio YES e incubados a 28 °C em BOD no escuro. Cinco dias após o crescimento fúngico, 1 ml de água foi colocado no compartimento contíguo através do furo na tampa, e permaneceu exposta aos COVs por diferentes períodos de tempo (0,5 h; 1 h; 2 h; 24 h).

Após o período de exposição, a água foi recolhida, colocada em um microtubo, e nele pipetados 500 J2 concentrados em uma suspensão aquosa de 1,0 mL. Os tubos foram armazenados em BOD a 28 °C por 24 h, quando então foram abertos. Com o auxílio de microscópio de objetiva invertida quantificou-se o número dos J2 móveis e imóveis e calculou-se a porcentagem de imobilidade.

### **3.4 Influência *in vitro* da adição de carbono e nitrogênio em solo cafeeiro natural com diferentes níveis de umidade na produção de compostos orgânicos voláteis tóxicos à *Meloidogyne incognita*.**

Neste ensaio, testou-se a produção de COVs por uma microflora mista e desconhecida. Para isso, utilizou-se solo da rizosfera cafeeira recolhido no dia anterior à montagem do ensaio de uma lavoura de produção de café em Lavras, MG, Brasil. Como controle, utilizou-se areia lavada e autocalavada. Também foram utilizados os mesmos meios de cultura empregados em ensaios anteriores como fontes de carboidrato, porém, sem adição de ágar funcionando assim como nutriente (adubo) adicionado ao solo ou à areia. Variou-se a umidade do solo colhido na rizosfera cafeeira. Para isso, o solo teve sua umidade avaliada, por amostragem, através de secagem. Desta forma, o solo utilizado continha 43% de umidade referida

como CC. Ao solo amostrado adicionou-se, então, água até alcançar 70% da CC definindo-se três tratamentos: 1) apenas solo, 2) solo misturado a areia lavada em proporções iguais v/v e 3) apenas areia. Os ingredientes dos meios de cultura em forma sólida tiveram a mesma concentração empregada no primeiro ensaio com *F. oxysporum* (item 1) e foram adicionados ao solo (tratamento 1), ao solo mais areia (trat. 2) e a areia apenas (trat. 3) após o ajuste da umidade do solo ou areia 70% da CC.

Utilizou-se nesse ensaio a técnica desenvolvida por Botelho (2012). Desta forma, 25 gramas de solo (trat. 1), areia+solo (trat. 2), ou areia (trat. 3) com umidade ajustada foram colocadas em tubos Supelco<sup>®</sup> de capacidade 40 ml, volume interno, além dos ingredientes do meio de cultura sem ágar (adubo). A seguir, foi aterrado ao solo, areia, ou mistura de ambos até a metade, um microtubo de 1,5 ml de capacidade. Os tubos Supelco<sup>®</sup> foram vedados hermeticamente e colocados em BOD à 28 °C no escuro por cinco dias quando, então, foi injetado com uma seringa perfurando a película de silicone da tampa, uma suspensão aquosa contendo aproximadamente 200 J2 de *M. incognita* diretamente no interior do microtubo. Após 48 h de exposição aos COVs os J2 foram recolhidos com auxílio de uma pipeta e colocados em células de placa de polipropileno. Com o auxílio de microscópio de objetiva invertida quantificou-se o número dos J2 móveis e imóveis e calculou-se a porcentagem de imobilidade.

Em outro ensaio, utilizaram-se fontes comerciais prontamente disponíveis de carbono e nitrogênio e o mesmo solo do ensaio anterior sem mistura com areia e com umidade de 60% da CC. Desta forma, utilizaram-se as concentrações de 0,5, 1,5 e 5,0 g de açúcar cristal (fonte de carboidrato) ou de peptona bacteriológica (fonte de nitrogênio) para cada 100 g de solo. O solo e as fontes de carbono ou nitrogênio foram colocados em saco plástico e misturados sob agitação constante por quatro minutos. Duzentos gramas dessa mistura foram colocados em copos plásticos de 300 cm<sup>3</sup>. Na superfície da mistura (solo+nutriente) foi colocado um microtubo de 1,5 ml de capacidade aterrado até sua metade. O copo com a mistura solo e nutrientes

foi envolvido completamente na parte superior com Parafilm® fechando-o hermeticamente. Colocou-se na superfície interna do filme vedante Parafilm® em local oposto ao microtubo, uma fita adesiva de 2x2 cm a fim de permitir maior resistência a perfuração pela seringa evitando alongar o furo realizado pela mesma ou mesmo rasgá-lo. Após sete dias de vedação, com uma seringa contendo agulha perfurante, colocou-se uma suspensão contendo 250 J2 de *M. incognita* em suspensão aquosa no microtubo. O furo provocado pela perfuração com a seringa foi vedado com fita adesiva. Como controle, foi utilizado solo sem adição de nutriente com a umidade ajustada para 60% CC. Após 48 horas de exposição dos J2 aos COVs, o Parafilm® foi retirado e alíquotas de 200 µL da suspensão de J2 dos microtubos de cada repetição foi transferida para placa de polipropileno. Com o auxílio de microscópio de objetiva invertida quantificou-se o número dos J2 móveis e imóveis e calculou-se a porcentagem de imobilidade.

