



JULIO CARLOS PEREIRA DA SILVA

**Toxicidade de compostos orgânicos voláteis de
Cymbopogon nardus, *Piper nigrum*, *Brassica
oleracea*, *Helianthus annuus* e *Bertholletia excelsa* a
*Meloidogyne incognita***

LAVRAS – MG

2012

JULIO CARLOS PEREIRA DA SILVA

Toxicidade de compostos orgânicos voláteis de *Cymbopogon nardus*, *Piper nigrum*, *Brassica oleracea*, *Helianthus annuus* e *Bertholletia excelsa* a *Meloidogyne incognita*

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

Orientador

Dr. Vicente Paulo Campos

LAVRAS - MG

2012

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

Silva, Julio Carlos Pereira da.

Toxicidade de compostos orgânicos voláteis de *Cymbopogon nardus*, *Piper nigrum*, *Brassica oleracea*, *Helianthus annuus* e *Bertholletia excelsa* a *Meloidogyne incognita* / Julio Carlos Pereira da Silva. – Lavras : UFLA, 2012.

54 p. : il.

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

Orientador: Vicente Paulo Campos.

Bibliografia.

1. COVs de plantas. 2. Controle biológico. 3. Nematoides das galhas. 4. Fitonematoides. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 632.2

JULIO CARLOS PEREIRA DA SILVA

**Toxicidade de compostos orgânicos voláteis de *Cymbopogon nardus*,
Piper nigrum, *Brassica oleracea*, *Helianthus annuus* e *Bertholletia excelsa*
a *Meloidogyne incognita***

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

APROVADA em 06 de setembro de 2012.

Dra. Sonia Maria de Lima Salgado

EPAMIG

Dr. Flávio Henrique Vasconcelos de Medeiros

UFLA

Dr. Vicente Paulo Campos

Orientador

LAVRAS - MG

2012

Ao meu pai e minha mãe, por todo esforço e apoio na minha vida acadêmica.

À minha irmã, meu cunhado, meus sobrinhos e todos os familiares.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), por permitir a realização do mestrado.

Ao CNPq, pela bolsa de estudo.

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

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

A minha namorada Aline Fonseca pela paciência, amor e compreensão.

Aos amigos de laboratório, Aline Barros, Livia Pimenta, Luma, Felipe, Thaisa, Marina, Alex, Liliana, Arinaldo, Eduardo, Lilian, Willian, Cleber e Tarley, por toda dedicação, companheirismo e ajuda nos experimentos.

Aos amigos do DFP/UFLA, Steffany Araújo e Marina Rondon, e toda equipe do Núcleo de estudo – NEFIT pelo apoio e amizade.

Aos companheiros da República Intrometeu Frederico, Mateus Jaime, Mateus, Guilherme, Paulo, Pedro, Gustavo Komori, Gustavo Bacelar, Vitor e João Paulo, pelos momentos de diversão e amizade.

Resumo

As plantas emitem compostos orgânicos voláteis (COVs) com funções variadas na natureza, incluindo a toxicidade a fitopatógenos apesar de, ainda, pouco conhecida. Essa toxicidade a fitonematóides explica parte da ação de plantas e seus resíduos no controle desses patógenos. Para explicar esse modo de ação, algumas plantas foram selecionadas para se estudar o efeito de COVs emitidos por seus extratos aos juvenis de segundo estágio (J₂) de *Meloidogyne incognita* empregando-se a técnica desenvolvida com tubo SUPELCO®. Os extratos vegetais foram colocados no interior do tubo ao lado de um microtubo aterrado até sua metade em areia esterilizada, que serve de suporte, e fechado. Após a formação da câmara de gás os J₂ de *M. incognita* foram injetados no microtubo interno, por meio de uma seringa, perfurando a película de silicone interposta entre a tampa e o frasco para garantir vedação hermética. Outra técnica, a da placa bipartida, foi empregada na avaliação da toxicidade da água exposta aos COVs de plantas aos J₂ de *M. incognita*. Os extratos de inflorescência de brócolis, folhas de pimenta-do-reino e de citronela, sementes de girassol e de castanha do Pará emitiram COVs que causaram 100% de imobilidade dos J₂ com decréscimo, dessa atividade, quando os extratos de brócolis, pimenta e citronela foram preparados com adição de água. Os J₂ de *M. incognita* imersos em água, que fora exposta aos COVs emitidos pelo brócolis, apresentaram 98% de imobilidade. Os extratos de sementes de girassol causaram alta mortalidade e redução da infectividade (número de galhas e ovos.g⁻¹ de raiz) em tomateiros quando os J₂ foram expostos aos seus COVs. Ocorreu, também, aumento na mortalidade e diminuição na infectividade em tomateiro, quando os J₂ foram expostos a esses COVs entre 3 e 72 horas de exposição. Os COVs de plantas, avaliados por técnicas que só permitem seu contato com o nematoide pelo ar, causaram toxicidade mesmo em pequeno período de exposição dos J₂.

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

Abstract

The plants emit volatile organic compounds (VOCs) with various functions in the nature including the toxicity to plant pathogenic microorganisms but, yet, almost unknown. This toxicity to plant parasitic nematodes explains part of plant action and their residues on the control of these pathogens. To explain this mode of action, some plants were studied for the effect of VOCs emitted by their extracts to second stage juvenile (J_2) of *Meloidogyne incognita* using the technique developed with SUPELCO tubes. The plant extracts were placed in the tube on the side of a microtube half digged in sterilized sand, which served as a support, and closed by twisting the lid tightly. After gas chamber formation, the *M. incognita* J_2 suspension were injected into the internal microtube through a syringe perforating the silicone cap placed between the lid and the flask to guarantee hermetical sealing. Other technique - the compartmental petri dish - was used to evaluate the water toxicity to *M. incognita* J_2 , previously exposed to plant VOCs. The extracts of broccolis inflorescence, leaves of black pepper and citronella and seeds of Brazilian nut and sunflower emitted VOCs which caused 100% J_2 immobility, but the activity decreased when extracts of broccolis, black pepper and citronella were prepared with water addition. The *M. incognita* J_2 immersed into sterilized water that was previously exposed to VOCs of broccolis, presented 98% immobility. The exposition of *M. incognita* J_2 to VOCs emitted by sunflower seed extracts caused high mortality and reduction of tomato infectivity (number of galls and eggs.g⁻¹ of roots). Also occurred increase in mortality and decrease the tomato infectivity when the J_2 s were exposed to these VOCs between 3 and 72 hours of J_2 exposition. The plant VOCs evaluated by techniques that only permit their contact to the test nematodes by air caused toxicity even in short J_2 exposition time.

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

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
2 REFERENCIAL TEÓRICO	11
2.1 Importância econômica dos fitonematoides e alternativas de controle	11
2.2 Plantas antagonistas a fitonematoides	12
2.3 Moléculas presentes em plantas responsáveis pelas atividades contra nematoides	15
2.4 Compostos orgânicos voláteis na natureza	16
2.5 Compostos orgânicos voláteis encontrados nas plantas	18
2.6 Produção e função de compostos orgânicos voláteis em plantas	20
2.7 Compostos voláteis produzidos por plantas e tóxicos a nematoides	21
3 MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1 Coleta de material vegetal.....	23
3.2 Obtenção de ovos e juvenis do segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne incognita</i>.....	23
3.3 Toxicidade de compostos orgânicos voláteis de cinco espécies de plantas aos juvenis de segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne incognita</i> ..	24
3.4 Mortalidade e infectividade de juvenis do segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne incognita</i> em tomateiros após exposição a compostos orgânicos voláteis (COVs) de sementes de girassol e inflorescência de brócolis.....	25
3.5 Efeito do tempo de exposição de juvenis de segundo estágio (J₂) de <i>Meloidogyne incognita</i> aos compostos orgânicos voláteis (COVs) produzidos por plantas na mortalidade e infectividade em tomateiro. .	27
3.6 Toxicidade da água exposta aos compostos orgânicos voláteis produzidos por macerados a seco de sementes de girassol e de	

inflorescência de brócolis aos juvenis de segundo estágio (J ₂) de <i>Meloidogyne incognita</i>	28
4 RESULTADOS	29
4.1 Toxicidade de compostos orgânicos voláteis (COVs) de cinco espécies de plantas aos juvenis de segundo estágio (J₂) de <i>Meloidogyne incognita</i>.	29
4.2 Mortalidade e infectividade de juvenis do segundo estágio (J₂) de <i>Meloidogyne incognita</i> em tomateiros após exposição aos compostos orgânicos voláteis (COVs) de inflorescência de brócolis e sementes de girassol.	32
4.3 Efeito do tempo de exposição de juvenis de segundo estágio (J₂) de <i>Meloidogyne incognita</i> aos compostos orgânicos voláteis (COVs) produzidos por plantas na mortalidade e infectividade em tomateiros.	35
4.4 Toxicidade da água exposta aos compostos orgânicos voláteis produzidos por macerados a seco de sementes de girassol e de inflorescência de brócolis aos juvenis de segundo estágio (J₂) de <i>Meloidogyne incognita</i>.	39
5 DISCUSSÃO	40
5.1 Toxicidade de compostos orgânicos voláteis de órgãos de plantas a juvenis do segundo estágio (J₂) de <i>Meloidogyne incognita</i>	40
5.2 Mortalidade e infectividade de juvenis do segundo estágio (J₂) de <i>Meloidogyne incognita</i> em tomateiros após exposição a compostos orgânicos voláteis de plantas	42
5.3 Curva de tempo de exposição de <i>Meloidogyne incognita</i> aos compostos orgânicos voláteis (COVs) produzidos por plantas em relação à mortalidade e infectividade dos juvenis de segundo estágio (J₂) em plantas de tomateiro.	44
5.4 Toxicidade da água exposta aos compostos orgânicos voláteis produzidos por macerados a seco de sementes de girassol e de inflorescência de brócolis aos juvenis de segundo estágio (J₂) de <i>Meloidogyne incognita</i>.	45

6 CONCLUSÕES.....	46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47

1 INTRODUÇÃO

O uso de resíduos vegetais nos solos agrícolas, além de melhorar a fertilidade e a estrutura, constitui-se em método de controle de patógenos disseminados pelo solo, incluindo os fitonematoides (OKA, 2009). Tanto substâncias dos extratos quanto dos exudados de plantas apresentam compostos orgânicos voláteis (COVs), que afetam as interações entre micro-organismos (COSTA et al., 2001).

As plantas produzem mais de 1700 COVs com algumas funções já estabelecidas (KNUDSEN; GERSHENZON, 2006), incluindo comunicação e interação entre organismos (DUDAREVA et al., 2006). COVs emitidos por plantas atraem insetos polinizadores, ou, em alguns casos, repelem ou intoxicam herbívoros ou fitopatógenos (VANCANNEYT et al., 2001).

A toxicidade de COVs de plantas a fitopatógenos é de interesse agrícola, porém, é pouco estudada. A importância, entretanto, dos COVs de plantas na população de fitopatógenos têm sido pesquisada em ambientes herméticos, envolvendo principalmente crucíferas (OKA, 2009). Ensaio realizados a fim de controlar *Meloidogyne javanica* em plantas de tomate em casa de vegetação, mostraram que a biofumigação do solo com brócolis, couve-flor e mostarda diminuiu tanto o número de galhas, como o número de ovos presentes na rizosfera do tomateiro (NEVES et al., 2007). O óleo de mostarda também mostrou efeitos na redução da infectividade, quando aplicado em vasos infestados com *M. javanica* (NEVES et al., 2009). Nessas pesquisas, contudo, a toxicidade dos COVs vegetais aos nematoides não foi separada daquela presente na fração líquida do solo, não mostrando o efeito exclusivo dos COVs.

Avanços no estudo de COVs, separados das moléculas não voláteis, emitidos por fungos e bactérias de solo, têm sido alcançados na última década (CAMPOS; PINHO; FREIRE, 2010; KAI et al., 2009). COVs produzidos por seis isolados do fungo *Fusarium oxysporum* causaram mais de 78% de imobilidade a juvenis de segundo estágio (J₂) de *M. incognita*, dentre eles, dois isolados causaram alta mortalidade (FREIRE et al., 2012).

COVs produzidos por isolados de *Bacillus megaterium*, causaram 100% de mortalidade em J₂ de *M. incognita* após 24 horas de exposição (HUANG et al., 2010). COVs emitidos por solos cafeeiros foram tóxicos a J₂ de *M. exigua* (BOTELHO, 2010).

