

RESEARCH/INVESTIGACIÓN

TEMPO DE EXPOSIÇÃO DE JUVENIS DE SEGUNDO ESTÁDIO A VOLÁTEIS EMITIDOS POR MACERADOS DE NIM E DE MOSTARDA E BIOFUMIGAÇÃO CONTRA *MELOIDOGYNE INCOGNITA*

Aline Ferreira Barros, Vicente Paulo Campos*, Júlio Carlos Pereira da Silva, Liliana Estupiñan López, Arinaldo Pereira da Silva, Edson Ampélio Pozza, e Luma Alaís Pedroso

Departamento de Fitopatologia – Universidade Federal de Lavras, Caixa Postal 3037, CEP 37200-000, Lavras - MG, Brasil. *Autor para correspondência: vpcampos@dfp.ufla.br

ABSTRACT

Barros, A. F., V. P. Campos, J. C. P. Silva, L. E. López, A. P. Silva, E. A. Pozza, and L. A. Pedroso. 2014. Exposure time of second stage juveniles to volatiles emitted by neem and mustard macerates and biofumigation against *Meloidogyne incognita*. *Nematropica* 44:190-199.

Although volatiles emitted by diverse sources have demonstrated toxicity to some plant pathogens, only a few studies have evaluated the effect of volatiles emitted by plants on plant-parasitic nematodes. The effects of varying exposure times of second stage juveniles of *Meloidogyne incognita* to volatile organic compounds (VOC) from neem and mustard were evaluated. In addition, the direct effect of macerates of these plants incorporated into a substrate infested with eggs of *M. incognita* (biofumigation), and the effects of the VOC released into the air and held at the substrate surface by plastic cover on juveniles were studied. Macerates of neem and mustard emitted VOC that caused significant juvenile immobility at initial exposure, and significant mortality was observed after 24-hr exposure to the volatiles. The number of root galls and eggs on tomato inoculated with *M. incognita* second-stage juveniles that had been exposed to volatile compounds decreased with increasing exposure time. These findings confirmed the nematicidal effect of the VOC tested relative to the immobilization and mortality seen in second-stage juveniles after 24-hr exposure. Biofumigation with neem and mustard macerates incorporated into a substrate infested with nematode resulted in a linear reduction of galls when macerate amounts were increased, being lower than in control only at the highest macerate amount (9.6 g). However, the number of eggs was significantly reduced in macerates above or equal to 2.4 g. Juveniles exposed to volatile compounds emitted by neem or mustard macerates incorporated into the substrate and retained in a chamber formed on the substrate surface by sealing with plastic exhibited significant immobility and mortality even at the lower macerate amount, whereas this effect was not seen in the absence of the plastic sealing.

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

RESUMO

Barros, A. F., V. P. Campos, J. C. P. Silva, L. E. López, A. P. Silva, A. Pozza, e L. A. Pedroso. 2014. Tempo de exposição de juvenis de segundo estágio a voláteis emitidos por macerados de nim e de mostarda e biofumigação contra *Meloidogyne incognita*. *Nematropica* 44:190-199.

Embora voláteis emitidos por diversas fontes tenham demonstrado toxicidade a patógenos de plantas, poucos são os estudos sobre os efeitos de voláteis emitidos por plantas a fitonematoides. Por isso, objetivou-se neste trabalho estudar: tempos de exposição dos juvenis de segundo estágio (J_2) de *M. incognita* (MI) a compostos orgânicos voláteis (COVs) de nim e mostarda, o efeito direto desses macerados incorporados ao substrato infestados com ovos de MI (biofumigação), e dos COVs liberados ao ar e retidos na superfície do substrato por cobertura plástica em J_2 . Macerados de nim e mostarda emitiram COVs que causaram imobilidade significativa de J_2 já nos primeiros períodos de exposição. Mortalidade significativa foi observada a partir de 24 horas de exposição aos COVs. Os números de galhas e ovos de MI resultantes da inoculação em tomateiros dos J_2 expostos aos COVs diminuíram com o aumento do tempo de exposição. Assim, confirmaram como efeito nematicida as avaliações anteriores de imobilidade e mortalidade a partir de 24 horas de exposição dos J_2 . A biofumigação, em ambiente vedado com plástico, com macerado de nim ou mostarda incorporado ao substrato

infestado com ovos de MI resultou na redução linear de galhas com o aumento da quantidade dos macerados, sendo esta menor que a testemunha (quantidade zero) apenas na maior quantidade (9,6g). Contudo o número de ovos já foi significativamente reduzido em comparação à testemunha em quantidades dos macerados acima ou igual a 2,4 g. Os J_2 expostos aos COVs emitidos pelos macerados de nim ou mostarda incorporados ao substrato e retidos na câmara formada na superfície pela cobertura plástica causaram imobilidade e mortalidade significativa já na menor quantidade. Esses voláteis seriam perdidos na ausência de cobertura plástica. A mistura ao substrato do macerado de nim ou mostarda triturada e os COVs emitidos para o ar têm efeitos nematicidas a MI bem como as exposições dos J_2 a eles a partir de 24 horas.