### **3.5 Análise estatística**

Em todos os ensaios utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições. Utilizou-se o programa Sisvar versão 4.6 para a realização da análise de variância (ANOVA). As médias de cada tratamento foram agrupadas e diferenciadas pelo teste de Scott e Knott (1974), a 5% de significância

Todos os ensaios foram repetidos três vezes.

## **4 RESULTADOS**

### **4.1 Influência da composição do meio de cultura na produção de COVs tóxicos à *Meloidogyne incognita*.**

A composição do meio de cultura influenciou a produção de COVs pelos isolados de *F.oxysporum* tóxicos a *M. incognita*. Os três isolados de *F.oxysporum* cultivados nos diferentes meios apresentaram sempre o mesmo



padrão de produção de COVs tóxicos ou não a J2 de *M. incognita*. Quando esses isolados foram cultivados em meios com diferentes quantidades e fontes de carbono (SNA, MA, MAE, YES), apenas o meio YES, classificado como muito rico em carbono foi capaz de proporcionar a produção de COVs tóxicos, causando 100% de imobilidade de J2 de *M. incognita* (Tabela 1). No entanto, os COVs produzidos, quando os isolados de *F. oxysporum* foram cultivados nos demais meios testados, não afetaram a mobilidade dos J2 de *M. incognita*. Em outro ensaio em que os isolados de *F. oxysporum* foram cultivados em meios com diferentes fontes de nitrogênio, os meios TSA, PB, PM e PP proporcionaram produção de COVs que causaram 100% de imobilidade em J2 de *M. incognita* (Tabela 1). Entretanto, quando os isolados de *F. oxysporum* foram cultivados em meio AA, não ocorreu produção de COVs capazes de afetar a mobilidade de J2.

Embora não fosse objetivo do ensaio, observou-se que nos isolados de *F. oxysporum* cultivados lado a lado na mesma placa, não ocorreu inibição do crescimento entre eles. O cultivo desses isolados em meios diferentes proporcionou variação na densidade do micélio e no crescimento das colônias.

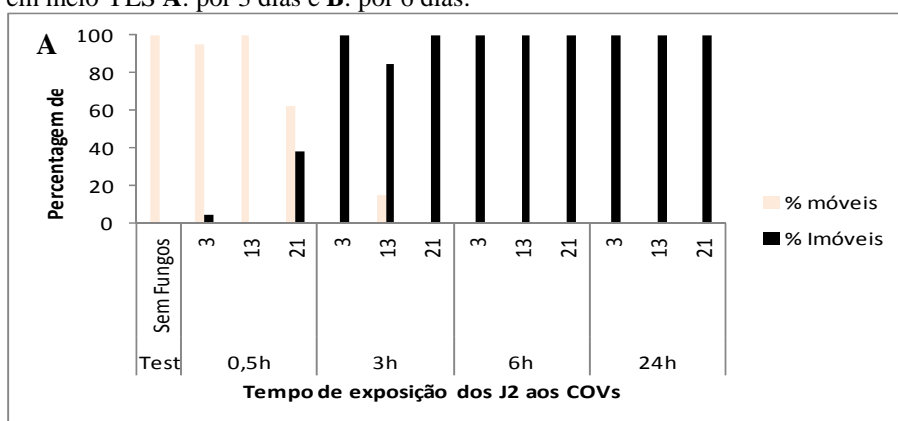
**Tabela 1-** Imobilidade de juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita* após exposição por 48 horas aos compostos orgânicos voláteis (COVs) produzidos pelos isolados 3, 13 e 21 de *Fusarium oxysporum* (FO) cultivados em diferentes fontes de nitrogênio [AA, triptona soja (TSA), peptona bacteriológica (PB), peptona protease (PP), peptona micológica (PM)] e de carbono [meio SNA, malte (MA), malte enriquecido (MAE) e (YES)].

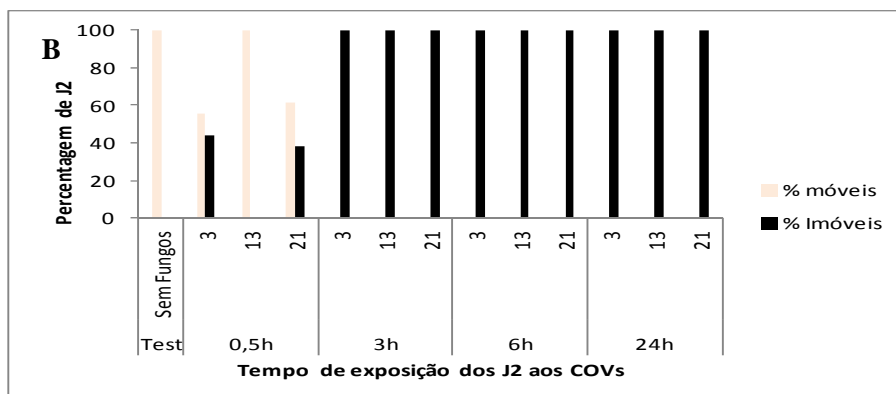
Meio de cultivo (Fonte de nitrogênio)	Isolados de <i>F. oxysporum</i> e testemunha	Imobilidade de J2 (%)	Meio de cultivo (Fonte de carbono)	Isolados de <i>F. oxysporum</i> e testemunha	Imobilidade de J2 (%)
	controle	0		controle	0
	3	100		3	100
	13	100		13	100
	21	100		21	100
PB	3+13	100	YES	3+13	100
	3+21	100		3+21	100
	13+21	100		13+21	100
	3+13+21	100		3+13+21	100
	controle	0		controle	0
	3	100		3	0
	13	100		13	0
	21	100		21	0
PM	3+13	100	MA	3+13	0
	3+21	100		3+21	0
	13+21	100		13+21	0
	3+13+21	100		3+13+21	0
	controle	0		controle	0
	3	100		3	0
	13	100		13	0
	21	100		21	0
PP	3+13	100	MAE	3+13	0
	3+21	100		3+21	0
	13+21	100		13+21	0
	3+13+21	100		3+13+21	0
	controle	0		controle	0
	3	100		3	0
	13	100		13	0
	21	100		21	0
TSA	3+13	100	SNA	3+13	0
	3+21	100		3+21	0
	13+21	100		13+21	0
	3+13+21	100		3+13+21	0
	controle	0			
	3	0			
	13	0			
	21	0			
AA	3+13	0			
	3+21	0			
	13+21	0			
	3+13+21	0			