Estudos de COVs de plantas, separados de outras moléculas não voláteis, trarão avanço na definição de sua importância no controle de fitopatógenos com plantas e seus resíduos, além de definir novo modo de ação de moléculas vegetais. As pesquisas sobre COVs de plantas a fitonematoides têm sido pouco enfatizadas e necessitam de estudos com técnicas específicas, que garantem o contato dos COVs com os nematoides apenas pelo ar. Desta forma, objetivou-se com esse trabalho: 1) estudar a toxicidade dos COVs emitidos por folhas de citronela e de pimenta-do-reino, inflorescência de brócolis e sementes de girassol e de castanha do Pará a *M. incognita*; 2) definir o tempo mínimo de exposição dos J₂ de *M. incognita* aos COVs, capaz de causar toxicidade significativa aos J₂; 3) estudar a capacidade tóxica aos J₂ de *M. incognita* dos COVs de extrato vegetal, em extrato aquoso ou a seco; 4) verificar a possibilidade da água, exposta aos COVs de plantas, tornar-se tóxica aos J₂ de *M. incognita*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Importância econômica dos fitonematoides e alternativas de controle

Os nematoides fitoparasitas causam perdas que variam de imperceptíveis até a morte de grande número de plantas, chegando a inviabilizar áreas para o plantio. Estima-se que em todo o mundo haja um prejuízo de cerca de 100 bilhões de dólares anuais. Setenta por cento dos danos causados por fitonematoides são atribuídos aos nematoides de galhas, *Meloidogyne spp.* (SASSER; FRECKMAN, 1987). *Meloidogyne spp.* provocam nas plantas diversos sintomas como a presença de galhas nas raízes, redução e deformação do sistema radicular, decréscimo da eficiência

das raízes na absorção e translocação de água e nutrientes, clorose e menor crescimento da parte aérea, culminando com a redução da produção (TIHOHOD, 1993), além de poderem interagir com outras doenças, pela predisposição das plantas à infecção por fungos ou bactérias. Consequentemente, o controle desses patógenos é vital para a exploração agrícola comercial, o que tem sido feito com o uso de nematicidas sintéticos, resultantes da indústria petroquímica (CAMPOS, 1997). O grande problema é que tais substâncias podem ser contaminantes de águas e alimentos, pois são altamente tóxicas. Atualmente, entre os métodos mais utilizados para o manejo de fitonematoides, além da utilização de nematicidas químicos, podem ser citados: o uso de cultivares resistentes e de rotação de culturas. Além desses, o controle biológico tem se mostrado uma alternativa muito eficaz associado a outras táticas de controle.

Já foram relatados mais de 200 organismos considerados inimigos naturais dos fitonematoides, como fungos, bactérias, nematoides predadores, tardígrados, colêmbolas e ácaros (KERRY, 1990). Esse componente biológico do ecossistema do solo é particularmente importante em limitar ou estabilizar as populações dos nematoides através de mecanismos de competição, parasitismo e produção de compostos tóxicos (LOPES, 2007).

Alguns métodos de controle visam à aplicação de extratos ou resíduos produzidos por plantas agindo contra os fitonematoides, mostrando mais uma alternativa no manejo de doenças causadas por esses patógenos. Também, algumas espécies de plantas produzem substâncias nematicidas que são exsudadas no solo atuando na redução desses patógenos.

2.2 Plantas antagonistas a fitonematoides

Muitos compostos nematicidas foram isolados e identificados a partir de plantas (CHITWOOD, 2002). Aumentando, assim, as justificativas para o uso de extratos de plantas, adubação verde ou biofumigação no controle desses patógenos. O uso de resíduos de plantas da família

Asteraceae no controle de fitonematoides tem sido relatado em vários estudos (OKA, 2009). O gênero mais estudado desse grupo é o *Tagetes*, utilizado em rotação de culturas ou incorporados ao solo para controle de nematoides, principalmente em áreas infestadas por *Pratylenchus* e *Meloidogyne* spp. A folhagem de *Tagetes patula* incorporado ao solo infestado com *Meloidogyne incognita* reduziu sua infecção (PLOEG, 2000). Também, outras plantas da família *Asteraceae* já demonstraram efeitos contra fitonematoides. Extratos de *Artemisia* spp., *A. verlotorum* e *A. absinthium*, mostraram atividade nematicida contra *M. incognita* (DIAS et al., 2000). Plantas de mamona (*Ricinus communis*) também apresentam potencial na rotação de culturas e adubação verde para supressão de *Meloidogyne arenaria* (RITZINGER; MCSORLEY, 1998), além de sua torta de resíduos apresentar efeito nematicida quando adicionada ao solo (AKHTAR; MAHMOOD, 1996).

Plantas de *Crotalaria* spp. são utilizadas como cobertura bem como em rotação de culturas, seguida de incorporação ao solo, devido ao seu efeito na supressão de nematoides, além da sua capacidade como fixadoras de nitrogênio (WANG et al., 2001). Rocha e Campos (2004) induziram a formação de callus, por meio de hormônios em *Crotalaria juncea* e em culturas de tomateiro, cafeeiro, alfafa, orquídea, mostarda, batata doce, fumo e cenoura, para demonstrar o efeito dos exudatos dessas plantas contra nematoides. Ovos ou juvenis de segundo estágio (J_2) de *Meloidogyne incognita* foram incubados nesses exsudatos e então avaliados quanto às percentagens de eclosão, mobilidade e mortalidade dos J_2 . Com exceção dos ovos incubados em exsudato de orquídea, todos os demais inibiram a eclosão. Além disso, todos aumentaram a mortalidade, com maior intensidade em 24 horas de exposição.

Estudos realizados por Henderson et al. (2009), mostraram o efeito da incorporação de farinha de sementes de mostarda (*Brassica carinata*), contra *Meloidogyne chitwood* em campos de batata. A farinha de sementes mostrou eficiência na redução de danos e aumento na produção de

tubérculos. Salgado e Campos (2003) estudaram a eclosão e a mortalidade de J₂ de *Meloidogyne exigua* em exposição direta a extratos aquosos de urucum-colorau (*Bixa orellana*), cravo-da-Índia (*Syzygium aromaticum*), canela (*Cinnamomum zeylanicum*), pimenta-do-reino (*Piper nigrum*), gengibre (*Zingiber officinale*), salsa (*Petroselinum crispum*), soro de leite, solução nutritiva hidropônica, solução aquosa de cloreto de sódio (NaCl) e açúcar (sacarose), fermento biológico e probiótico. Entre todos os extratos e produtos testados, maior inibição da eclosão ocorreu no soro de leite, probiótico, canela e cravo-da Índia, destacando-se o soro de leite e o extrato de canela, que além de inibirem a eclosão, também foram altamente tóxicos aos J₂.

Espécies utilizadas como medicinais, em alguns países, já foram estudadas quanto à possibilidade de serem usadas no controle de fitonematoides. Dias et al. (2000) estudaram extratos aquosos obtidos pela maceração e infusão de treze espécies medicinais, quanto a atividade nematostática e nematicida a J₂ de *M. incognita*. Percentagens de J₂ inativos foram avaliadas após 1, 6 e 24 horas de exposição para cada extrato. Os extratos oriundos de macerados, geralmente, apresentaram maior efeito do que as infusões. Os melhores resultados foram obtidos com menstrasto, bardana, artemísia, losna, confrei e catinga de mulata, bem como pelas infusões de catinga de mulata e melão de São Caetano. Um grande número de plantas medicinais é usado há muito tempo no tratamento de parasitas de animais. Almeida et al., (2003) avaliaram, *in vitro*, extratos aquosos de *Cymbopogon citratus* (Capim-limão) e *Digitaria insularis* (Capim-açu) a juvenis de nematoides gastrintestinais de caprinos (superfamília *Strongyloidea*), que chegaram a causar 95% de mortalidade em ambas as plantas.

Várias plantas aromáticas possuem compostos com capacidade antimicrobiana e inseticida. Assim, plantas condimentares têm sido estudadas quanto aos seus efeitos nematicidas. Piedra-Buena et al. (2007) avaliaram o efeito de derivados de pimenta no controle de *Meloidogyne*

incognita em plantas de tomateiro e verificaram redução do número de galhas em experimentos *in vitro*.

Óleos extraídos de plantas têm apresentados efeitos nematicidas. Oka et al. (2000) estudaram propriedades nematicidas de óleos essenciais de 27 espécies de plantas aromáticas no antagonismo de *Meloidogyne javanica*. Vinte das vinte e sete essências de plantas imobilizaram mais de 80% dos J₂ a uma concentração de 1 µl.l⁻¹, sugerindo que óleos essenciais apresentam capacidade para o controle do nematoide.

O uso de plantas que contém compostos nematicidas em rotação de cultura e sua incorporação ao solo, pode ser mais eficaz no controle de nematoides do que com plantas não hospedeiras que não possuem compostos nematicidas (HALBRENDT, 1996).

2.3 Moléculas presentes em plantas responsáveis pelas atividades contra nematoides

Muitos compostos preexistentes foram relatados em materiais vegetais e são liberados das preparações quando incorporados ao solo. O Neem (*Azadirachta indica*), por exemplo, apresenta os limonoides inseticidas, incluindo azadiractina, nimbin e salannin, que têm sido relatados como sendo seus principais compostos nematicidas (AKHTAR, 1996). Em *Tagetes sp.* é encontrado α -tertienil, que possui atividade nematicida. Em *Crotalaria spectabilis*, foi isolada a monocrotalina, que inibe a movimentação de *M. incognita* (FASSULIOTIS; SKUCAS,1969). Dois alcoóis, apresentando atividade na inibição da eclosão de J₂ de *M. incognita* foram isolados de plantas de *Mucuna pruriens* (Nogueira et al.,1996).

Durante a decomposição, muitas alterações ocorrem no material vegetal incorporado ao solo, ocorrendo liberação de compostos nematicidas. Os isotiocianatos, gerados pelos glucosinolatos na biofumigação com *Brassicas*, como a mostarda e brócolis, são conhecidos por possuir ampla atividade pesticida e são semelhantes em relação a compostos fumigantes de

solo encontrados no mercado, como dazomet, que libera isotiocianato de metila (OKA, 2009). Algumas plantas contêm glicosídeos que liberam outros compostos nematicidas, como na mandioca (*Manihot esculenta*) que contêm diferentes quantidades de glicosídeos cianogênicos (CHITWOOD, 2002). Além desses, muitos outros compostos voláteis e não voláteis são conhecidos por serem gerados a partir de decomposição de materiais orgânicos sob condições de solo aeróbicas ou anaeróbicas (GAMLIEL; STAPLETON, 1993).

Os alcaloides são amplamente distribuídos na natureza, principalmente em plantas medicinais. Matsuda et al. (1991) isolaram de *Sophora flavescens* (Fabaceae) cinco alcaloides (N-metilcitisina, anagirina, matrina, sofocarpina e soforamida) com atividade nematicida contra *Bursaphelenchus xylophilus*, além de outros dois alcaloides, nicotina e citisina, que apresentaram atividades um pouco melhor contra este fitonematoide.

A lignificação e os compostos fenólicos têm sido associados à resistência de plantas a pragas e patógenos. Mahmoodi (1993) mostrou o efeito da imersão de raízes de tomate em soluções de cinco compostos fenólicos (pirocatecol, hidroquinona, floroglucinol, pirogalol e orcinol), onde ocorreu inibição significativa na infecção por *Rotylenchulus reniformis*.

O desenvolvimento de fitoquímicos nematicidas ainda não atingiu sua maturidade. Esforços em grande parte consistiram em pesquisa básica ou descritiva. Um aspecto notável desta pesquisa descritiva é o pequeno número de famílias botânicas examinadas (CHITWOOD, 2002), sendo assim, várias plantas e suas moléculas devem, ainda, ser estudadas quanto ao seu potencial tóxico a fitonematoides.

2.4 Compostos orgânicos voláteis na natureza

O termo compostos orgânicos voláteis (COVs) inclui gases residuais orgânicos na atmosfera excluindo o dióxido de carbono e monóxido de

carbono, tendo como foco os hidrocarbonetos, porém, excluindo o metano. Assim, um grande número de grupos de derivados saturados, insaturados, e oxigenados estão incluídos dentro de COVs, como os isoprenoides (isopreno e monoterpenos), bem como alcanos, alcenos, carbonilas, álcoois, ésteres, éteres e ácidos (KESSELMEIER; STAUDT, 1999).

Os COVs são moléculas com até 20 átomos de carbono com alta pressão de vapor, podem atravessar as membranas livremente e são liberados na atmosfera ou no solo, na ausência de uma barreira de difusão (PICHERSKY et al., 2006).

O solo e os resíduos orgânicos também produzem COVs, principalmente pelo resultado do crescimento de bactérias e fungos habitantes do solo (ISODOROV; JDANOVA, 2002). Estudos sobre a emissão de COVs por bactérias e fungos têm sido feitos por muitos pesquisadores por longo tempo. Os COVs produzidos por micro-organismos servem como: infoquímicos para a comunicação inter e intraorganismos, interferência de sinais de comunicação célula-célula, uma possível válvula de escape de carbono ou promoção do crescimento ou de inibição de agentes (KAI et al., 2009).

Estudos sobre voláteis devem ser feitos em ambientes fechados. Quando envolve a planta inteira, as aparelhagens necessárias aumentam os custos. Técnicas simples têm sido utilizadas nos estudos das interações entre microrganismos (CAMPOS et al., 2010). Testes têm sido realizados em sua maioria *in vitro*, avaliando-se imobilidade e mortalidade de J₂ e eclosão de J₂ de ovos de nematoides, pela exposição aos COVs sem avaliações adicionais da infectividade e reprodução em plantas infectadas pelos fitonematoides expostos aos voláteis. Freire *et al.* (2012), utilizando placas bipartidas, testaram COVs de isolados fúngicos contra J₂ de *M. incognita* e obtiveram altos níveis de imobilidade (acima de 78%) de 6 isolados de *Fusarium oxysporum*.