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

INTRODUÇÃO

Meloidogyne incognita (kofoid & White), Chitwood, 1949 tem ampla gama de hospedeiros, possivelmente, sendo o patógeno de plantas que mais causa perdas na produção de alimentos no mundo (Trudgill & Block, 2001). São mais de 2000 espécies de plantas atacadas por esse patógeno, destacando-se o tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) (Sasser, 1980), com perdas variando de 28,7 a 85,0% (Chitwood, 1951; Lordello, 1981; Ferraz & Churata-Masca, 1983).

Os fitonematoides podem ser controlados no campo com o emprego de diversas táticas destacando-se os nematicidas comerciais (Sikora *et al.*, 2005). Entretanto, a pressão da sociedade tem levado à eliminação de várias moléculas por causarem danos ao meio ambiente e à saúde humana. Assim já foram proibidas as comercializações do brometo de metila e do aldicarbe (Anvisa, 2012; Anvisa, 2013). A busca por moléculas substitutivas pode levar no futuro ao desenvolvimento de nematicidas a base de compostos voláteis, os quais não deixam resíduos nos alimentos. Estudos com compostos orgânicos voláteis (COVs) tem mostrado efeito nematicida. Por exemplo, voláteis emitidos por culturas fúngicas e bacterianas causam, principalmente, imobilidade e mortalidade de juvenis de segundo estágio (J_2) com poucos dados sobre a infectividade e reprodução dos J_2 expostos aos voláteis e inoculados em plantas suscetíveis (Gu *et al.*, 2007; Campos *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2010; Freire *et al.*, 2012). Entretanto, COVs emitidos por plantas com efeitos tóxicos a fitonematoides têm sido pouco estudados, apesar da biofumigação, técnica usada no campo para controle de fitonematoides, ter seus efeitos biocontroladores atribuídos à produção de voláteis biotóxicos (Ojaghian *et al.*, 2012). Porém, outros fatores tais como moléculas não voláteis liberadas pela degradação dos tecidos incorporados ao solo e voláteis emitidos pela microbiota colonizadora desses tecidos se misturam aos COVs liberados pelos tecidos da planta causando efeitos aditivos ou sinérgicos ainda não avaliados. Por exemplo, sabe-se que os COVs emitidos por tecido colonizado por micro-organismos chegam a 11 vezes àquele emitido

por tecido esterilizado (Gray *et al.*, 2010).

Assim, para o entendimento da eficácia de voláteis no controle de fitopatógenos é importante separar os efeitos dos COVs emitidos pela microbiota que se alimenta na massa verde incorporada ao solo daqueles emitidos pela massa verde sem a infestação microbiana, o que facilita o entendimento do processo envolvido no método de biofumigação. Com relação aos fitonematoides, estudos neste sentido podem ser realizados à semelhança daqueles com COVs emitidos por fungos e bactérias (Campos *et al.*, 2010; Freire *et al.*, 2012). Segundo Lord *et al.* (2011) o entendimento dos mecanismos envolvidos na biofumigação ajuda a melhorar a eficiência desse método de controle. Além disso, é importante também conhecer a interação de diversos fatores que afetam a biofumigação no campo (Morra & Kirkegaard, 2002; Matthiessen *et al.*, 2004).

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

A planta incorporada ao solo é parte principal do processo de biofumigação e portanto é relevante o estudo dos voláteis emitidos por ela, principalmente em testes com tecidos triturados, para assim ajudar na explicação da eficácia desse processo no campo. Folhas de nim e brássicas podem ser utilizadas no processo de biofumigação para o controle de fitopatógenos do solo (Barros *et al.*, 2014; Kagai *et al.*, 2012; Lord *et al.*, 2011; Neves *et al.*, 2007). As espécies de brássicas produzem compostos sulfurosos, como os glucosinolatos, os quais são hidrolisados pela enzima mirosinase quando seus tecidos são danificados, produzindo o composto volátil denominado isotiocianato (Bones & Rossiter, 2006). Os isotiocianatos possuem ação nematicida

e fungicida (Lazzeri *et al.*, 1993; Zasada & Ferris, 2003; Ojaghian *et al.*, 2012). Porém precisam ser retidos no solo para aumentar a eficácia no controle de fitonematoides. O nim também emite COVs de suas folhas intactas os quais têm sido caracterizados como álcoois, aldeídos, cetonas, hidrocarbonetos, além de compostos variados incluindo os terpenos, estireno, além dos compostos contendo enxofre e 2,5-di-hidro-furano (Zeringue & Bhatnagar, 1994). Alguns desses compostos reduziram o crescimento radial de *Aspergillus parasiticus* e consequentemente a produção de aflatoxina (Zeringue & Bhatnagar, 1994). Álcoois e ésteres foram encontrados em folhas maceradas de nim (Barros *et al.*, 2014). Todavia, a toxicidade dessas moléculas voláteis emitidas pelo nim não foi avaliada contra fitonematoides. Por outro lado, molécula não volátil como a tetranortriterpenóide azadiractina que também é produzida pelo nim reduz a população de nematoide (Lynn *et al.*, 2010).

Ainda não foi estudada a curva de progresso da imobilidade e mortalidade de J_2 expostos a diferentes períodos de tempo aos COVs de folhas de nim e mostarda, bem como os efeitos da exposição dos J_2 a esses COVs na infectividade e reprodução em tomateiro. Também não se conhece o efeito isolado dos COVs, principalmente os compostos liberados ao ar após a incorporação dos tecidos vegetais, aos J_2 de *M. incognita*, por meio da biofumigação do substrato.