#### 4.2 Exposição de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne incognita* à diferentes períodos de tempo à compostos orgânicos voláteis produzidos por isolados de *Fusarium oxysporum* cultivados no meio YES.

Os COVs produzidos pelos isolados 3, 13, 21 de *F. oxysporum* por três e seis dias causaram 100% de imobilidade aos J2 de *M. incognita* quando expostos por três ou mais horas a esses COVs, a exceção do isolado 13 aos 3 dias de crescimento (Figuras 1A e 1B). Entretanto, diferenças entre isolados de *F. oxysporum* ocorreram na produção de COVs tóxicos a *M. incognita* quando a exposição dos J2 foi inferior a três horas. Assim, quando cultivados por três dias, a exposição dos J2 por 0,5 h aos COVs produzidos pelos isolados 3 e 13 praticamente não afetou a mobilidade dos J2 de *M. incognita*. Já os COVs do isolado 21 causaram 40% de imobilidade. Quando cultivados por seis dias, os COVs produzidos pelos isolados 3 e 21 causaram aproximadamente 40% de imobilidade. Porém, os produzidos pelo isolado 13 não afetaram a mobilidade.

**Figura 1-** Imobilidade de juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita* após exposição à diferentes períodos de tempo aos compostos orgânicos voláteis (COVs) produzidos por três isolados (3, 13 e 21) de *Fusarium oxysporum* cultivados em meio YES **A:** por 3 dias e **B:** por 6 dias.



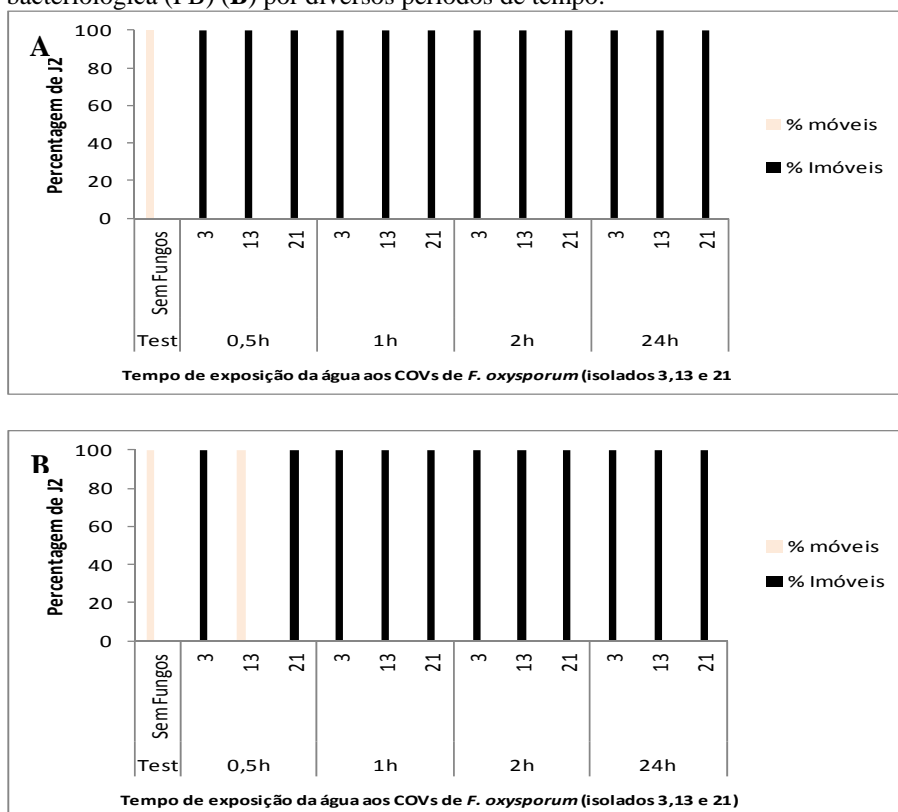


#### 4.3 Toxicidade da água exposta aos compostos orgânicos voláteis produzidos por isolados de *Fusarium oxysporum* aos juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita*.