2.5 Compostos orgânicos voláteis encontrados nas plantas

Como já mencionado, vários grupos químicos compõem os compostos orgânicos voláteis (COVs). Vários deles estão presentes nas plantas, perfazem 1% dos metabólitos envolvidos no metabolismo secundário (DUDAREVA et al., 2006). Os terpenos - maior classe de metabólitos secundários vegetais - têm muitos representantes voláteis. A maioria dos hemiterpenos, monoterpenos, sesquiterpenos, e até mesmo alguns diterpenos, têm altas pressões de vapor na atmosfera normal, o que permite emissão significativa para o ar (DUDAREVA; PICHERSKY; GERSHENZON 2004). Isoprenos e monoterpenos pertencem à classe bioquímica dos isoprenoides (terpenoides), cujos esqueletos de carbono são compostos de unidades C₅ características (MCGARVEY; CROTEAU, 1995).

Monoterpenos são conhecidos por constituir a principal fração de óleos essenciais que são produzidos e armazenados em órgãos secretores das plantas como tricomas glandulares e dutos de resina ((KESSELMEIER; STAUDT, 1999). Por exemplo, folhas de laranjeiras contêm grandes quantidades de sabineno e limoneno, mas, principalmente, emite o cariofileno sesquiterpeno (BIOGENIC EMISSION IN THE MEDITERRANEAN AREA - BEMA, 1997). Por outro lado, algumas espécies de carvalho emitem grandes quantidades de monoterpenos, mas não os armazenam (LORETO et al., 1996). Isoprenos nunca são armazenados nas plantas após a sua produção, mas sim rapidamente perdidos por volatilização. São particularmente comuns nas famílias *Salicaceae*, *Fagaceae*, e *Palmae*, bem como no gênero *Picea* e diversas samambaias (TINGEY et al, 1987).

Fontes terrestres de alcanos (C₂-C₄) são árvores, culturas agrícolas, grama e merismas, com uma possível troca bidirecional entre etano e propano (HAHN; STEINBRECHER; STAHL 1992 Boeckx, Cleemput e Vermoesen (1997) relataram taxas de produção baixas para etano e propano

em amostras de solo, que está de acordo com estudos do solo dentro de um campo de trigo por Hahn, Steinbrecher e Stahl (1992). Os dados apontam para vegetação como a fonte mais importante na emissão terrestre, onde as culturas agronômicas apresentam maior porcentagem de emissões de eteno e propeno comparadas às árvores florestais cuja emissão em grande quantidade é de isoprenoides (PARUSEL, 1996). Entretanto, existe conhecimento suficiente e disponível pela produção vegetal apenas para a síntese de etanol (KESSELMEIER; STAUDT, 1999).

Ácidos orgânicos são encontrados em vários espaços geoquímicos, incluindo a atmosfera, biosfera, solos, e na hidrosfera (GRAEDEL; WESCHLER, 1981). Devido à sua alta pressão parcial, os ácidos fórmico e acético são particularmente considerados como as moléculas mais importantes na fase volátil. Sanhueza e Andreae (1991) mostraram evidências de que solos podem representar fontes de ácidos fórmico e acético. No entanto, emissões pela vegetação, direta ou indiretamente, devem desempenhar um papel dominante na emissão troposférica de ácidos orgânicos (KEENE; GALLOWAY, 1986). Estudos com árvores florestais e culturas agrícolas (KESSELMEIER et al., 1998) mostram que as árvores são geralmente consideradas como emissoras direta de ambos, os ácidos: fórmico e acético, enquanto as culturas agrícolas atuam como fonte de escape significativa.

As carbonilas desempenham papel importante na química da atmosfera devido à sua contribuição ao ozônio troposférico. Elas estão envolvidas em reações fotoquímicas onde a clivagem fotolítica de aldeídos representa uma importante fonte de radicais livres na atmosfera. Contribuições biogênicas à concentração atmosférica de aldeídos podem ser derivadas do conhecimento sobre a liberação direta ou indireta pela vegetação. Medições realizadas por Nondek et al. (1992) indicaram a emissão de formaldeído e de acetaldeído em vegetação florestal.

Um número elevado de espécies de alcoóis e ésteres, inicialmente atribuídos como peças essenciais de odores nas flores, é emitido pela

vegetação. Estes compostos são provavelmente de menor importância quando comparados com terpenoides, pois são encontrados em menor quantidade na maioria dos vegetais. Entretanto alcoóis e ésteres de folha representam parte significativa das emissões de COVs em várias plantas, que vão desde um pequeno percentual (uva, laranja, pistache, algodão e noqueira) até 50-100% (alfafa, amêndoas, damasco, nectarina, pêssego e ameixa) (KESSELMEIER; STAUDT, 1999).

Em contraste com isoprenos e monoterpenos, a emissão de outros COVs em plantas tem sido pouco investigada. Uma das explicações pode ser o problema de técnicas de amostragem e análise (KESSELMEIER; STAUDT, 1999).

Muitos desses COVs emitidos por plantas ainda não foram testados quanto à sua toxicidade a fitonematoídeos.

2.6 Produção e função de compostos orgânicos voláteis em plantas

Os compostos voláteis de plantas promovem a comunicação e interação com o ambiente circundante (DUDAREVA et al., 2006). Muitos compostos voláteis florais têm atividade antimicrobiana ou contra herbívoros e também podem agir para proteger valiosas partes reprodutivas das plantas, de seus inimigos (DUDAREVA; PICHERSKY; GERSHENZON, 2004). Em alguns casos, COVs induzidos pela ação de agentes podem atuar como uma defesa direta, repelindo (MORAES; MESCHEER; TUMLINSON, 2001) ou intoxicando organismos herbívoros ou fitopatógenos (VANCANNEYT et al., 2001). Algumas funções eco fisiológicas das emissões de hidrocarbonetos têm sido bem estudadas, como a liberação de etileno ocorrendo em frutos maduros ou tecidos lesados (ABELES; MORGAN; SALTVEIT JUNIOR, 1992).

Nos últimos anos, existe uma crescente evidência de que o ataque microbiano pode iniciar mecanismos de defesa, desencadeando a liberação de compostos voláteis. Plântulas de milho, que não liberam terpenoides em

condições normais de crescimento emitem monoterpenos quando sob ataque de certas lagartas, reagindo especificamente à saliva do inseto. Esse sinal de emissão atrai uma vespa que deposita seus ovos na lagarta (KESSELMEIER; STAUDT, 1999). Deste modo, estudos dos efeitos dos COVs produzidos em plantas contra fitopatógenos mostram o potencial dessas substâncias no controle de doenças.

Monoterpenos são conhecidos como compostos de defesa contra patógenos e herbívoros (GERSHENZON; CROTEAU, 1991). Os efeitos de acetaldeído, benzaldeído, cinamaldeído, etanol, álcool benzílico, nerolidol, 2-nonanona, β -ionona e vapores etílicos foram avaliados *in vitro* contra *Rhizopus stolonifer* e outros microrganismos causadores de podridão em frutos por Utama et al., (2002). Os aldeídos foram os inibidores de crescimento mais fortes para os fungos e células bacterianas.

Existem COVs que são liberados pela indução das plantas após estresses bióticos ou abióticos, aumentando substancialmente e temporariamente as emissões totais de carbono. Os COVs induzidos têm a vantagem de serem sintetizados somente quando necessários e, portanto, são mais econômicos em termos de utilização de carbono (HOLOPAINEN, 2004).

Assim, a grande diversidade de COVs presentes nas plantas, garante, de certa forma, a disseminação de informações da planta ao ambiente, como por exemplo, na atração ou repelência a organismos, sendo de grande valor para os estudos das relações entre plantas e microrganismos incluindo os fitonematóides, os quais são dependentes do ambiente circundante da planta, principalmente da rizosfera, e de seus fatores químicos em geral.

2.7 Compostos voláteis produzidos por plantas e tóxicos a nematoides

Vários compostos nematicidas já foram identificados em uma grande variedade de espécies vegetais. Entretanto, os estudos se concentram nas moléculas não voláteis pré-existentes nas plantas. Em outros casos, estudos

mostram o efeito de COVs produzidos durante a incorporação no solo, que são oriundos da decomposição do material vegetal. Os compostos liberados na biofumigação de solos são principalmente aldeídos e isotiocianatos, que possuem atividade biocida e foram relacionados ao controle de fitonematoides (GARCÍA-ÁLVAREZ et al., 2004). Os isotiocianatos têm sido amplamente estudados, nos últimos anos, em plantas da família *Brassicaceae* na biofumigação do solo em várias regiões do mundo (OKA, 2009). Desse modo, é importante reter os COVs na biofumigação, que são produzidos por pelo menos duas semanas, pois seus efeitos muitas vezes são bioestáticos, tornando-se necessário ter um tempo de exposição prolongado dos patógenos aos COVs (GARCÍA-ÁLVAREZ et al., 2004). No entanto, são escassos os estudos sobre COVs produzidos em plantas em relação à determinação dos seus efeitos específicos aos nematoides.

Para se demonstrar o efeito de COVs de plantas tóxicas a nematoides, estudos *in vitro* devem ser realizados em ambientes fechados sob a influência única dos COVs. Carli (2011), utilizaram tubos SUPELCO para avaliar o efeito tóxico de COVs produzidos a partir de extrato aquoso e extrato seco de alho a *M. incognita*. Neste trabalho, observou-se que a eclosão de J₂ foi reduzida por COVs liberados tanto pelo macerado a seco como pelo extrato aquoso, porém, os voláteis foram mais tóxicos no macerado de alho a seco. Este trabalho mostra a importância dos estudos, *in vitro*, de COVs tóxicos a nematoides emitidos por plantas, os quais podem se estender a várias outras espécies vegetais produtoras dessas moléculas.

A grande diversidade de espécies vegetais que produzem moléculas tóxicas a nematoides ou produtoras de COVs como terpenos, alcanos e outros, possibilita novos estudos na área de controle de fitonematoides.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta de material vegetal

Foram coletados diferentes órgãos de cinco espécies de plantas, que têm apresentado efeitos antagônicos a fitonematoídes (DIAS *et al*, 2000) ou encontram-se dentro dos grupos de espécies aromáticas, medicinais ou oleaginosas, para verificação da produção de compostos orgânicos voláteis (COVs) tóxicos a nematoídes. Folhas de citronela (*Cymbopogon nardus*) e pimenta-do-reino (*Piper nigrum*) foram coletadas no Horto de Plantas Medicinais da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Também foram coletadas a inflorescência de brócolis (*Brassica oleracea*) e sementes de girassol (*Helianthus annuus*) nos setores de Olericultura e de Plantas Oleaginosas no Departamento de Agricultura (DAG)–UFLA. As sementes de castanheira do Pará (*Bertholletia excelsa*) foram obtidas no comércio de Lavras - MG.

3.2 Obtenção de ovos e juvenis do segundo estágio (J₂) de *Meloidogyne incognita*

Os juvenis de segundo estágio (J₂) utilizados nos experimentos foram obtidos de populações puras de *Meloidogyne incognita* multiplicadas em plantas de tomateiro mantidas em casa de vegetação do Laboratório de Nematologia - UFLA. A suspensão de ovos de *M. incognita* foi obtida conforme a técnica de Hussey e Barker (1973) modificada por Boneti e Ferraz (1981). Para isso, raízes de tomateiro foram lavadas cuidadosamente em água corrente para retirar partículas de solo aderidas, picadas em pedaços de aproximadamente 1 a 2 cm e trituradas em liquidificador com solução de NaClO 0,5% por, aproximadamente, 20 segundos. A suspensão de ovos e raízes foi vertida em uma peneira de 0,074 mm de abertura (200 “mesh”), acoplada à outra de 0,025 mm (500 “mesh”), ficando os ovos retidos nesta

última. A contagem dos ovos foi realizada em câmara de Peters, e calibrada em microscópio de luz. Os ovos obtidos foram incubados em câmara de eclosão a 28 °C. Os J₂ eclodidos, a partir de 48 horas da montagem da câmara, foram utilizados nos experimentos, excluindo aqueles eclodidos após 24 horas.