Desta forma, objetivou-se neste trabalho avaliar, *in vitro*, os efeitos nematocidas e nematostáticos dos COVs emitidos por nim e mostarda em J_2 de *M. incognita*, bem como os efeitos dessas moléculas na infectividade e reprodução dos J_2 em tomateiros após a exposição aos COVs. Também foi estudado o efeito da biofumigação utilizando diferentes quantidades do macerado fresco de folhas de nim e mostarda em ovos de *M. incognita* misturados ao substratos em ambiente hermético.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta de ovos e juvenis do segundo estágio de Meloidogyne incognita

Populações puras de *Meloidogyne incognita* foram multiplicadas em tomateiros e mantidas em casa de vegetação por aproximadamente três meses. A seguir, as raízes com galhas foram separadas do solo, lavadas em água parada e cortadas em pedaços de 0,5 cm de comprimento. Delas foram extraídos ovos pelo processo descrito por Hussey & Barker (1973). Os ovos obtidos foram colocados em câmara de eclosão e os juvenis de segundo estágio (J_2) eclodidos a partir do segundo dia da montagem da câmara foram utilizados nos ensaios de toxicidade dos compostos orgânicos

voláteis (COVs) emitidos por nim e mostarda.

Plantas estudadas e preparo dos macerados

Folhas de mostarda crespa (*Brassica juncea*) e nim (*Azadirachta indica*) foram coletadas, aproximadamente, às oito horas da manhã no município de Lavras- MG, Brasil. Na obtenção do macerado fresco, amostras de 1,5 g de folhas das plantas foram desinfestadas superficialmente com hipoclorito de sódio 2% por 1 minuto, seguido de três lavagens em água destilada. Após secagem do excesso de água em papel toalha, o material vegetal foi colocado em almofariz e macerado com pistilo sem adição de água. Esse material triturado foi utilizado imediatamente no teste de emissão de COVs tóxicos a J_2 de *M. incognita*.

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

Para este ensaio foram utilizados frascos de 80 x 28 mm (SUPELCO™SPME, Sigma-Aldrich, Bellefonte, PA, USA) com tampa rosqueada, revestida internamente por uma película em silicone ligando a tampa ao frasco, garantindo vedação. No interior dos frascos esterilizados, em estufa a 130°C por 48 horas, foram colocados 25 g de areia seca autoclavada (120°C por 20 min) e na superfície da areia foram depositados 2 mL de água destilada seguido de 1,5 g do macerado vegetal de nim ou mostarda em cada frasco. Frascos sem resíduos vegetais foram usados como controle. Em todos os frascos, um microtubo de 1,5 mL, sem tampa, esterilizado em autoclave a 120°C por 20 min, foi introduzido até a altura mediana na areia ali contida. Então, todos eles foram vedados, e mantidos em BOD a 25°C no escuro por três dias. A seguir, 1mL de uma suspensão de 600 J_2 de *M. incognita* foi injetada com uma seringa de 3 mL de volume interno dentro do microtubo inserido na areia do frasco (Figura 1). Novamente, foram mantidos nas mesmas condições anteriores por 3; 6; 12; 24; 48 e 72 horas. Ao final de cada período de exposição, os frascos foram abertos e 200 μ L da suspensão de J_2 contida nos microtubos foram transferidos para uma placa de polipropileno utilizada em testes sorológicos (“ELISA”) e quantificado a percentagem de J_2 móveis e imóveis em microscópio de objetiva invertida (Nikon TMS-F No. 211213). A mortalidade dos J_2 foi avaliada após 24 horas, durante esse período as placas contendo os J_2 foram mantidas em BOD a 25°C. O restante da suspensão de J_2 (aproximadamente 480 J_2)foi disperso em 4 mL de água e inoculada em plântula de tomateiro com 30 dias de idade, produzida em bandeja de isopor contendo substrato organomineral - Multiplant®, Terra



Figura 1. Material usado na avaliação da toxicidade de voláteis emitidos por plantas a juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne incognita* em frasco Supelco™SPME. A tampa rosqueada expõe, no topo, a película de silicone. No frasco contém areia, macerado vegetal na sua superfície e um microtubo nela aterrado até a metade. Seta indica o eppendorf colocado no seu interior, que receberá, por injeção, a suspensão de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne incognita*.

do Paraíso, Holambra, SP, Brasil). Após a inoculação, as plântulas foram mantidas em casa de vegetação. O número de galhas e ovos por sistema radicular foi avaliado 30 dias após a inoculação.

Biofumigação de substrato misturado com ovos de M. incognita e toxicidade em J₂ dos voláteis liberados ao ar a partir de diferentes quantidades do macerado fresco de nim e mostarda em casa de vegetação

Para este experimento, copos plásticos de 300 mL foram preenchidos com 120 g de substrato organomineral. Em seguida, macerados frescos de nim e mostarda, obtidos conforme descrito anteriormente, foram incorporados no substrato nas quantidades de 0; 1,2; 2,4; 4,8; 9,6 g, o que corresponde a uma porcentagem de 0; 1; 2; 4; 8%. A quantidade de zero grama corresponde à testemunha. Uma suspensão contendo 3000 ovos de *M. incognita* em 2,5 mL de