A água quando exposta aos COVs produzidos pelos três isolados de *F. oxysporum* cultivados em meio YES tornou-se tóxica aos J2 de *M. incognita* em todos os períodos de exposição (0,5 h, 1 h, 2 h e 24 h) dos J2, causando 100% de imobilidade, e em igual intensidade entre os três isolados de *F. oxysporum* testados quando cultivados no meio YES. Na testemunha (meio sem replicagem fúngica), contudo, ocorreu 100% de mobilidade (Figura 2A). Também, a água exposta por 1 h, 2 h e 24 h aos COVs de isolados de *F. oxysporum* cultivados em meio com peptona bacteriológica (PB), causou 100 % de imobilidade dos J2. Entretanto, durante o período de 0,5 h de exposição, a água se tornou tóxica quando exposta aos COVs dos isolados 3 e 21, ocasionando 100% de imobilidade, mas não pelo isolado 13 em que 100% dos J2 permaneceram móveis (Figura 2B).

A mobilidade dos J2 de *M. incognita* foi restabelecida quando esses J2 foram deixados por 24 h na mesma água tóxica, mas em ambiente aberto.

**Figura 2** – Imobilidade e mortalidade de juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita* em água anteriormente exposta aos compostos orgânicos voláteis (COVs) de culturas de *Fusarium oxysporum* isolados (3, 13 e 21) cultivados em meio extrato de levedura e sacarose (YES) (A) e em meio de peptona bacteriológica (PB) (B) por diversos períodos de tempo.



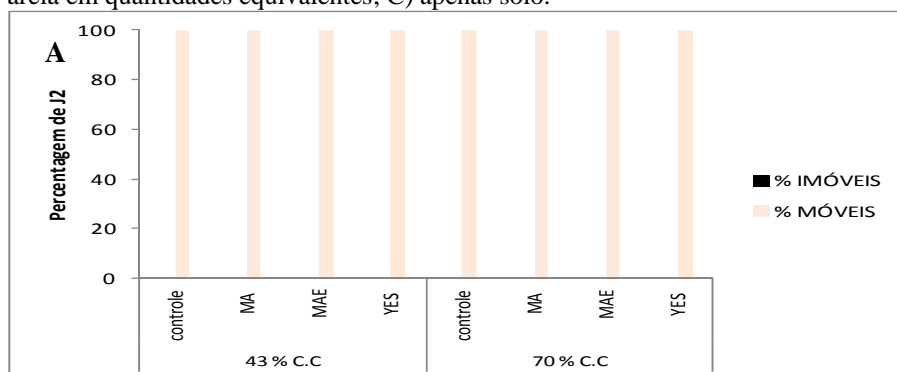
#### 4.4 Influência *in vitro* da adição de carbono e nitrogênio em solo cafeeiro natural com diferentes níveis de umidade na produção de compostos orgânicos voláteis tóxicos a *Meloidogyne incognita*.

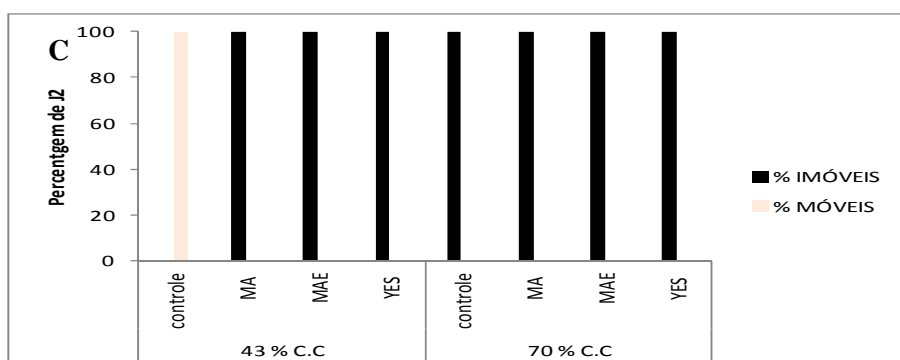
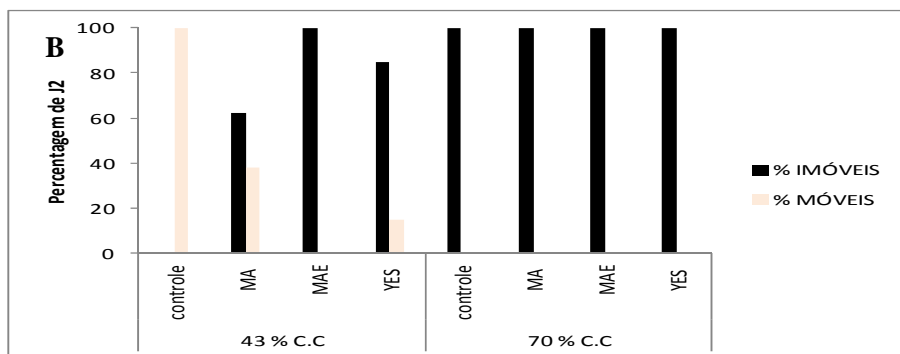
A mobilidade dos J2 de *M. incognita* expostos aos COVs oriundos da areia lavada incorporada a diversas fontes de carboidratos não foi afetada (Figura 3A). Entretanto, quando o solo foi misturado a areia lavada ou solo sem mistura, as mesmas fontes de carbono promoveram a produção de COVs que causaram 100% de imobilidade quando a umidade do solo foi ajustada para 70% da CC. Na umidade de 43% da CC, as fontes de carboidratos MA e YES proporcionaram a produção de COVs que causaram