3.3 Toxicidade de compostos orgânicos voláteis de cinco espécies de plantas aos juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita*

A presença de compostos orgânicos voláteis (COVs) tóxicos a *M. incognita* emitidos por brócolis, pimenta-do-reino, citronela, girassol e castanha do Pará, foi testada empregando-se a técnica do tubo SUPELCO descrita por Botelho (2010). Para isso, cada órgão da planta colhida foi esterilizado superficialmente, embebendo-o em hipoclorito de sódio a 2,0 % por 1 minuto, seguido de lavagem em água destilada. Após a secagem superficial em câmara de fluxo laminar, o material foi usado na preparação dos extratos. Estudou-se o efeito comparativo do extrato seco e aquoso, de cada planta, testadas em três concentrações de cada extrato. Na preparação do extrato seco, 0,5, 1,0 ou 1,5 g do material colhido esterilizado e secado foi colocado em cadinho de porcelana e macerado manualmente. Já o extrato aquoso de cada órgão da planta foi obtido pesando-se 5,10 ou 15 g do material, também esterilizado superficialmente e secado, colocado em 100 ml de água destilada e esterilizada, tampado e deixado em repouso por 24 horas. Em seguida, o material em repouso foi triturado em liquidificador e a suspensão filtrada em gaze. As testemunhas constaram-se de 2 ml de água destilada, colocada no tubo representando a concentração de 0 g, para os dois extratos.

No tubo SUPELCO foram colocados 20 g de areia lavada e esterilizada e aterrado um microtubo de 1,5 ml, até a sua metade. Entre o microtubo e a parede do tubo SUPELCO foi distribuído o extrato seco ou 2 ml do extrato aquoso ou água (testemunha). O tubo SUPELCO foi, então,

vedado hermeticamente e deixado a 25 °C (\pm 2 °C) por 72 horas em BOD para formação dos COVs. Em seguida, 1 ml da suspensão contendo cerca de 100 J₂ de *M. incognita* foi injetado dentro do microtubo, por meio de uma seringa, pela película de silicone interposta entre a tampa e o frasco. O orifício criado foi vedado com fita adesiva. O frasco SUPELCO com o extrato vegetal, ou água (testemunha), e o microtubo com os J₂ retornaram a BOD e lá permaneceram por 24 ou 48 horas a 25 °C (\pm 2° C). Cada tratamento foi repetido 4 vezes em delineamento inteiramente casualizado. Após a incubação, o tubo SUPELCO foi aberto e retirado o microtubo. A suspensão com 100 J₂ foi transferida para poços nas placas de polipropileno (ELISA). Ao microscópio de objetivas invertidas foram avaliados os J₂ móveis e imóveis.

Foi feita a análise de variância (ANOVA), em esquema fatorial, utilizando-se o programa estatístico Sisvar. As médias de cada tratamento foram agrupadas pelo teste de Scott e Knott (1974) no nível de 5% de significância.

3.4 Mortalidade e infectividade de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidoyne incognita* em tomateiros após exposição a compostos orgânicos voláteis (COVs) de sementes de girassol e inflorescência de brócolis.

Para este experimento foram selecionadas as plantas: brócolis e girassol, devido aos resultados obtidos no experimento anterior. Avaliações de seus COVs tóxicos a *M. incognita* foram feitas em extrato aquoso (5,0, 10,0 e 15,0 g.ml⁻¹) e seco (0,5, 1,0 e 1,5 g) empregando-se a técnica desenvolvida por Botelho (2010) modificada para uso de plantas. Desenvolveu-se a mesma metodologia do ensaio anterior, porém a suspensão colocada no microtubo foi de 600 J₂, diferente daquele ensaio em que se usaram 100 J₂. Como testemunha, usou-se água destilada e esterilizada excluindo o material vegetal. Após 48 horas de exposição aos COVs das

plantas, foi retirado 0,2 ml da suspensão com $600 J_2.ml^{-1}$, e transferido para placa ELISA para se determinar o número de J_2 imóveis e mortos. A mortalidade dos J_2 foi avaliada após 24 horas de repouso em condições normais de ambiente sem os COVs de plantas, considerando os J_2 ainda imóveis como mortos. O restante da suspensão (aproximadamente 500 J_2), contida no microtubo, foi transferida para 4 ml de água destilada e esterilizada e, então, inoculada em tomateiro, com 20 dias após a semeadura, em bandejas com células de 75 cm³ preenchidas com substrato Plantmax®. O inóculo foi colocado ao redor do caule da planta a 1,5 cm de profundidade distribuído em 4 orifícios que foram preenchidos com substrato e, logo após, as mudas foram mantidas em casa de vegetação. Cada tratamento foi repetido 4 vezes e organizados em delineamento inteiramente casualizado. A irrigação das mudas inoculadas foi feita aspergindo-as com pulverizador manual 2 a 3 vezes por dia com sol incidente. Após 25 dias a muda foi retirada da célula de isopor e colocada em copo de 1L com 600 ml de água. Cuidadosamente, o substrato foi retirado das raízes evitando perda de raízes finas. O sistema radicular livre de substrato foi colocado sobre papel toalha. Depois de retirado o excesso de água, o sistema radicular foi pesado, contado o número de galhas e cortado em fragmentos de 0,5 cm. Esses fragmentos foram transferidos para um liquidificador com 200 ml de hipoclorito de sódio a 0,5 % e triturados conforme técnica de Hussey e Barker (1973) modificado por Boneti e Ferraz (1981). Os ovos recolhidos foram contados em microscópio de objetiva invertida.

Foi feita a análise de variância (ANOVA), em esquema fatorial (2 plantas x 2 extratos x 3 concentrações), utilizando-se o programa estatístico Sisvar. As médias de cada tratamento foram agrupadas pelo teste de Scott e Knott (1974) no nível de 5% de significância.

3.5 Efeito do tempo de exposição de juvenis de segundo estágio (J₂) de *Meloidogyne incognita* aos compostos orgânicos voláteis (COVs) produzidos por plantas na mortalidade e infectividade em tomateiro.

Para esse ensaio foram utilizadas, como produtoras de COVs, as sementes de girassol e inflorescência de brócolis.

A avaliação dos COVs tóxicos a *M. incognita*, produzidos por 15 g.100 ml⁻¹ de água em extrato aquoso e por 1,5 g em extrato seco de inflorescência de brócolis e sementes de girassol, foi feita de acordo com a técnica desenvolvida por Botelho (2010) e modificada para uso em plantas.

Após o preparo dos tubos SUPELCO com areia e adição do extrato vegetal como já descrito, os frascos foram vedados, e incubados a 25°C no escuro por 3 dias, para estocagem dos COVs. Em seguida, 1 ml de uma suspensão de 100 J₂ de *M. incognita* foi depositado no interior do microtubo e incubado em B.O.D. a 25 °C (± 2 °C) por 3, 6, 12, 24, 48 ou 72 horas. A testemunha constou da deposição de 2 ml de água na areia e foi preparada para cada tempo de exposição dos J₂. Ao final de cada tempo de exposição dos J₂ aos COVs, os frascos foram abertos e a suspensão de J₂ contida nos microtubos foi transferida para placa ELISA e contado o número de J₂ móveis e imóveis. A mortalidade dos J₂ foi avaliada após 24 horas, considerando os J₂ ainda imóveis como mortos.

Em outro ensaio avaliou-se a infectividade dos J₂, após cada tempo de exposição aos COVs apenas de sementes de girassol, por meio do extrato seco e aquoso, em suas maiores concentrações, empregando-se a mesma metodologia acima descrita, porém usando 600 J₂.ml⁻¹ para o bioteste em tomateiros. Na testemunha utilizou-se água destilada e esterilizada em substituição ao material vegetal. Após a avaliação da mortalidade em alíquota de 0,2 ml, a suspensão remanescente de J₂ (aproximadamente 500 J₂), exposta por 3, 6, 12, 24, 48 ou 72 horas, foi dispersa em 4 ml de água e inoculada em muda de tomateiro com 20 dias de idade, plantada em sementeira com células de 75 cm³ contendo substrato Plantmax®. Após a

inoculação, as mudas foram mantidas em casa de vegetação. O número de galhas e ovos por sistema radicular foi avaliado 30 dias após a inoculação.

Empregou-se, nos dois ensaios, delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial (2 plantas x 2 extratos x 3 concentrações x 6 tempos, para mortalidade; 2 extratos x 3 concentrações x 6 tempos, para infectividade), com 4 repetições.

Foi feita a análise de variância (ANOVA) utilizando-se o programa estatístico Sisvar. As médias de cada tratamento foram agrupadas pelo teste de Scott e Knott (1974) no nível de 5% de significância. Para a curva de exposição dos J_2 nos diferentes tempos usou-se a regressão e os modelos mais apropriados.

3.6 Toxicidade da água exposta aos compostos orgânicos voláteis produzidos por macerados a seco de sementes de girassol e de inflorescência de brócolis aos juvenis de segundo estágio (J_2) de *Meloidogyne incognita*.

Na avaliação da toxicidade da água exposta aos COVs de plantas, foram utilizadas as sementes de girassol, inflorescência de brócolis e o isolado 21 de *Fusarium oxysporum*, que produziu COVs e tornou a água tóxica pela imobilização de 100% dos J_2 de *Meloidogyne incognita* em trabalho anterior desenvolvido por Terra (2012), servindo-se, assim, como testemunha. Também constituíram testemunhas, a água destilada e esterilizada, além dos ingredientes do meio YES (Yeast extract sucrose agar - extrato de levedura 20 g, sacarose 150 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g e ágar 20 g), onde o fungo foi cultivado, em substituição ao extrato da planta. Em um compartimento da placa bipartida (FERNANDO et al., 2005) foi colocada a suposta fonte produtora de COVs, e no lado oposto água destilada e esterilizada. Foram colocados 5 g do macerado a seco de sementes de girassol ou 5 g de macerado a seco de inflorescência de brócolis em um compartimento e no contíguo foi colocado 1 ml de água destilada e

esterilizada. Logo em seguida, a placa foi fechada e vedada com filme plástico e mantida em B.O.D a 25 °C por 3 dias. Na testemunha com o isolado 21 de *F. oxysporum* também se empregou a técnica de placas bipartidas, porém, modificada com perfuração na tampa. Em um compartimento com meio de cultura YES foi colocado o isolado de *F. oxysporum*, transferindo das bordas da sua colônia, cultivado em meio MA (Malte-ágar - malte 20 g e ágar 20 g), um disco de 5 mm de diâmetro e no compartimento contíguo colocou-se água. Cinco dias após o crescimento fúngico, 1 ml de água foi colocado no compartimento contíguo através do furo na tampa, e lá permaneceu exposta aos COVs por 3 dias. A seguir, a água das placas com material vegetal e com o isolado fúngico, exposta aos COVs, foi recolhida e colocada em um microtubo de 2 ml e nele pipetado uma suspensão de 0,5 ml com 100 J₂. Os tubos foram armazenados em BOD a 25 °C (± 2 °C) por 48 horas, quando, então, foram abertos e avaliados o número de J₂ móveis, imóveis e mortos.

O ensaio foi montado em delineamento inteiramente casualizado com 4 repetições.

Foi feita a análise de variância (ANOVA) utilizando-se o programa estatístico Sisvar. As médias de cada tratamento foram agrupadas pelo teste de Scott e Knott (1974) no nível de 5% de significância, com quatro repetições para cada tratamento.

4 RESULTADOS

4.1 Toxicidade de compostos orgânicos voláteis (COVs) de cinco espécies de plantas aos juvenis de segundo estágio (J₂) de *Meloidogyne incognita*.

Os extratos de inflorescência de brócolis, folhas de pimenta-do-reino, folhas de citronela, sementes de girassol e sementes de castanha do Pará emitiram COVs com toxicidade aos J₂ de *M. incognita* tanto em 24 quanto em 48 horas de exposição. A toxicidade avaliada, como imobilidade

dos J₂, foi sempre elevada (> 97%) no extrato seco das espécies estudadas, porém, em extrato aquoso, apenas as sementes de castanha do Pará e de girassol causaram imobilidade significativa em relação às testemunhas (Tabela 1).

Tabela 1: Porcentagem da imobilidade de juvenis do segundo estágio (J₂) de *Meloidogyne incognita* expostos aos compostos orgânicos voláteis de cinco espécies vegetais nos extratos seco, aquoso e testemunhas:

Extrato	Imobilidade dos J ₂				
	Brócolis	Pimenta	Citronela	Girassol	Castanha
Seco	99,50 aA	99,80 aA	97,05 aA	99,77 aA	99,86 aA
Aquoso	14,43 bB	8,47 bC	6,24 bC	99,70 aA	99,80 aA
Testemunha	4,72 cA	3,12 bA	3,12 bA	4,72 bA	4,72 bA

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, letras minúsculas na coluna e letras maiúsculas na linha, pelo teste de Scott e Knott no nível de 5% de probabilidade.

O aumento da quantidade (concentração) do material vegetal, para formar o extrato, não foi significativo para aumentar a toxicidade dos COVs emitidos pelos extratos aquosos de folhas de citronela, folhas de pimenta-do-reino e inflorescência de brócolis. Por outro lado, a alta toxicidade dos COVs emitidos pelo extrato aquoso em 5 g.100ml⁻¹ de água de sementes de girassol e de castanha do Pará, impossibilitaram avaliações diferenciadoras nas concentrações mais elevadas, uma vez que, aproximadamente 100% dos nematoides já se apresentavam imóveis na menor concentração (Figura 1A). Com exceção do extrato seco de folhas de citronela, em que a toxicidade de seus COVs apresentou-se menor ($P \leq 0,05$) na concentração de 0,5 g, em todas as demais concentrações do extrato seco, das espécies estudadas, a imobilização dos J₂ pelos COVs aproximou-se de 100 % (Figura 1B).