água foi colocada em saco plástico juntamente com o substrato e o macerado de nim ou mostarda e misturados sob agitação para homogeneização. Esses ovos foram submetidos aos efeitos de moléculas voláteis e não voláteis. Em seguida, colocou-se a mistura nos copos plásticos, ajustando a umidade para 60% da capacidade de campo (cc). Para estudar isoladamente o efeito dos COVs sem interferência das moléculas não voláteis foi colocado um tubo eppendorf de 1,5 ml de capacidade aterrado até sua metade na mistura (substrato + macerado vegetal + ovos). O copo com a mistura foi envolvido completamente na parte superior com parafilme®, fechando-o hermeticamente, formando a câmara de gases liberados pelo macerado fresco misturado ao substrato. Uma fita adesiva de 2 x 2 cm foi colocada na superfície interna do filme vedante parafilme oposta ao tubo eppendorf, a fim de permitir maior resistência à perfuração pela seringa e evitar o aumento do diâmetro do furo. Após três dias de vedação, com uma seringa contendo agulha perfurante, injetou-se 1 mL de suspensão contendo 100 J₂ de *M. incognita* no interior do tubo eppendorf. O furo no parafilme® provocado pela perfuração com a seringa foi vedado com fita adesiva. Como controle, foi utilizado substrato sem adição do macerado vegetal com a umidade ajustada também para 60% da c.c. Após 48 horas de exposição dos J₂ aos COVs, o parafilme® foi retirado e a suspensão de J₂ do tubo eppendorf de cada repetição foi transferida para placa ELISA onde foi avaliada a percentagem de J₂ móveis e imóveis em microscópio de objetiva invertida. Em seguida as células das placas ELISA tiveram seu volume completado com água destilada e após 24 horas avaliou-se a mortalidade dos J₂, durante esse período as placas contendo os J₂ foram mantidas em BOD a 25°C. Após a retirada do parafilme®, uma plântula de tomateiro contendo quatro pares de folhas foi transplantada para o copo contendo os ovos de *M. incognita*. Aos 45 dias avaliou-se o número de galhas e de ovos por sistema radicular.

Estatística e análise dos dados

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

de substrato e dos voláteis liberados ao ar por nim e mostarda) foi utilizado sistema fatorial com 2 macerados vegetais (nim e mostarda) x 5 quantidades, com o total de 10 tratamentos. Os resultados foram previamente submetidos a testes de normalidade (Shapiro- Wilk) e homogeneidade de variância dos erros (Bartlett). No caso dos dados não atenderem aos pressupostos de normalidade e homogeneidade, estes foram submetidos à transformação. No ensaio de curva de tempo de exposição dos J_2 aos voláteis fez-se a transformação dos dados relativos à imobilidade e mortalidade dos J_2 de *M. incognita* a $\log(x + 0,5)$ e, os dados relativos ao número de ovos foram transformados para \sqrt{x} . Uma vez atendidos a estes pressupostos, aplicou-se o teste F, por meio da análise de variância. Quando o teste F foi significativo ($P < 0,05$), as médias referentes aos tipos de resíduos vegetais foram comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Por sua vez, o efeito do tempo de exposição e as quantidades dos macerados foi avaliado por meio de modelos de regressão lineares e não lineares.

RESULTADOS

Imobilidade e mortalidade de juvenis de segundo estágio de M. incognita após exposição aos COVs de nim e mostarda por vários períodos de tempo, seguida de infecção e reprodução em tomateiros

Houve interação significativa entre os macerados das espécies vegetais (nim, mostarda e testemunha) e tempo de exposição de J_2 de *M. incognita* em relação à imobilidade ($P < 0,001$) e a mortalidade ($P < 0,001$) do nematoide. A imobilidade aumentou de forma exponencial com o tempo de exposição dos J_2 aos COVs dos macerados de nim e mostarda (Figura 2A). A imobilidade dos J_2 expostos aos COVs do macerado de nim atingiu 100% já em 12 horas, enquanto no macerado de mostarda só alcançou o mesmo valor em 72 horas. Os COVs liberados por macerado de nim aumentaram a imobilidade dos J_2 em todos os períodos de tempo de exposição quando comparados com a testemunha. Já os COVs emitidos por macerado de mostarda causaram imobilidade significativa a partir de 6 horas de exposição. O macerado de nim emitiu COVs que causaram maior imobilidade dos J_2 em relação aos de mostarda apenas nos primeiros tempos de exposição aos voláteis (3 e 6 horas), não havendo diferença nos demais tempos de exposição testados (Figura 2A).

A mortalidade dos J_2 aumentou de forma exponencial na presença do macerado de mostarda, diferindo da testemunha a partir de 24 horas de exposição, com taxa de mortalidade entre 91 a 100% (Figura 2B). Na presença de macerado de nim a mortalidade aumentou linearmente com o aumento do

tempo de exposição, diferindo da testemunha, também, a partir de 24 horas (31 a 97%). Houve diferença entre os macerados de nim e mostarda apenas com 24 horas de exposição (Figura 2B).