respectivamente, 60% e 90% de imobilidade do J2 quando solo e areia foram misturados, porém a fonte MAE resultou em COVs que causaram 100% de imobilidade do J2. No controle, em que não foi incorporada nenhuma fonte de carbono, tanto o solo misturado a areia, como solo sem mistura e com umidade de 70% da CC, proporcionaram a produção de COVs que causaram 100% de imobilidade de J2, enquanto na umidade de 43% em qualquer tratamento com solo puro ou misturado com areia a produção de COVs não causou nenhuma imobilização dos J2 (Figura 3B e C).

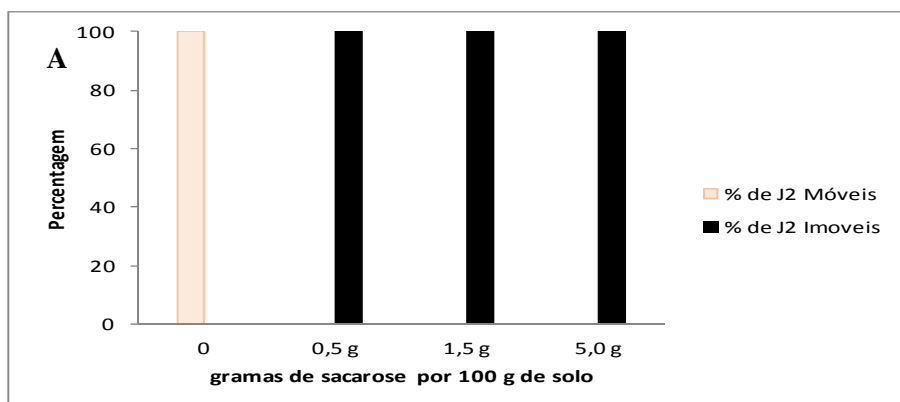
A adição de sacarose ou peptona ao solo cafeeiro nos ensaios realizados nos copos plásticos de 300 cm<sup>3</sup>, com umidade ajustada para 60 % da CC, estimulou a produção de COVs tóxicos a *M. incognita* pela microbiota do solo. Tanto as concentrações de 0,5%, 1,0% e 5,0% de sacarose ou p. bacteriológica causaram 100% de imobilidade dos J2 de *M. incognita*, enquanto que no controle sem adição de fonte de nutriente não se observou imobilidade dos J2 após o mesmo período de exposição dos J2. (Figura 4 A e B).

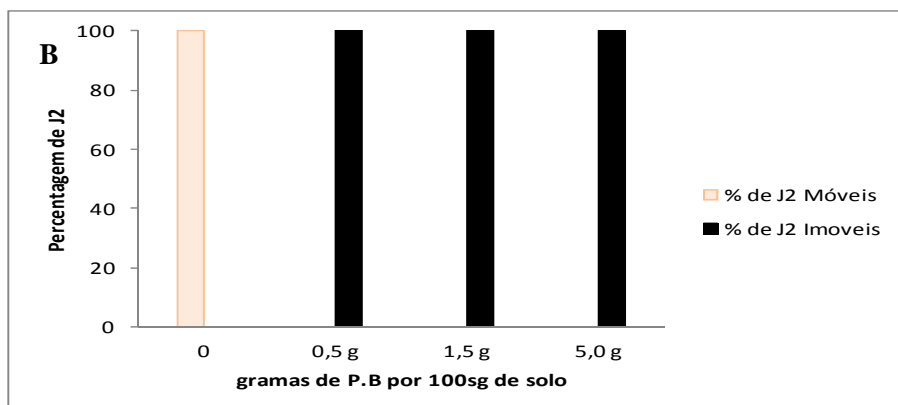
**Figura 3** - Imobilidade e mobilidade de juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita* após exposição por 48 horas aos compostos orgânicos voláteis produzidos no solo cafeeiro e em areia lavada incorporados ou não com ingredientes sólidos dos meios malte (MA), malte enriquecido (MAE), levedura sacarose (YES) em diferentes níveis de umidade. A) apenas areia lavada; B) solo + areia em quantidades equivalentes; C) apenas solo.





**Figura 4** – Imobilidade e mobilidade de juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita* após exposição por 48 horas aos compostos orgânicos voláteis produzidos no solo cafeeiro incorporados com sacarose ou peptona bacteriológica. A) solo + sacarose; B) solo + peptona bacteriológica.





## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 Influência da composição do meio de cultura na produção de COVs tóxicos à *Meloidogyne incognita*.

Os isolados de *F. oxysporum* somente produziram COVs tóxicos aos J2 de *M. incognita* em meio muito rico em carbono. Aparentemente esses dados são corroborados por Fiddaman e Rossall (1994) que observaram maior produção de COVs inibidores do crescimento do fungo *R. solani* por *B. subtilis* quando aumentou a quantidade de D-glicose no meio. Ezra e Strobel (2003), trabalhando com o fungo *M. albus* observaram que a adição ao meio agar-água de sacarose aumentou em 50% a atividade dos COVs tóxicos os micro-organismos testados.