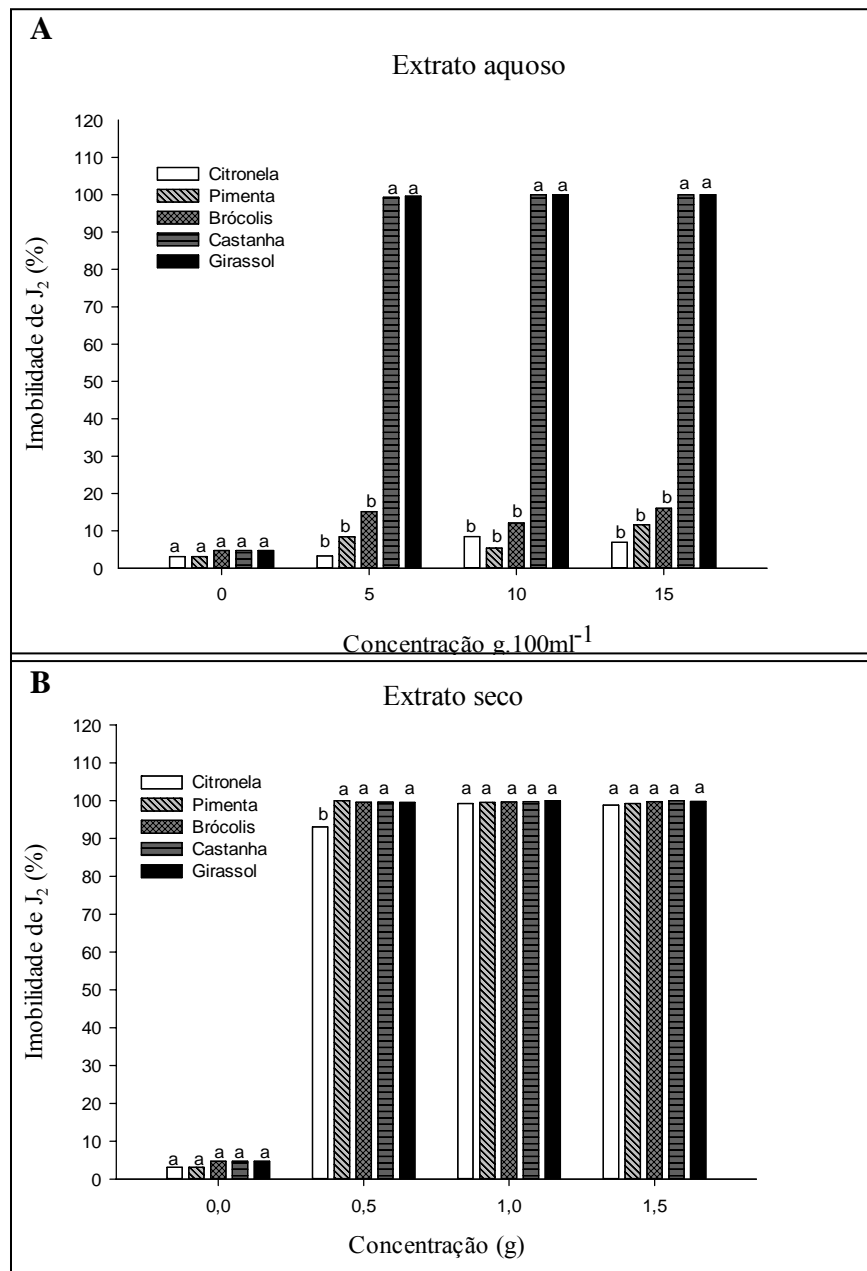


Figura 1: Imobilidade de juvenis do segundo estágio (J_2) de *Meloidogyne incognita*, em 3 concentrações dos extratos de citronela, pimenta-do-reino, brócolis, castanha do Pará e girassol. A: Imobilidade no extrato aquoso. B: Imobilidade no extrato seco. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si no mesmo grupo pelo teste de Scott e Knott no nível de 5% de probabilidade.

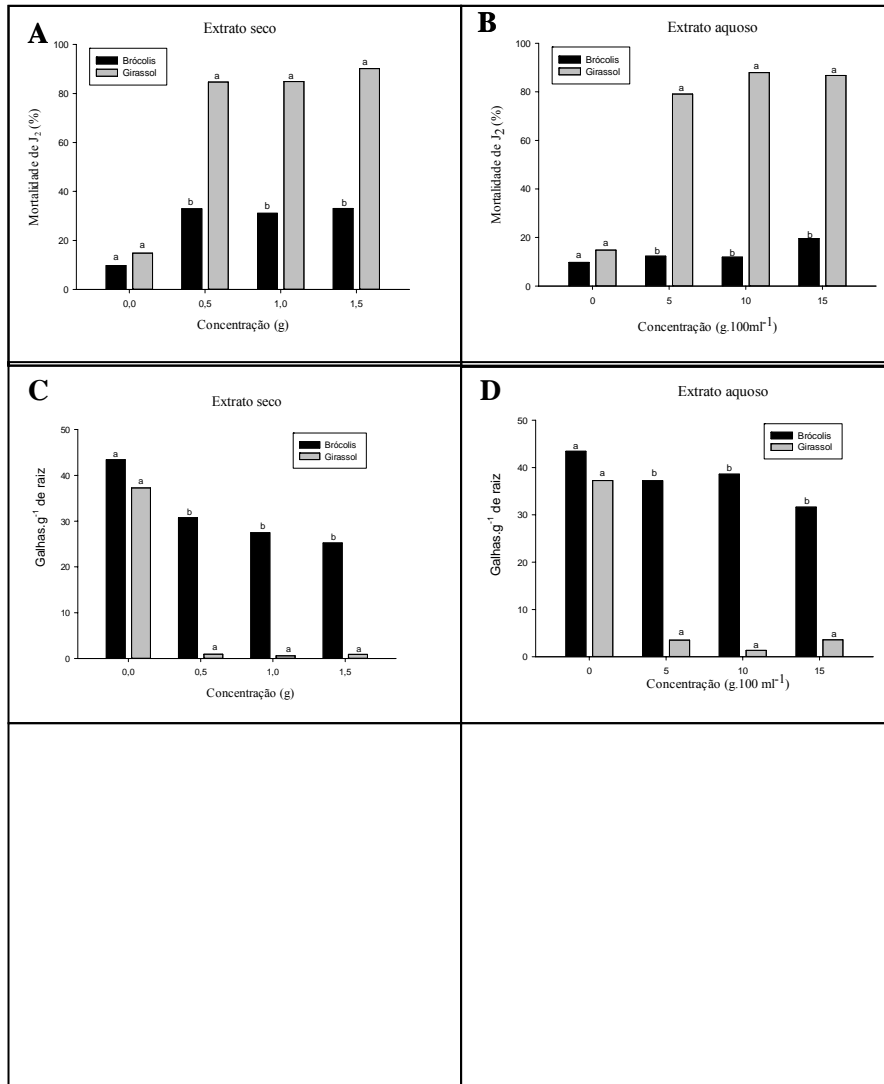
4.2 Mortalidade e infectividade de juvenis do segundo estágio (J₂) de *Meloidogyne incognita* em tomateiros após exposição aos compostos orgânicos voláteis (COVs) de inflorescência de brócolis e sementes de girassol.

Os COVs emitidos pelos extratos (seco e aquoso) de sementes de girassol proporcionaram aumento significativo na mortalidade dos J₂ de *M. incognita*, a eles expostos, comparando àqueles emitidos pelos extratos da inflorescência de brócolis. Como consequência dessa alta mortalidade, ocorreu também redução significativa no número de galhas e de ovos por grama de raiz, quando os J₂ expostos aos COVs, emitidos pelas sementes de girassol, foram inoculados em tomateiro, comparados àqueles emitidos pela inflorescência de brócolis. Entretanto, a mortalidade dos J₂ expostos aos COVs emitidos pelo extrato de brócolis foi maior ($p \leq 0,05$), quando se empregou o extrato seco, porém esse aumento não ocorreu com o extrato de sementes de girassol. O número de galhas e de ovos por grama de raiz de tomateiros, inoculados com J₂ expostos aos COVs do extrato seco de inflorescência de brócolis, foi significativamente menor do que àqueles em tomateiros inoculados com J₂ expostos aos COVs do extrato aquoso. Entretanto, não diferiram entre si nos tomateiros inoculados com J₂ expostos aos COVs dos extratos seco e aquoso de sementes de girassol. Ao analisar as concentrações dos extratos seco e aquoso, o aumento da quantidade de material vegetal de sementes de girassol ou de inflorescência de brócolis (concentração), tanto no extrato seco quanto no aquoso, não alterou a porcentagem de mortalidade dos J₂ expostos aos COVs por eles emitidos, como também não alterou o número de galhas e de ovos por grama de raiz em tomateiros inoculados com esses J₂ (infectividade), semelhantemente ao ocorrido no teste em que se avaliou a imobilidade dos J₂ (Tabela 2 e Figura 2)

Tabela 2: Mortalidade de juvenis de segundo estágio (J₂) de *Meloidogyne incognita* expostos a compostos orgânicos voláteis de inflorescência de brócolis e sementes de girassol e infectividade desses J₂ em tomateiro:

Extratos	Mortalidade (%)		Galhas.g ⁻¹ de raiz		Ovos.g ⁻¹ de raiz	
	Brócolis	Girassol	Brócolis	Girassol	Brócolis	Girassol
Seco	32,36 aB	86,57 aA	27,82 aB	2,82 aA	97,58 aB	18,69 aA
Aquoso	14,60 bB	84,58 aA	35,81 bB	0,81 aA	205,33 bB	35,64 aA
Testemunha	9,75 bA	14,84 bA	43,42 bB	37,24 bA	561,86 cA	561,86 bA

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, letras minúsculas na coluna e letras maiúsculas na linha, pelo teste de Scott e Knott no nível de 5% de probabilidade.



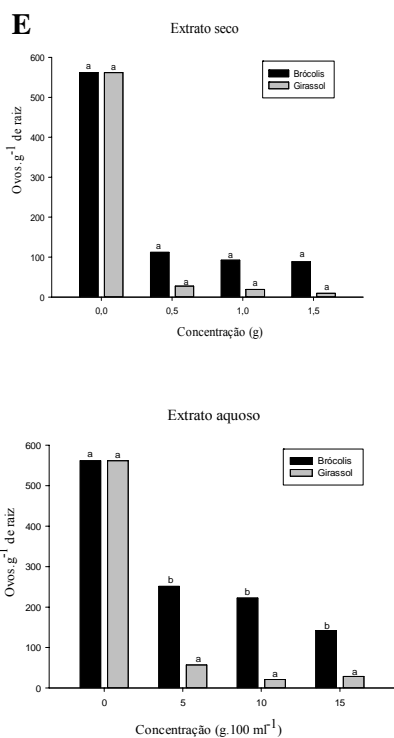


Figura 2: Mortalidade de juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne incognita* (A: extrato seco; B: extrato aquoso); número de galhas (C: extrato seco; D: extrato aquoso); número de ovos (E: extrato seco; F: extrato aquoso). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si no mesmo grupo pelo teste de Scott e Knott no nível de 5% de probabilidade.

4.3 Efeito do tempo de exposição de juvenis de segundo estágio (J₂) de *Meloidogyne incognita* aos compostos orgânicos voláteis (COVs) produzidos por plantas na mortalidade e infectividade em tomateiros.

Este ensaio confirmou os resultados obtidos no ensaio anterior, em que os COVs emitidos pelo extrato de semente de girassol apresentaram maior toxicidade aos J₂ de *M. incognita* do que àqueles emitidos pela inflorescência de brócolis, tanto no extrato seco como no aquoso, e que no extrato seco os COVs emitidos pela inflorescência de brócolis causaram maior mortalidade ($P \leq 0,05$) de J₂ comparados aos do extrato aquoso (Tabela 3).

Tabela 3: Mortalidade dos juvenis do segundo estágio expostos aos compostos orgânicos voláteis de inflorescência de brócolis e de sementes de girassol em extrato seco (1,5 g) e aquoso (15 g.100 ml⁻¹).

Tratamentos	Mortalidade (%)	
	Brócolis	Girassol
Testemunha (água)	6,36 bB	11,50 bB
Aquoso	6,29 bB	51,37 aA
Seco	16,61 aB	50,66 aA

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, letras minúsculas na coluna e letras maiúsculas linha, pelo teste de Scott e Knott no nível de 5% de probabilidade.

Os tempos de exposição dos J₂ aos COVs refletiram a velocidade da ação tóxica desses voláteis (Figura 3). Por exemplo, os COVs emitidos por sementes de girassol tanto no extrato seco quanto no aquoso, causaram aumentos logarítmicos com o aumento do tempo de exposição dos J₂ a esses COVs, chegando a 93% de mortalidade com 48 horas de exposição. Nesse período de exposição dos J₂ (48 horas) aos COVs emitidos pela inflorescência de brócolis a mortalidade foi de 26%. Contudo, a mortalidade dos J₂ expostos aos COVs de sementes de girassol chegou a 98% com 72 horas de exposição, enquanto os COVs emitidos pela inflorescência de brócolis, em extrato seco e aquoso, chegou aos 43% e 15% de mortalidade dos J₂ expostos a eles, respectivamente.