Houve interação significativa entre os macerados das espécies vegetais (nim, mostarda e testemunha) e tempo de exposição de J_2 de *M. incognita* em relação à infectividade (número de galhas [NG]) ($P < 0,001$) e a reprodução (número de ovos [NO]) ($P < 0,001$) dos J_2 de *M. incognita* após exposição aos COVs de nim e mostarda. Tanto o NG quanto o NO diminuíram com o aumento do tempo de exposição dos J_2 aos COVs dos macerados. O NG foi reduzido em relação à testemunha, a partir de 24 e 48 horas para o macerado de mostarda e nim, respectivamente, sendo que o macerado de mostarda causou uma redução entre 41 a 96% e o macerado de nim entre 43 e 70%. Os COVs emitidos pela mostarda reduziram de forma mais eficiente o NG quando comparado aos COVs de nim nos tempos de 24 e 48 horas, não havendo diferença em 72 horas de exposição dos J_2 . Já o NO foi reduzido a partir de 48 horas de exposição em relação à testemunha, atingindo uma redução entre 63 a 92% e de forma semelhante pelos macerados de nim e mostarda (Figuras 3A e B).

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

Não houve interação entre as doses e a origem dos macerados vegetais quanto ao número de galhas ou de ovos, com efeito apenas das doses dos macerados. Para o número de galhas, apenas a maior quantidade (9,6 g) diferiu da testemunha, obtendo-se uma redução de 68,5% do número de galhas comparado à testemunha, ou seja, quantidade zero (Figura 4A). Já para o número de ovos, as quantidades iguais ou acima a 2,4 g diferiram da testemunha, porém as doses de 4,8 g e 9,6 g, causaram maior redução (69 e 82,5%) no número de ovos (Figura 4B).

Para a variável imobilidade dos J_2 de *M. incognita* expostos aos COVs emitidos pelos macerados de nim e mostarda misturados ao substrato e retidos na sua superfície pela cobertura plástica, a interação entre os macerados das espécies vegetais e quantidades dos macerados não foi significativa ($P = 0,056$). Porém, a variável quantidade foi significativa ($P < 0,001$). Todas as quantidades testadas diferiram da testemunha (quantidade igual a zero). No entanto, a porcentagem de imobilidade (98 – 100%) foi ainda maior quando foram utilizadas quantidades iguais ou acima a 2,4 g (Figura 5A). Entretanto, a interação entre espécies vegetais testadas e quantidades dos macerados foi significativa quando avaliou-se a mortalidade dos J_2

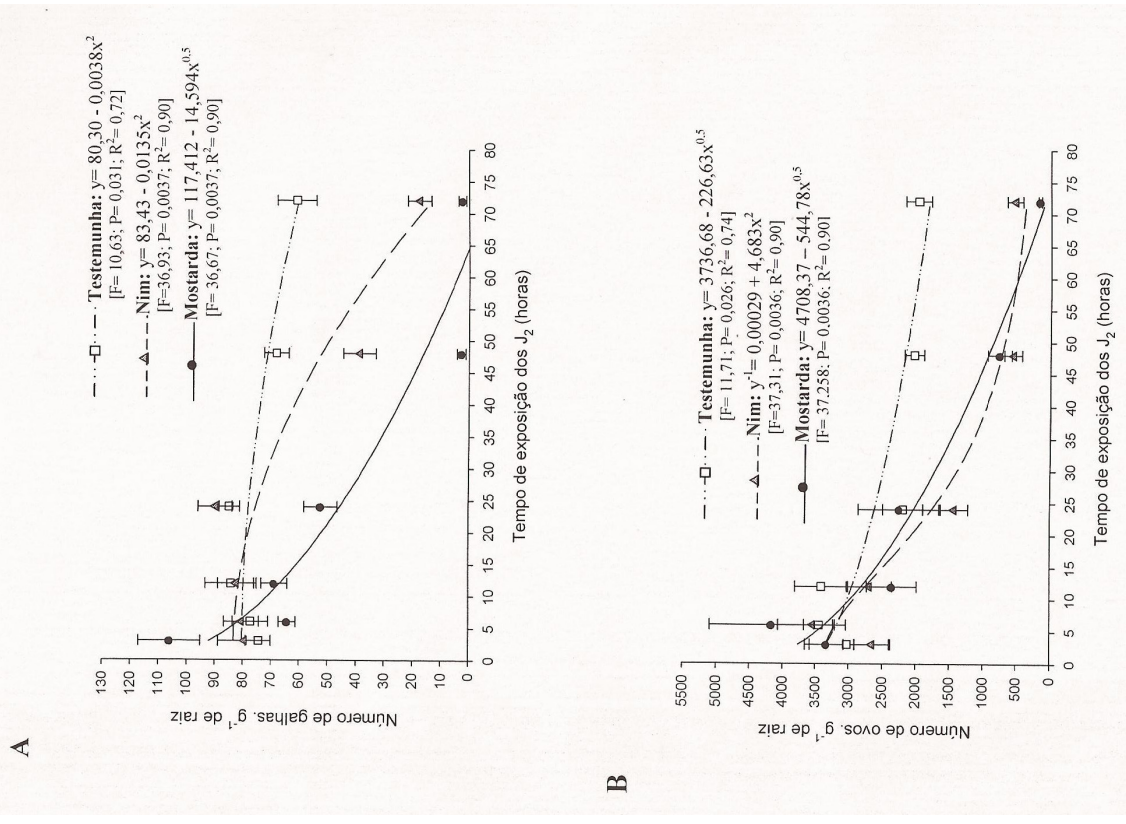


Figura 3. Infectividade e reprodução de juvenis de segundo estágio (J₂) de *Meloidogyne incognita* em raízes de tomateiro após vários tempos de exposição dos J₂ aos compostos orgânicos voláteis emitidos por macerados de folhas de nim e de mostarda. A) Número de galhas.g⁻¹ de raiz; B) Número de ovos.g⁻¹ de raiz. As barras indicam o erro padrão da média.