Embora os isolados 3, 13 e 21 de *F. oxysporum* apresentaram diferenças na produção de COVs tóxicos a J2 de *M. incognita* com maior produção pelo isolado 21 nos ensaios conduzidos por Freire et al. 2012, a produção desses COVs tóxicos a J2 de *M. incognita* no ensaio aqui desenvolvido foi aumentado pelo cultivo dos isolados 3 e 13 em meio rico como o YES. Freire et al. (2012) relataram que os isolados 3 e 21 de *F. oxysporum* causaram 30 e 100 % de mortalidade a J2 de *M. incognita*, respectivamente quando cultivados no meio MAE e avaliados com 72 h de



exposição aos COVs tóxicos. Porém, no ensaio aqui relatado em que os isolados foram cultivados em MAE e expostos por 48 horas apenas não se observou toxicidade pelos COVs emitidos por nenhum dos isolados de *F. oxysporum* testados.

Também em meios enriquecidos com nitrogênio como TSA, PB, PM e PP os COVs produzidos pelos isolados de *F. oxysporum* causaram imobilidade de J2. Também esses dados são corroborados por Fiddaman e Rossall (1994) que observaram que a adição de fontes de nitrogênio como peptonas bacteriológica, micológica, protease, além do TSA aumentaram a produção de COVs tóxicos ao fungo *Rhizoctonia solani*.

## **5.2 Exposição de juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita* à diferentes períodos de tempo à compostos orgânicos voláteis produzidos por isolados de *Fusarium oxysporum* cultivados no meio YES e armazenados por três ou seis dias.**

As pesquisas realizadas com COVs tóxicos a micro-organismos têm sido desenvolvidas com exposição de fungos ou nematoides por três ou mais dias. Freire et al. (2012) e Riga, Lacey e Guerra (2008) expuseram por três dias os J2 de *M. incognita* aos COVs produzidos por *F. oxysporum* e *M. albus* respectivamente. Grimme et al. (2007) expuseram por 24 h, 72 h e 168 h. Em todos esses ensaios as técnicas empregadas não permitiam a introdução do micro-organismo teste após a formação da câmara de gás. Matysik, Herbarth e Mueller (2008) demonstraram que ocorre mudança na composição dos COVs produzidos por fungos durante o seu crescimento. Assim, os COVs produzidos nos primeiros dias de crescimento podem ser mais tóxicos que aqueles produzidos posteriormente ou vice-versa. Com a placa perfurada, aqui desenvolvida, os J2 de *M. incognita* foram expostos aos COVs produzidos durante as várias fases de crescimento dos isolados de *F. oxysporum* por três ou seis dias, evitando perdas dos COVs produzidos nos primeiros dias de cultivo do fungo quando a placa é aberta para a introdução dos J2 segundo a técnica de Fernando et al. (2005). Desta forma,

neste trabalho, avaliou-se de forma mais abrangente a produção de COVs pelos fungos e o nível variável de sensibilidade do J2 de *M. incognita* perante aos períodos de exposição aos COVs fúngicos. Resultados alcançados com outra técnica, que também possibilita a introdução do nematoide teste após a produção da câmara de gás, estão sendo publicados e demonstraram que os J2 de *M. incognita* apresentam alta mortalidade quando expostos por períodos superiores a 12 horas por COVs emitidos do solo (em fase de publicação)

### **5.3 Toxicidade da água exposta aos compostos orgânicos voláteis produzidos por isolados de *Fusarium oxysporum* aos juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita*.**

A toxicidade causada aos J2 de *M. incognita* pela água exposta aos COVs emitidos pelos isolados de *F. oxysporum* demonstra que essas moléculas são dissolvidas no meio aquoso onde estão os nematoides. Condição semelhante pode ocorrer na água do solo próxima ao habitat desses fungos. A toxicidade da solvatação dos COVs em água ao J2 de *M. incognita* foi comparável ao efeito volátil direto dos COVs de *F. oxysporum* nos tempos de exposição do J2 superiores a 3 h, obtidos no ensaio anterior. Porém, a água com os COVs dissolvidos demonstraram maior toxicidade ao J2 quando expostos por 30 minutos comparados ao efeito direto pelo mesmo período de exposição aos COVs de *F. oxysporum* cultivados em meio YES.

A toxicidade da água exposta aos COVs aqui relatada é corroborada por Grimme et al. (2007) trabalhando com o fungo *M. albus*. No referido ensaio, o fungo foi colocado para crescer no meio BDA (batata dextrose ágar) e a água exposta por cinco dias aos COVs produzidos pelo fungo. A toxicidade dessa água exposta aos COVs foi avaliada em J2 de *M. incognita* deixados por 24 h, 48 h, e uma semana. Com 24 h na água tóxica ocorreram 19% de imobilidade, enquanto os J2 deixados por uma semana tiveram 100% de imobilidade e no controle 30%.