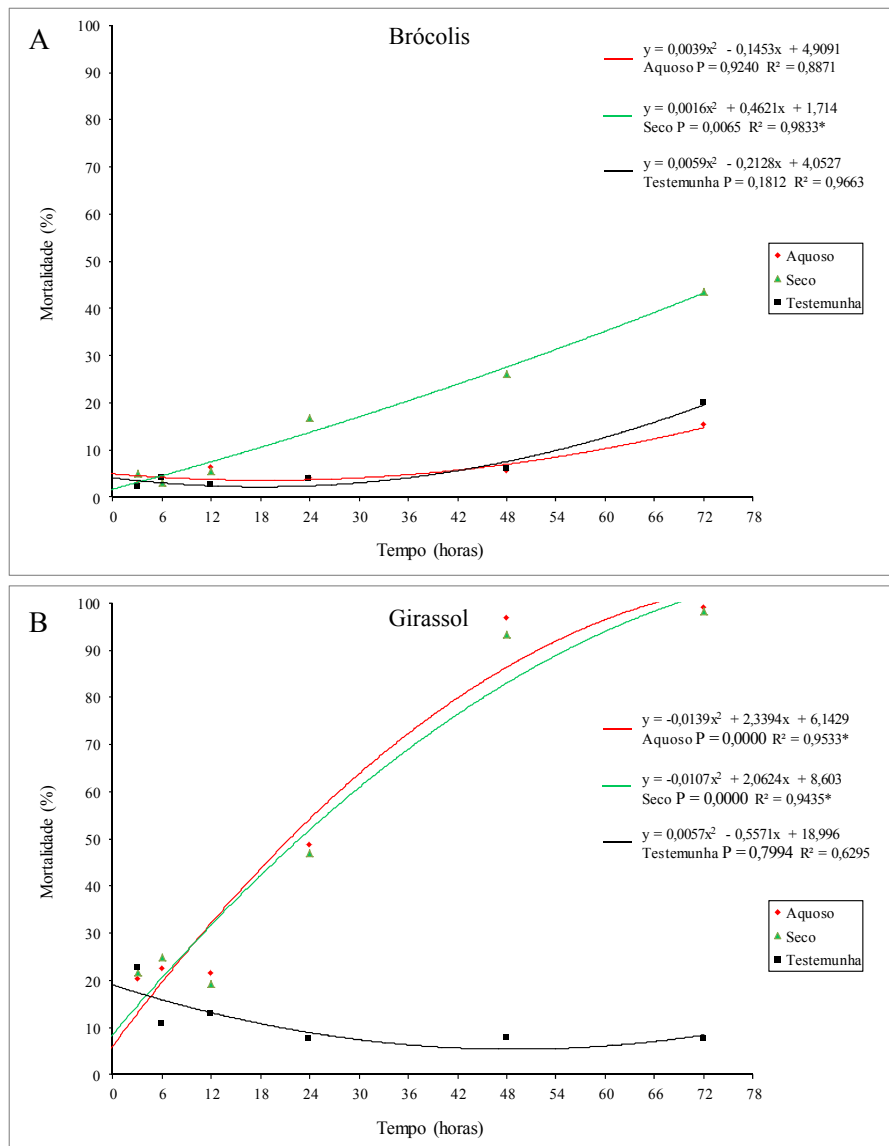


Figura 3: Regressão do tempo de exposição de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne incognita* aos compostos orgânicos voláteis produzidos por inflorescência de brócolis (A) e sementes de girassol (B) em extrato aquoso, seco e na testemunha. * Significativo a 5%.

A infectividade, expressa em número de galhas, e a reprodução, em ovos, ambos por grama de raiz de tomateiro, resultados da inoculação tanto dos J₂ expostos aos COVs emitidos pelos extratos de sementes de girassol, como aqueles sem exposição aos COVs (testemunha), decresceram com o

tempo, porém mais rapidamente ($P \leq 0,05$), quando os J_2 foram expostos aos COVs dos extratos aquoso e seco de sementes de girassol, comparados à testemunha (Figura 4).

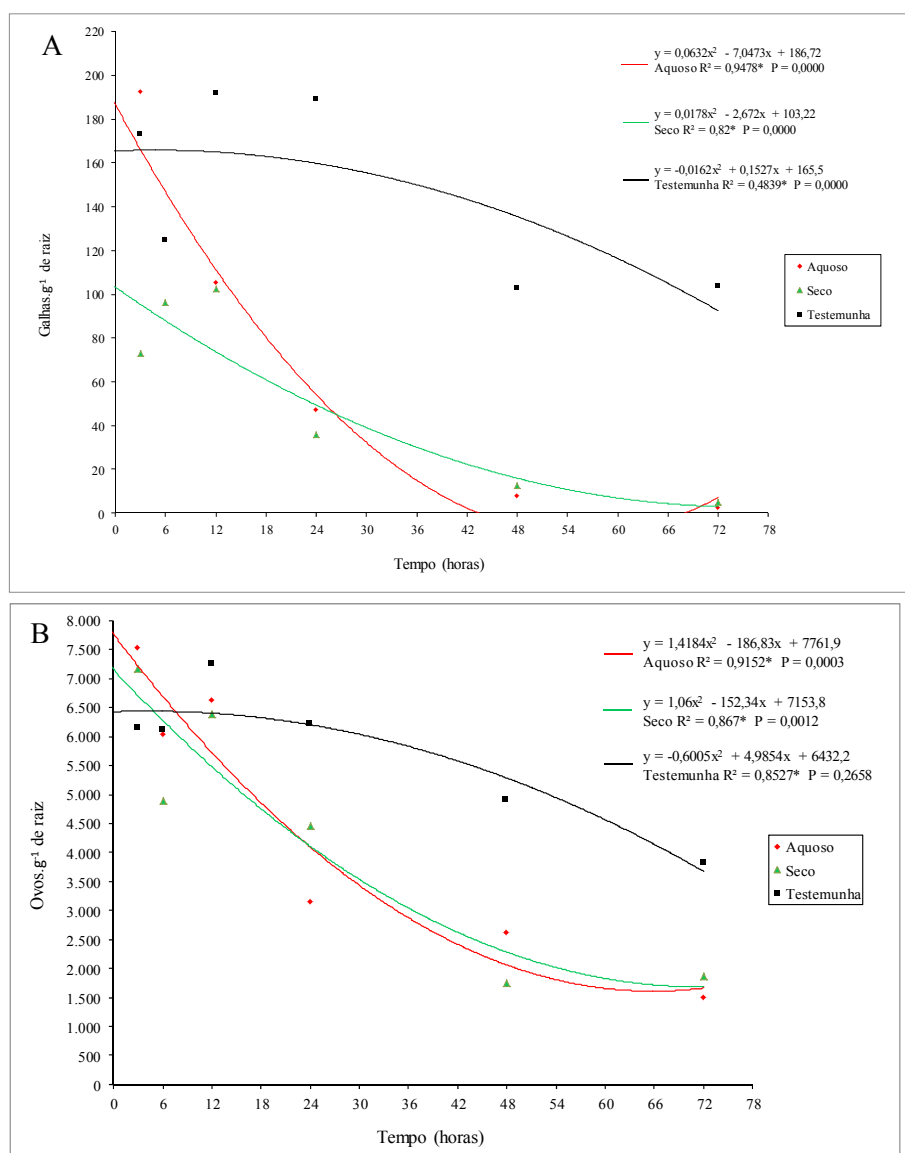


Figura 4: Regressão do tempo de exposição dos juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne incognita* aos compostos orgânicos voláteis, do extrato aquoso e seco de sementes de girassol, afetando infectividade em raízes de tomateiro. A) Número de galhas.g⁻¹ de raiz ; B) Número de ovos.g⁻¹ de raiz. *Significativo a 5%.

4.4 Toxicidade da água exposta aos compostos orgânicos voláteis produzidos por macerados a seco de sementes de girassol e de inflorescência de brócolis aos juvenis de segundo estágio (J₂) de *Meloidogyne incognita*.

A água, quando exposta aos COVs produzidos pela inflorescência de brócolis e pelo isolado 21 de *Fusarium oxysporum*, tornou-se tóxica aos J₂ de *M. incognita* causando 97% de imobilidade (Figura 5). Por outro lado, a água exposta aos COVs de sementes de girassol causou baixa imobilidade, sendo igual ($P \leq 0,05$) às testemunhas com água e com meio de cultura. A mortalidade dos J₂ expostos aos COVs emitidos por ambas as plantas e pelo isolado do fungo foi baixa e semelhante às testemunhas.

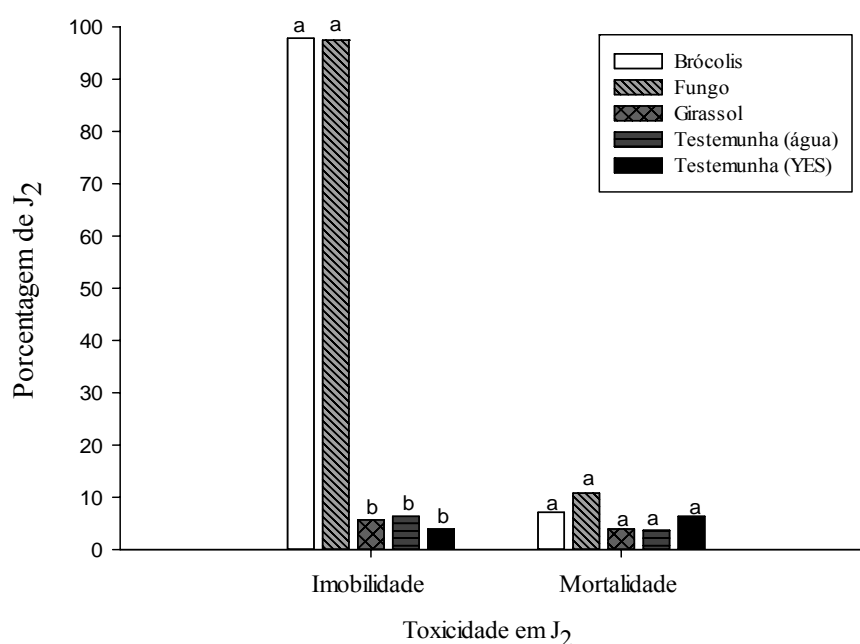


Figura 5: Imobilidade e mortalidade dos juvenis do segundo estágio (J₂) de *Meloidogyne incognita* expostos aos compostos orgânicos voláteis de extrato seco de inflorescência de brócolis e sementes de girassol e de isolado 21 de *Fusarium oxysporum*. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si no mesmo grupo pelo teste de Scott e Knott no nível de 5% de probabilidade.

5 DISCUSSÃO

5.1 Toxicidade de compostos orgânicos voláteis de órgãos de plantas a juvenis do segundo estágio (J₂) de *Meloidogyne incognita*

Apesar da emissão de COVs por espécies vegetais ter sido estudada por muitos pesquisadores (DUDAREVA et al., 2006; GERSHENZON; CROTEAU, 1990; JANSEN et al., 2011; KESSELMEIER; STAUDT, 1999; LORETO et al., 1996; VANCANNEYT et al., 2001), seus efeitos tóxicos a fitonematoides têm sido pouco pesquisados. Os trabalhos do efeito de COVs emitidos por plantas têm se concentrado em artrópodes (ARAB; BENTO, 2006), fungos e bactérias (JANSEN et al. 2011). COVs de plantas afetam o crescimento de fungos. Charon e Sams (1999), avaliando várias espécies de brássicas quanto ao efeito *in vitro* de seus COVs em fungos de solo, mostraram que folhas de brócolis e das outras espécies estudadas produziram COVs (alil-isotiocianato) que inibiram o crescimento de *Pythium ultimum* e *Rhizoctonia solani*. Óleos essenciais de pimenta-do-reino, mesmo em baixa concentração, emitem COVs com efeitos tóxicos diretos e repelentes ao besouro castanho do trigo (*Tribolium castaneum*), em baixa concentração do óleo (UPADHYAY; JAISWAL, 2007). Guynot et al (2003) avaliou o efeito tóxico de COVs emitidos por óleos essenciais de várias espécies vegetais, inclusive de *Cyndopogon sp.* em fungos de armazenamento do gênero *Eurotium*, *Aspergillus* e *Penicillium* e demonstrou que os COVs de 5 óleos essenciais, incluindo o de *Cyndopogon*, inibiram o crescimento de todas as espécies fúngicas.

Como a toxicidade a J₂ de *M. incognita* foi elevada nos tempos de exposição de 24 e 48 horas, em todas as plantas aqui estudadas, principalmente no extrato seco, a sensibilidade desses J₂ aos COVs inicia-se com poucas horas de exposição, requerendo, assim, avaliação da imobilidade em tempos inferiores a 24 horas.