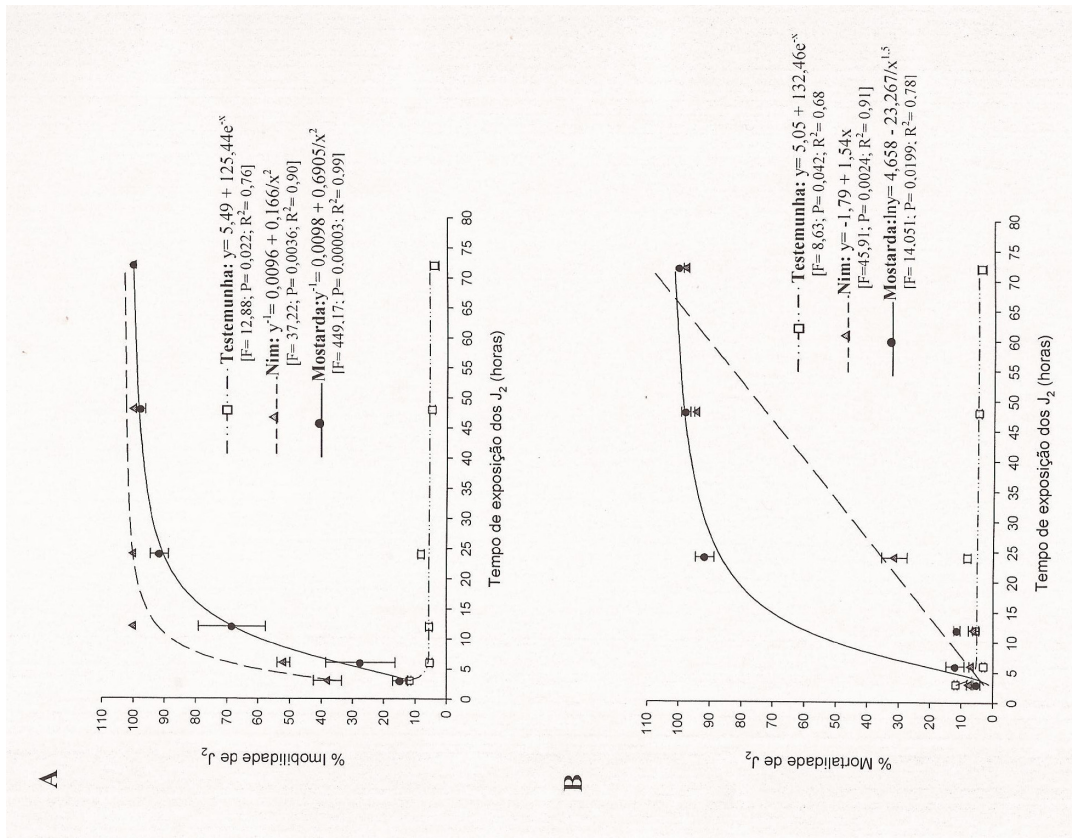


Figura 2. Percentual de imobilidade (A) e mortalidade (B) de juvenis de segundo estágio (J₂) de *Meloidogyne incognita* após vários tempos de exposição dos J₂ aos compostos orgânicos voláteis emitidos por macerados de folhas de nim e de mostarda. As barras indicam o erro padrão da média.