Essa toxicidade dos COVs diluídos em água pode, talvez, explicar o efeito tóxico a distância dos COVs aos fitonematoides postulado por Wheatley (2002), pois os COVs movimentam pela porosidade do solo e ao encontrar água obstruindo tais poros são nele dissolvidos, e, então, entrariam em contato com os fitonematoides ali presentes. Entretanto, como os J2 deixados na mesma água tóxica se moveram após 24 horas ao que tudo indica a molécula volátil tóxica foi apenas temporariamente retida na água.

#### **5.4 Influência *in vitro* da adição de carbono e nitrogênio em solo cafeeiro natural com diferentes níveis de umidade na produção de compostos orgânicos voláteis tóxicos à *Meloidogyne incognita*.**

A fonte produtora dos COVs tóxicos aos J2 de *M. incognita* foi a microbiota presente no solo cafeeiro e ausente na areia lavada. Entretanto, a umidade e os nutrientes adicionados ao solo aumentaram a sua eficiência na produção dos COVs nos ensaios aqui realizados. Aparentemente, esses dados são corroborados pelos resultados alcançados por Browning et al. (1999) que demonstraram que apenas a aumento da umidade do solo já era suficiente para incrementar a mortalidade de nematoides presentes no solo e que a adição de fontes de carbono e de nitrogênio ao solo elevava ainda mais a eficácia da umidade na mortalidade dos nematoides. Nesse ensaio ocorreu mudança na estrutura da microbiota. A alta umidade favoreceu um grupo de microbiota anaeróbica produzindo COVs ainda mais tóxicos ao nematoide teste. Johnston (1959), observou que a produção de ácidos orgânicos por bactérias anaeróbicas foi responsável pelo declínio do nematoide *T. martini* em solo inundado e que a adição de farelo de milho e sacarose aumentou a atividade nematicida do solo. Hollis e Rodríguez-Kábana (1966) relataram drástica redução na população de nematoides após a adição de farelo de milho em solos inundados. Seewald et al. (2010) relataram que a detecção de COVs através da técnica PTR-MS só foi possível após a adição de glicose e

água ao solo. Nessa condição de anaerobiose aumentou a quantidade de COVs produzida.

Carmo (2012) observou a influência da umidade do solo na produção de COVs tóxicos a *M. incognita* em solos cafeeiros do Sul de Minas Gerais. Nos solos com umidade igual e superior a 70% ocorreram 100% de imobilidade pelos COVs emitidos pelos solos em ambientes hermeticamente fechados.

Embora a quantidade dos COVs produzidos nos vários ensaios já realizados não tenha sido avaliada, a pressão dos gases no ambiente fechado tem sido diferente de acordo com a mistura solo + areia. Quanto maior é a quantidade de solo nessa mistura maior é a pressão gasosa. Também aumenta a pressão de gás a adição de nutrientes ricos em carbono e nitrogênio. Em nossos ensaios, alguns tubos estouraram, quando os ensaios foram conduzidos no laboratório.

## 6 CONCLUSÕES

A composição do meio de cultivo onde os isolados de *F. oxysporum* são cultivados influenciou a produção de COVs tóxicos a J2 de *M. incognita*.

A exposição de J2 de *M. incognita* os COVs produzidos pelos isolados de *F. oxysporum* por períodos iguais ou maiores que três horas, causa 100% de imobilidade, quando a câmara de gás é formada por três ou seis dias de crescimento e os isolados cultivados nos meios YES ou peptona bacteriológica.

A água, quando exposta aos COVs produzidos pelos isolados de *F. oxysporum*, torna-se tóxica aos J2 de *M. incognita*.

A umidade, assim como a adição de carbono ou nitrogênio ao solo, influencia a produção de COVs pela microbiota natural do solo.

## REFERÊNCIAS

AKHTAR, M.; MALIK, A. Roles of soil amendments and soil organisms in the biological control of plant-parasitic nematodes: a review. **Bioresouce Technology**, Essex, v. 74, n. 1, p. 35-74, Apr. 2000.

BLAKE, C. D. Importance of osmotic potential as a component of the total potential of the soil water on the movement of nematodes. **Nature**, London, v. 192, p. 144-145, 1961.

BOTELHO, A. O. **Fatores de supressividade a *M. exigua* na rizosfera cafeeira no campo: nova técnica para avaliação de compostos orgânicos voláteis tóxicos a fitonematoides**. 2011. 99 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

BROWNING, M. et al. Effect of carbon amendment and soil moisture on *Tylenchorhynchus* spp. and *Hoplolaimus galeatus*. **Journal of Nematology**, College Park, v. 31, n. 4, p. 445-454, Dec. 1999.

BRUCE, A. et al. Effect of volatiles from bacteria and yeast on the growth and pigmentation of sapstain fungi. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Birmingham, v. 51, n. 1, p. 101-108, Mar. 2003.

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

CARMO, D. B. do. ***Pasteuria penetrans* e compostos orgânicos voláteis tóxicos a *Meloidogyne* sp. em cafezais comerciais do Sul de Minas, Minas Gerais**. 2012. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

CHEETHAM, P. S. J. Combining the technical push and business pull for natural flavours. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, New York, v. 55, p. 225-235, 1997.

CHUANKUN, X. et al. Soil volatile fungistasis and volatile fungistatic compounds. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 36, n. 12, p. 1997-2004, Dec. 2004.