A maior toxicidade observada pelos COVs emitidos pelo extrato seco de todas as plantas aqui estudadas, quando comparado ao aquoso, é corroborada pelo trabalho de Carli (2011), cujos autores demonstraram que os COVs emitidos pelo extrato seco de bulbos de alho apresentaram maior toxicidade aos J₂ de *M. incognita* do que os do extrato aquoso. Por outro lado, as sementes de girassol e de castanha do Pará, emitiram COVs que causaram alta imobilidade independente do extrato usado. Portanto, além da presença da molécula volátil tóxica ao nematoide, a sua capacidade de solubilizar-se no meio aquoso cria novo aspecto de sua eficácia no antagonismo a nematoides no campo. Além disso, a adição de água pode mudar alguma característica química dos COVs, ou dissolve-las por solvatação por meio de surfactantes naturais. COVs emitidos por plantas já foram encontrados dissolvidos em gotas de chuva (JANSEN et al., 2011).

Embora os COVs emitidos pelas sementes de girassol e de castanha do Pará não tenham sido estudadas quanto a ação a outros microrganismos, sabe-se que as folhas de girassol apresentam atividades antimicrobianas contra fitopatógenos (SANKARANARAYANA et al., 2008) e que nas sementes de girassol ocorrem fenóis e terpenos, os quais apresentam funções importantes de defesa contra insetos, herbívoros e fungos, além, de limitar o crescimento de outras plantas no solo (KUPIDLOWSKA et al., 2006), podendo ser utilizadas em rotação de culturas ou incorporação no solo, visando a diminuição da população do nematoide na área. Também se sabe que os constituintes das frações voláteis das sementes de girassol são em sua maioria monoterpenos, como o limoneno, que já foi demonstrado como uma importante molécula na atração de insetos (ROSELAND et al 1992). Contudo, os COVs de plantas não foram estudados nesses trabalhos quanto ao efeito em fitonematoides.

As plantas com atividade pesticida, como brócolis, têm sido usadas em biofumigação, pois apresentam atividade contra plantas daninhas, bactérias, fungos e nematoides e são preferidas para o controle de patógenos (MATTHIESSEN; KIRKEGAARD, 2006). No entanto, outras plantas, que

ainda não foram caracterizadas como tóxicas a nematoides, demonstraram, neste trabalho, que emitem COVs, com ação tóxica a eles e podem exercer esse modo de ação na natureza. Maior número de espécies vegetais deve ser estudado quanto a presença de COVs tóxicos a fitonematoides em várias famílias botânicas, além da constituição química do órgão. Embora a biofumigação com o uso de plantas tenha sido amplamente estudada no controle de fitopatógenos, os estudos demonstrando apenas a eficácia dos COVs são escassos. Avanços têm sido alcançados na última década com COVs emitidos por microorganismos (CAMPOS; PINHO; FREIRE, 2010). Freire et al (2012), através de cromatografia gasosa, constataram entre COVs tóxicos a J₂ de *M. incognita*, emitidos pelo isolado 21 de *Fusarium oxysporum*, a presença de cariofileno, o 4-metil-2,6-di-teritbutilfenol, o 1-(1,1-dimetiletil)-2-metil-1,3-propanedil-2-etil-propanoato e o acoradieno, além de outros COVs em menor quantidade. COVs tóxicos a fungos também já foram caracterizados em espécies vegetais. Por exemplo, os aldeídos (acetaldeído, benzaldeído e cinamaldeído) obtidos de espécies vegetais, apresentaram efeitos altamente tóxicos no crescimento de fungos e de bactérias causadoras de doenças de pós-colheita (UTAMA et al, 2002).

A técnica desenvolvida por Botelho (2010) modificada para o teste de COVs de plantas mostrou-se eficiente na avaliação de COVs emitidos pelos órgãos vegetais e tóxicos a nematoides podendo trazer estímulo a novas pesquisas com esse grupo de fitopatógenos.

5.2 Mortalidade e infectividade de juvenis do segundo estágio (J₂) de *Meloidogyne incognita* em tomateiros após exposição a compostos orgânicos voláteis de plantas

A maior toxicidade dos COVs dos extratos de semente de girassol na mortalidade de J₂ e na sua infectividade em tomateiro, comparada a inflorescência de brócolis, indica diferença tóxica entre as plantas. Esses

dados estão de acordo com aqueles obtidos por Smolinska e Horbowicz (1999), que avaliando a toxicidade de COVs emitidos por nove espécies crucíferas a propágulos de *Fusarium oxysporum*, *Sclerotium cepivorum* e *Sclerotinia sclerotiorum*, verificaram que os COVs emitidos pela *Brassica juncea*, apresentaram maior atividade tóxica aos fungos em relação às outras espécies.

Por outro lado, a mortalidade causada pela exposição dos J₂ aos COVs da inflorescência de brócolis, mesmo sendo maior no extrato seco, foi em geral baixa, mostrando que os efeitos tóxicos dos COVs dessa planta estão mais relacionados à imobilidade dos J₂. Desta forma, esse efeito se soma aos dos glucosinolatos como produtos da degradação das brássicas na biofumigação contra *M. incognita* (ROUBTSOVA et al., 2007).

A inalteração na porcentagem de mortalidade e na infectividade no tomateiro (número de galhas e de ovos), com o aumento na concentração dos extratos em que os J₂ foram expostos aos COVs de sementes de girassol e de inflorescência de brócolis, sugere a importância da molécula envolvida na toxicidade ao nematoide, bem como a existência de um nível de sensibilidade dos J₂ a esses COVs. Nos testes aqui realizados, somente as moléculas voláteis foram testadas quanto à toxicidade a *M. incognita*. Por exemplo, muitos óleos obtidos pela técnica de arraste não são voláteis. A toxicidade desses óleos a nematoides ainda tem sido pouco estudada. A volatilidade ocorre nos óleos, principalmente, de plantas aromáticas com toxicidade a fitonematoides. Meyer *et al.* (2008) mostraram que o óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) libera voláteis com atividade supressiva na eclosão e na viabilidade dos J₂ de *Meloidogyne incognita*, que aumenta com a concentração do óleo (0,2, 0,5 e 5,0% de óleo).

No caso de sementes de girassol, os COVs responsáveis pela mortalidade e redução da infectividade podem estar entre os constituintes de seus óleos, que podem representar até 49% do peso seco da semente (SANGOI; KRUSE, 1993).

5.3 Curva de tempo de exposição de *Meloidogyne incognita* aos compostos orgânicos voláteis (COVs) produzidos por plantas em relação à mortalidade e infectividade dos juvenis de segundo estágio (J₂) em plantas de tomateiro.

O tempo de exposição dos J₂ aos COVs indica a sensibilidade do nematoide à molécula volátil, que pode levar a morte ou imobilizar o J₂. Nos ensaios aqui realizados, com sementes de girassol, a mortalidade do J₂ foi alcançada mesmo com baixa exposição (3 e 6 horas) sem passar pela imobilização, correlacionando com a queda na infectividade do J₂ nas raízes de tomateiro. Reduções na mobilidade dos J₂ de *M. incognita* ocorreram a partir de 24, 72 e 168 horas, de exposição aos COVs emitidos pelo fungo *Muscodor albus*, com valores de 31%, 74% e 100%, respectivamente (GRIMME et al, 2007). A mortalidade de J₂ de *M. incognita* aumentou com o tempo de exposição aos COVs emitidos pelo fungo *Fusarium oxysporum*, isolado 21, e correlacionou com a queda na infectividade em tomateiro (FREIRE et al, 2012).

Como as diferentes fontes de COVs causam imobilidade ou mortalidade em nematoides, as moléculas, além de serem diferentes, exercem modos diferentes de ação no corpo do nematoide. Mas se a imobilização vai levar a perda na infectividade do fitonematoide na planta, ainda precisa ser mais bem pesquisado.

Observou-se, também, que aumentando o tempo de exposição, os nematóides tornaram-se mais sensíveis aos efeitos dos COVs emitidos pelas plantas. Por outro lado, o aumento do tempo de exposição pode levar a degradação dos COVs por reações entre as moléculas, tornando-os atóxicos aos nematóides. Já foi demonstrado que moléculas presentes na atmosfera degradam COVs emitidos por planta. Por exemplo aumento do nível de O₃

degradou os COVs emitidos por plantas em resposta ao ataque de fitoparasitas, em experimentos em laboratório (JANSEN et al., 2011).

A redução na infectividade dos J₂ mantidos em água a 25 °C por 48 e 72 horas, sem exposição aos COVs de sementes de girassol (testemunha), pode ser explicada pela perda na energia corporal (lipídios) e, por conseguinte, na infectividade, embora o nematoide se mantenha móvel (FREIRE et al, 2007). Fato semelhante poderia ter ocorrido com os J₂ expostos aos COVs, isto é, os COVs poderiam causar redução na energia corporal sem causar mortalidade. Entretanto, neste trabalho os COVs emitidos por sementes de girassol, causaram mortalidade e em decorrência disto reduziram a infectividade dos J₂.

5.4 Toxicidade da água exposta aos compostos orgânicos voláteis produzidos por macerados a seco de sementes de girassol e de inflorescência de brócolis aos juvenis de segundo estágio (J₂) de *Meloidogyne incognita*.

A toxicidade causada aos J₂ de *M. incognita* pela água exposta aos COVs emitidos pela inflorescência de brócolis e do isolado 21 de *F. oxysporum* demonstra que essas moléculas foram dissolvidas no meio aquoso onde estavam os nematoides. Condição semelhante pode ocorrer na água do solo próxima onde o material vegetal for incorporado ou o fungo estiver crescendo. Os COVs emitidos por *Muscodor albus* também tornaram tóxica a água em que os J₂ de *M. incognita* foram colocados, após estocagem por cinco dias no compartimento contíguo a cultura do fungo em meio batata dextrose ágar (BDA) (GRIMME et al., 2007). Também a água estocada por três dias em compartimento contíguo à cultura de isolados de *F. oxysporum*, em meio YES, tornou-se tóxica a J₂ de *M. incognita* (TERRA, 2012).

A toxicidade dos COVs diluídos em água pode explicar o efeito tóxico à distância dos COVs aos fitonematoides postulado por Wheatley (2002), em que a água obstrutora dos poros do solo formaria uma solução

com os COVs em movimento pelos poros vazios. Os nematoides presentes nesta água, em solução com os COVs dissolvidos por solvatação, seriam imobilizados ou mortos pelo efeito tóxico desses compostos. Deve-se, ainda, ressaltar que as moléculas caracterizadas como pouco solúveis em água podem ter efeito tóxico aos nematoides, devido ao nível limiar tóxico ser muito baixo para fitopatógenos, definidos em partes por milhão.

A baixa toxicidade da água exposta aos COVs emitidos pelas sementes de girassol aos J₂, talvez demonstre que esses COVs têm baixa afinidade com a água, ficando dissolvidos por pouco tempo e logo retornando ao ar. Por esse motivo, talvez, os COVs emitidos pelo extrato aquoso de sementes de girassol, em experimentos já realizados, foram mais tóxicos do que os COVs emitidos pelo extrato aquoso de outras plantas aqui testadas.

6 CONCLUSÕES

As cinco plantas avaliadas emitem COVs tóxicos aos J₂ de *Meloidgyne incognita*.

O aumento do tempo de exposição de *M. incognita* aos COVs de sementes de girassol aumenta sua toxicidade aos J₂, com tempo mínimo de 24 horas para causar efeito tóxico significativo.

O aumento das concentrações de extrato de planta não elevou a porcentagem de toxicidade aos J₂.

O extrato preparado a seco, geralmente, proporcionou maior toxicidade aos J₂ de *M. incognita*.

A água exposta aos COVs emitidos pelo extrato seco de inflorescência de brócolis tornou-se tóxica aos J₂ de *M. incognita*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABELES, F. B.; MORGAN, P. W.; SALTVEIT JUNIOR, M. E. **Ethylene in plant biology**. New York; Boston: Academic, 1992. 302 p.

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

ALMEIDA, M. A. O. de et al. Efeitos dos extratos aquosos de folhas de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf (Capim-santo) e de *Digitaria insularis* (L.) Fedde (Capim-açu) sobre cultivos de larvas de nematóides gastrintestinais de caprinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 12, n. 3, p. 125-129, jul. 2003.

ARAB, A.; BENTO, J. M. S. Plant volatiles: new perspectives for research in Brazil. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 35, n. 2, p. 151-158, Mar. 2006.

BIOGENIC EMISSION IN THE MEDITERRANEAN AREA. **BEMA-project, report on the 3rd BEMA measuring campaign at Burriana**. Brussels, 1997. 140 p.

BOECKX, P.; CLEEMPUT, O. van; VERMOESEN, A. Emission of gaseous hydrocarbons and NH₃ out of soils. In: _____. **Biosphere-atmosphere exchange of pollutants and trace substances**. Berlin: Springer-Verlag, 1997. p. 405-412.