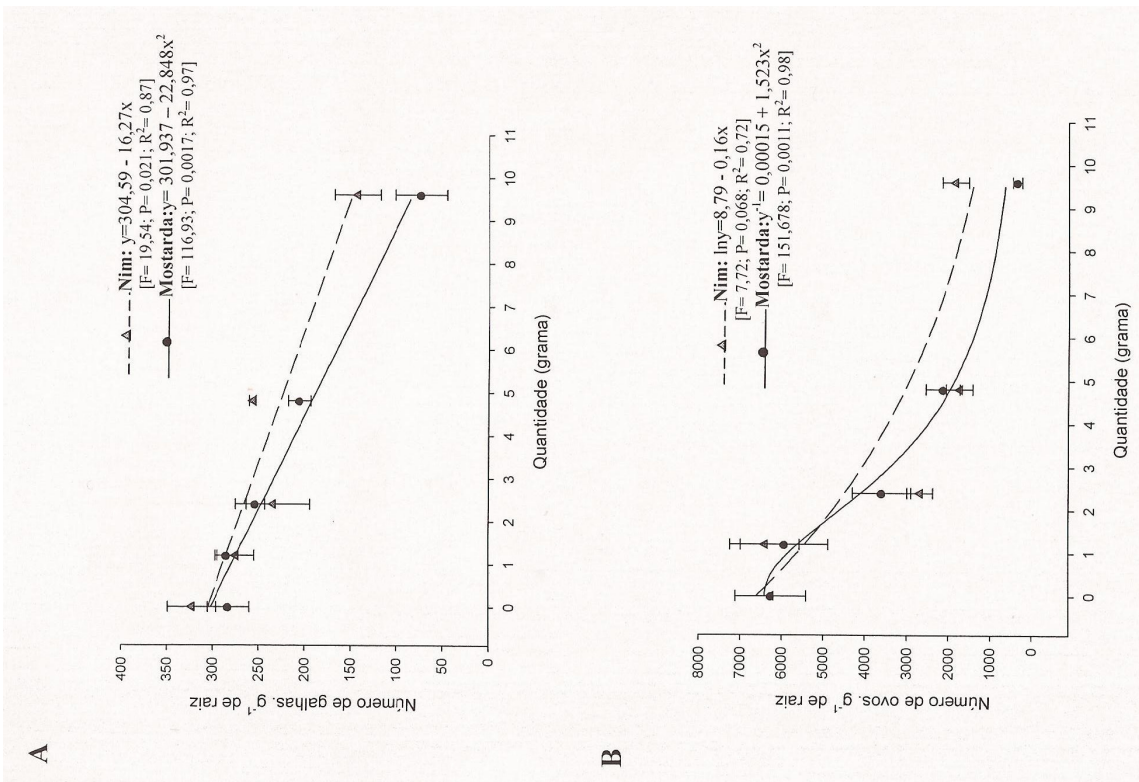


Figura 4. Número de galhas (A) e número de ovos (B) de *Meloidogyne incognita* em raízes de tomateiro, resultantes da exposição de ovos de *M. incognita* no solo nas diferentes doses de macerados fresco de nim e de mostarda incorporadas ao substrato em copos e, posteriormente, fechados hermeticamente. As barras indicam o erro padrão da média.

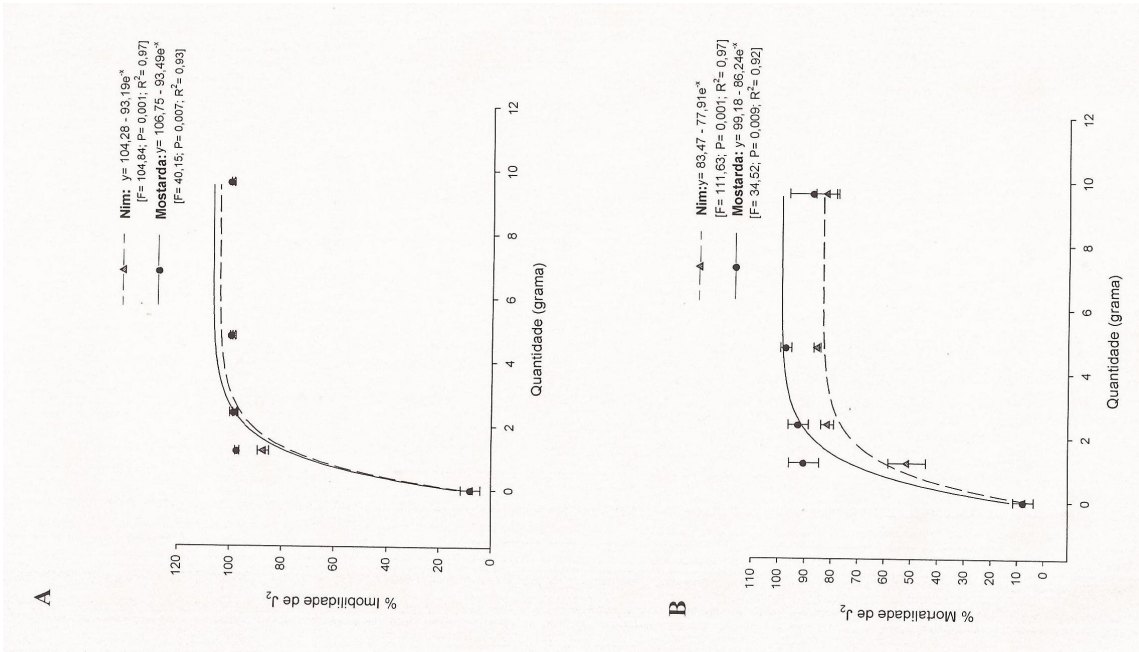


Figura 5. Percentual de imobilidade (A) e de mortalidade (B) de juvenis de segundo estágio (J₂) de *Meloidogyne incognita*, devido à exposição dos J₂ aos compostos orgânicos voláteis emitidos por cinco doses do macerado fresco de folhas de nim e de mostarda incorporadas ao solo em copos fechados hermeticamente. As barras indicam o erro padrão da média.

de *M. incognita* ($P = 0,004$). Para a mostarda, todas as quantidades testadas diferiram da testemunha e atingiram níveis semelhantes de mortalidade (87 – 97%) dos J_2 de *M. incognita*. Já para o nim as maiores porcentagens de mortalidade foram obtidas nas quantidades iguais ou acima a 2,4 g do macerado. As duas plantas testadas diferiram quando foi utilizada a quantidade de 1,2 g, sendo que, o macerado de mostarda proporcionou maior taxa de mortalidade (90%) em comparação com o macerado de nim (51%) (Figura 5B).

DISCUSSÃO

Folhas frescas de nim e mostarda maceradas emitem COVs tóxicos a *Meloidogyne incognita*. As curvas de progresso da imobilidade e mortalidade confirmaram que a exposição por 24 horas dos J_2 é suficiente para avaliar a toxicidade de COVs emitidos por mostarda e nim, cujos períodos de exposição também têm sido empregados na avaliação de COVs emitidos por colônias fúngicas e bacterianas (Gu *et al.*, 2007; Campos *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2010). No entanto, exposições dos J_2 a períodos de tempo inferiores a 24 horas já podem imobilizar os J_2 . Isso conduz a possibilidade deste efeito atrasar o período de tempo requerido para o nematoide completar seu ciclo de vida, afinal o nematoide necessita se movimentar e ser atraído para o local de penetração.