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

- EZRA, D.; STROBEL, G. A. Effect of substrate on the bioactivity of volatile antimicrobials produced by *Muscodor albus*. **Plant Science**, Shannon, v. 165, n. 6, p. 1229-1238, Dec. 2003.
- FEDER, W. A. Osmotic destruction of plant-parasitic and saprophytic nematodes by the addition of sugar to soil. **Plant Disease Reporter**, Washington, v. 44, p. 883-885, 1960.
- FEDER, W. A.; HUTCHINS, P. C.; EICHHORN, J. L. **Reduction of soil-borne nematodes populations by selected carbohydrates**. Orlando: USDA Agricultural Research Service, 1964. 5 p.
- FERNANDO, W. G. D. et al. Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 37, n. 5, p. 955-964, May 2005.
- FIDDAMAN, P. J.; ROSSALL, S. Effect of substrate on the production of antifungal volatiles from *Bacillus subtilis*. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 76, n. 4, p. 395-405, Apr. 1994.
- FREIRE, E. S. et al. Volatile substances on the antagonism between fungi, bacteria and *Meloidogyne incognita* and potentially fungi for nematode control. **Journal of Nematology**, College Park, 2012. In press.
- GORDON, T. R.; MARTYN, R. D. The evolutionary biology of *Fusarium oxysporum*. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 35, p. 111-128, 1997.
- GRIMME, E. et al. Comparison of *Muscodor albus* volatiles with a biorational mixture for control of seedling diseases of sugar beet and root-knot nematode on tomato. **Plant Disease**, Shannon, v. 91, n. 2, p. 220-225, Feb. 2007.
- GU, Y. Q. et al. Evaluation and identification of potential organic nematicidal volatiles from soil bacteria. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 39, n. 10, p. 2567-2575, Oct. 2007.
- HOLLIS, J. P.; RODRÍGUES-KÁBANA, R. R. Rapid kill of nematodes in flooded soil. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 56, p. 1015-1019, 1966.
- HUSSEY, R. S.; BARKER, K. R. A comparison of methods for collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. **Plant Disease Report**, Saint Paul, v. 57, n. 12, p. 1025-1028, 1973.

INSAM, H.; SEEWALD, M. S. A. Volatiles organic compounds (VOC) in soils. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 46, n. 3, p. 199-213, Mar. 2010.

JONHSTON, T. M. **Antibiosis of *Clostridium butyricum* Prazmowski on *Tylenchorhynchus martini* Fielding**. 1959. 90 f. Dissertation (Master in Phytopathology) - Louisiana State University, Baton Rouge, 1959.

LAOTHAWORNKIKUL, J. et al. Biogenic volatile organic compounds in the earth systems. **New Phytologist**, Cambridge, v. 183, n. 1, p. 27-51, 2009.

LYNCH, J. M.; HARPER, H. T. Formation of ethylene by a soil fungus. **Journal of General Microbiology**, London, v. 80, p. 187-195, 1974.

MATYSIK, S.; HERBARTH, O.; MUELLER, A. Determination of volatile metabolites originating from mould growth on wall paper and synthetic media. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 75, n. 2, p. 182-187, Oct. 2008.

MINERDI, D. et al. Volatile organic compounds: a potential direct long-distance mechanism for antagonistic action of *Fusarium oxysporum* strain MSA 35. **Environmental Microbiology**, Washington, v. 11, n. 4, p. 844-854, Apr. 2009.

OKA, Y. Mechanisms of nematode suppression by organic soil amendments: a review. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 44, n. 1, p. 101-115, Jan. 2010.

PERRY, R. N.; MOENS, M.; STARR, J. L. **Root-knot nematodes**. Wageningen: CABI, 2009. 2 p.

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

RICH, J. R.; DUNN, R.; NOLING, J. Nematicides: past and present uses. In: CHEN, Z. X.; CHEN, S. Y.; DICKSON, D. W. (Ed.). **Nematology: advances and perspectives**. Oxford: CABI, 2004. p. 1041-1082. (Nematode Management and Utilization, 2).

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

RODRÍGUEZ-KÁBANA, R. Organic and inorganic amendments to soil as nematode suppressants. **Journal of Nematology**, College Park, v. 18, n. 2, p. 129-135, 1986.

SANTIAGO, D. C. et al. Potential of sucrose and *Pennisetum purpureum* cv. Cameroon Mulch on the Management of *Meloidogyne javanica* and *M. incognita*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 48, n. 6, p. 873-883, Dec. 2005.

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

SEEWALD, M. S. A. et al. Substrate-induced volatile organic compound emissions from compost-amended soils. **Journal of Biological and Environmental Sciences**, Turkey, v. 46, n. 4, p. 371-382, Apr. 2010.

TRUDGILL, D. L.; BLOCK, V. C. Apomitic, polyphagous root-knot nematodes: exceptionally successful and damaging biotrophic root pathogens. **Annual Reviews of Phytopathology**, Palo Alto, v. 39, p. 53-77, 2001.

VAWDREY, L. L.; STIRLING, G. R. Control of root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*) on tomato with molasses and other organic amendments. **Australasian Plant Pathology**, Melbourne, v. 26, n. 3, p. 179-187, June 1997.

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