BONETI, J. I. S.; FERRAZ, S. Modificação do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de raízes de caféiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 6, n. 3, p. 553-555, mar. 1981.

BOTELHO, A. O. **Fatores envolvidos na supressividade de *Meloidogyne exigua* em caféiro**: nova técnica para análise de compostos voláteis tóxicos a fitonematoide. 2010. 98 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

CAMPOS, V. P. Controle de doenças: doenças causadas por nematoides. In: VALE, F. X. R.; ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Controle de doenças de plantas**. Viçosa, MG: UFV, 1997. v. 1, p. 141-179.

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

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

CHARRON, C. S.; SAMS, C. E. Inhibition of *Pythium ultimum* and *Rhizoctonia solani* by shredded leaves of Brassica species. **Journal of American Society for Horticultural Science**, Mount Vernon, v. 124, n. 5, p. 462-467, Sept. 1999.

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

COSTA, M. J. N. et al. Toxicidade de extratos vegetais e de esterco a *Meloidogyne incognita*. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 27, n. 2, p. 245-250, jul. 2001.

DE MORAES, CM et al. Caterpillar-induced nocturnal plant volatiles repel nonspecific females. **Nature**. v. 410 n. 29, p. 577-580, Mar. 2001.

DIAS, C. R. et al. Efeito de extratos aquosos de plantas medicinais na sobrevivência de juvenis de *Meloidogyne incognita*. **Nematologia Brasileira**, Campinas, v. 24, n. 2, p. 203-210, out. 2000.

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

DUDAREVA, N.; PICHERSKY, E.; GERSHENZON, J. Biochemistry of plant volatile. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 135, n. 4, p. 1893-1902, Aug. 2004.

FASSULIOTIS, G. AND SKUCAS, G.P. The effect of pyrrolizidine alkaloid ester and plants containing pyrrolizidine on *Meloidogyne incognita*. **Journal of Nematology**. v. 1, p. 287-288, 1969.

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.

FREIRE, E. S. et al. Infectividade de juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne incognita* em tomateiro após privação alimentar em solo e água em diferentes condições. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 33, n. 3, p. 270-274, July 2007.

_____. Volatile substances on the antagonism between fungi, bacteria and *Meloidogyne incognita* and potentially fungi for nematode control. **Journal of Nematology**, Hanover, 2012. In press.

GAMLIEL, A.; STAPLETON, J.J. Characterization of antifungal volatile compounds evolved from solarized soil amended with cabbage residues. **Phytopathology** v. 83 n. 9, p. 899-905, Sep, 1993.

GARCÍA-ÁLVAREZ, A. et al. Materia orgánica, biofumigación y manejo de organismos del suelo patógenos de vegetales. In: _____. **Conocimientos, técnicas y productos para la agricultura y la ganadería ecológica**. Madrid: Ministerio da Agricultura, Pesca y Alimentación, 2004. p. 71-76.

GERSHENZON, J.; CROTEAU, R. Regulation of monoterpene biosynthesis in higher plants. **Recent Advances in Phytochemistry**, New York, v. 24, n. 1, p. 99-160, 1990.

GRAEDEL, T. E.; WESCHLER, C. J. Chemistry within aqueous atmospheric aerosols and raindrops, **Reviews of Geophysics and Space Physics**. v.19 (4), p. 505-539. Jun. 1981.

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**, Quebec, v. 91, n. 2, p. 220-225, Feb. 2007.

GUYNOT, M. E. et al. Antifungal activity of volatile compounds generated by essential oils against fungi commonly causing deterioration of bakery products. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 94, n. 5, p. 893-899, May 2003.

HAHN, J.; STEINBRECHER, R.; STAHL, K. Study of the emission of low molecular weight organic compounds of various plants. **Eurotrac Annual Report**, München, n. 4, p. 230-235, 1992.

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

- HENDERSON, D. R.; E. RIGA, R. A.; RAMIREZ, J.; WILSON, AND W. E. SNYDER. Mustard biofumigation disrupts biological control by *Steinernema spp.* nematodes in the soil. **Biological Control** 48 (3):316-322. Mar. 2009.
- HOLOPAINEN, J. K. Multiple functions of inducible plant volatiles. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 9, n. 11, p. 529-533, Nov. 2004.
- HUANG, Y. et al. Characterisation of volatiles produced from *Bacillus megaterium* YFM3.25 and their nematocidal activity against *Meloidogyne incognita*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 126, n. 3, p. 417-422, Mar. 2010.
- HUSSEY, R. S.; BARKER, K. R. A comparison of methods for collecting inocula of *Meloidogyne spp.* including a new technique. **Plant Disease Reporter**, Washington, v. 57, p. 1025-1028, 1973.
- ISODOROV, V. AND JDANOVA, M. Volatile organic compounds from leaves litter. *Chemosphere*, Davis, v.48 n. 9, p.975-979, Sep. 2002.
- JANSEN, R. M. C. et al. Detection of diseased plants by analysis of volatile organic compound emission. **The Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 49, p. 157-174, 2011.
- KAI, M. et al. Bacterial volatiles and their action potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 81, n. 6, p. 1001-1012, Jan. 2009.
- KEENE, W. C. AND GALLOWAY, J. N. Considerations concerning sources for formic and acetic acids in the troposphere. **Journal of Geophysical Research**.v. 91, n. 13, p. 14466–14474, Sep. 1986.
- KERRY, B. R. An assessment of progress toward microbial control of plant-parasitic nematodes. **Journal of Nematology**, Lakeland, v. 22, n. 4, p. 621-631, Oct. 1990.
- KESSELMEIER, J.; BODE, K.; GERLACH, C.; JORK, E.M. Exchange of atmospheric formic and acetic acid with trees and crop plants under controlled chamber and purified air conditions, **Atmospheric Environment**.v. 32, n. 10, p. 1765–1775, May. 1998.
- KESSELMEIER, J.; STAUDT, M. Biogenic volatile organic compounds (VOC): an overview on emission, physiology and ecology. **Journal of Atmospheric Chemistry**, Dordrecht, v. 33, n. 1, p. 23-88, May 1999.
- KNUDSEN, J. T.; GERSHENZON, J. The chemistry diversity of floral scent. In: DUDAREVA, N.; PICHERSKY, E. (Ed.). **Biology of floral scent**. London: Taylor & Francis, 2006. p. 27-52.

KUPIDLOWSKA, E. et al. Impact of sunflower (*Helianthus annuus* L.) extracts upon reserve mobilization and energy metabolism in germinating mustard (*Sinapis alba* L.) seeds. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 32, n. 12, p. 2569-2583, Dec. 2006.

LOPES, E. A. et al. Potencial de isolados de fungos nematófagos no controle de *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, Campinas, v. 31, n. 2, p. 20-26, maio 2007.

LORETO, F. et al. Influence of environmental factors and air composition on the emission of α -pinene from *Quercus ilex* leaves. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 110, n. 1, p. 267-275, Jan. 1996.

MAHMOODI; SIDDIQUI, ZA. Effect of phenolics on the growth of tomato and reproduction of *Rotylenchulus reniformis*. **Nematologia Mediterranea** v. 21, n. 1, p. 97-98, June. 1993.

MATSUDA, K. et al. Nematicidal activity of matrine and its derivatives against pine wood nematodes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 29, n. 1, p. 189-91, Jan. 1991.

MATTHIESSEN, J. N.; KIRKEGAARD, J. A. Biofumigation and enhanced biodegradation: opportunity and challenge in soilborne pest and disease management. **Critical Review in Plant Science**, Boca Raton, v. 25, n. 3, p. 235-265, May 2006.

MCGARVEY, D. J.; CROTEAU, R. Terpenoid metabolism. **The Plant Cell**, Rockville, v. 7, n. 7, p. 1015-1026, July 1995.

MEYER, S. L. F. et al. Dose-response effects of clove oil from *Syzygium aromaticum* on the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. **Pest Management Science**, Sussex, v. 64, n. 3, p. 223-229, Mar. 2008.

NEVES, W. S. et al. Atividade nematicida de extratos botânicos de pimenta malagueta (*Capsicum frutescens*), mostarda (*Brassica campestris*) e alho (*Allium sativum*) sobre o nematóide das galhas, *Meloidogyne javanica*, em casa de vegetação. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 35, n. 4, p. 255-261, Oct. 2009.

_____. Biofumigação do solo com espécies de brássicas para o controle de *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**. 31, n. 3, p.195-201. Oct. 2007.

NOGUEIRA, M.A. et al. Nematicidal constituents in *Mucuna aterrima* and its activity on *Meloidogyne incognita* race 3. **Nematologia Mediterranea** v. 24 n. 2, p. 249-252. Dec. 1996.

NONDEK, L.; RODLER, D. R.; BIRKS, J. W. Measurement of sub-ppbv concentrations of aldehydes in a forest atmosphere using a new HPLC technique, **Environmental Science & Technology**, v. 26 n. 6, p. 1174–1178. Jun. 1992.

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

_____. Nematicidal activity of essential oils and their components against the root-knot nematode. **Phytopathology**, v. 90 n. 7, p. 710 – 715, Jul. 2000.

PARUSEL, E. **Zur bedeutung der pflanzen als quelle leichte nicht-methan-kohlenwasserstoffe für die atmosphere:** entwicklung einer feldmeßmethode und untersuchungen an nutzpflanzen und gehölzen, sonderheft. Braunschweig-Völkenrode: Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft, 1996. 167 p.

PIEDRA BUENA, A. et al. Use of pepper crop residues for the control of root knot nematodes. **Bioresource Technology**, Essex, v. 98, n. 15, p. 2846-2851, Nov. 2007.

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

RITZINGER, C. H. S. P.; MCSORLEY, R. Effect of castor and velvet bean organic amendments on *Meloidogyne arenaria* in greenhouse experiments. **Journal of Nematology**, College Park, v. 30, n. 4, p. 624-631, Dec. 1998.

ROCHA, F.S.; CAMPOS, V.P. Efeito de exsudatos de cultura de células de plantas em juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne incognita*. **Fitopatologia Brasileira** v.29 n. 3, p. 294-299, May. 2004.

ROSELAND, C. R. et al. Discrimination of sunflower volatiles by the red sunflower seed weevil. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 62, n. 2, p. 99-106, Feb. 1992.

ROUBTSOVA, T. et al. Effect of broccoli (*Brassica oleracea*) tissue, incorporated at different depths in a soil column, on *Meloidogyne incognita*. **Journal of Nematology**, College Park, v. 39, n. 2, p. 111-117, June 2007.

SALGADO, S.M.L.; CAMPOS, V.P. Ecloração e mortalidade de *Meloidogyne exigua* em extratos e em produtos naturais. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28 n. 2, p. 166-170, Mar. 2003.

SANGOI, L.; KRUSE, N. D. Comportamento de cultivares de girassol em diferentes épocas de semeadura no planalto catarinense. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 1, p. 81-91, jan. 1993.

SANHUEZA, E.; ANDREAE, M. O. Emission of formic and acetic acids from tropical savanna soils. **Geophysical Research Letters**. v. 18 n. 9, p.1707–1710, Sep 1991.

SANKARANARAYANA, S. et al. Isolation and characterization of bioactive and antibacterial compound from *Helianthus annuus* linn. **Indian Journal of Experimental Biology**, New Delhi, v. 46, n. 12, p. 831-835, Dec. 2008.

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

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, Washington, v. 30, n. 2, p. 507-512, Sept. 1974.

SMOLINSKA, U.; HORBOWICZ, M. Fungicidal activity of volatiles from selected cruciferous plants against resting propagules of soil-borne fungal pathogens. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 147, n. 2, p. 119-124, Feb. 1999.

SUN, Y. et al. Elevated CO₂ changes the interactions between nematode and tomato genotypes differing in the JA pathway. **Plant Cell Environment**. v.3 n. 5, p. 729–39. May 2010.

TERRA, W. C. **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***. 2012. 41 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

TIHOHOD, D. **Nematologia agrícola aplicada**. Jaboticabal: FUNEP, 1993. 372 p.

TINGEY, D. T et al. Isoprene emissions and photosynthesis in three ferns – the influence of light and temperature. **Physiologia plantarum**, v. 69 n. 4, p. 609–616, Apr. 1987.

UPADHYAY, R. K.; JAISWAL, G. Evaluation of biological activities of Piper nigrum oil against *Tribolium castaneum*. **Bulletin of Insectology**, Bologna, v. 60, n. 1, p. 57-61, June 2007.

UTAMA, I. M. S. et al. In vitro efficacy of plant volatiles for inhibiting the growth of fruit and vegetable decay microorganisms. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 50, n. 22, p. 6371-6377, Oct. 2002.

VANCANNEYT, G. et al. Hydroperoxide lyase depletion in transgenic potato plants leads to an increase in aphid performance. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Washington, v. 98, n. 14, p. 8139-8144, July 2001.

WANG, K.H. et al. Suppression of *Rotylenchulus reniformis* by *Crotalaria juncea*, *Brassica napus*, and *Tagetes erecta*. **Nematropica**. v. 31 n. 2, 237–251, Dec 2001.

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, Aug. 2002.