As reduções no número de galhas pelos COVs emitidos pelo nim e mostarda revelam como efeito nematicida os efeitos tóxicos avaliados pela imobilidade e mortalidade. O maior tempo de exposição requerido para o macerado de nim reduzir o número de galhas concorda com a baixa mortalidade dos J_2 provocada pelos COVs do macerado de nim em relação ao macerado de mostarda no tempo de 24 horas. Ainda são poucos os estudos de redução na infectividade de J_2 de *M. incognita* após exposição aos COVs de fungos e bactérias por 24 horas. Porém, Freire *et al.* (2012) observaram redução progressiva a partir desse período de exposição dos J_2 aos COVs de *Fusarium oxysporum*.

Embora a menor redução de galhas causadas pelos J_2 expostos aos COVs de nim comparada àquelas causadas por J_2 expostos aos de mostarda comprove a menor taxa de mortalidade, esta diferença não foi tão marcante na reprodução (número de ovos). Isso indica que processos fisiológicos no corpo do J_2 e eventos envolvidos na infectividade foram diferentemente afetados pelos COVs das duas plantas. De fato, COVs emitidos por nim e mostarda têm composições diferentes, destacando-se os isotiocianatos presentes na mostarda e ausentes no nim (Zeringue & Bhatnagar, 1994; Smolinska & Horbowicz, 1999), os quais podem ter modos de ação diferentes tanto no corpo do J_2 como

no processo de infecção do hospedeiro.

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

O efeito tóxico dos COVs dos macerados de nim e mostarda misturados ao substrato infestados com ovos de *M. incognita* foi demonstrado por meio da redução do número de galhas e de ovos nos tomatesiros. Esses resultados corroboram com os obtidos por Javed *et al.* (2007) e Neves *et al.* (2007) que misturaram também o tecido vegetal triturado ao solo. Segundo Roubtsova *et al.* (2007), para que a biofumigação seja eficaz é necessário uma mistura completa e uniforme do material vegetal através do perfil do solo onde ocorrem os nematoides alvo. O efeito tóxico do macerado de mostarda a *M. incognita* alcançado neste trabalho, talvez, pode ter sido causado pela emissão dos compostos voláteis sulfeto de metila e dissulfeto de dimetila. A emissão desses compostos voláteis por brássicas tem sido correlacionada com a eficácia no controle de *Verticillium dahliae*, *Fusarium* e *Tylenchulus semipenetrans* (Wang *et al.*, 2009)

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

O aumento da imobilidade e mortalidade de J_2 de *M. incognita* pelos COVs liberados pelas quantidades de macerados de nim e mostarda e retidos entre o substrato e a cobertura plástica, indica que tais compostos são tóxicos ao nematoide. Os COVs tóxicos a J_2 de *M. incognita* retidos pela cobertura plástica no experimento conduzido neste trabalho indica que sem essa cobertura o efeito biofumigante da incorporação de folhas de nim e mostarda é reduzido. Maior eficácia no controle de *Globodera pallida* foi alcançada com cobertura plástica após incorporação de brássica e correlacionada com a presença de isotiocianato que é volátil (Lord *et al.*, 2011) No uso do nematicida Dazomet, que tem o isotiocianato de metila como princípio ativo, recomenda-se a cobertura plástica após sua aplicação (Agrofit, 2013). Outro fator que pode aumentar a atividade supressiva a patógenos em geral e, principalmente, a fitonematoides é a irrigação após a incorporação do material vegetal triturado. Embora não se tem comprovação da eficácia deste procedimento no campo, a exposição de água aos COVs emitidos pelo fungo *Muscodor*

albus tornou-a tóxica a *M. incognita* (Grimme *et al.*, 2007). Vale destacar que substâncias polares, a semelhança da água, estão presentes em COVs de nim e mostarda como, por exemplo, etanol, acetona e isômeros de metil-butanol (Barros *et al.*, 2014), o que conduz a sua diluição na água de irrigação. Desta forma, a irrigação após a incorporação do material vegetal triturado promoverá a retenção da substância tóxica na água do solo por mais tempo, podendo então alcançar o tempo de exposição adequado para imobilizar ou matar os fitonematoides (Morra & Kirkegaard, 2002; Matthiessen *et al.*, 2004). Neste trabalho foi demonstrado o efeito tóxico dos COVs de nim e mostarda em função do tempo de exposição do nematoide e da quantidade de tecido vegetal na biofumigação contra *M. incognita*, concluindo que a mistura ao substrato do macerado de nim ou mostarda e os COVs emitidos para o ar tem efeitos nematocidas a MI bem como as exposições dos J₂ a eles a partir de 24 horas. Isso representa um passo importante em estudos futuros sobre manejo de fitonematoides.

AGRADECIMENTOS

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

LITERATURA CITADA

- Agrofit. 2013. Sistema de agrotóxicos fitossanitários. Online. http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons.
- Anvisa. 2012. Agrotóxico utilizado como chumbinho é retirado do mercado brasileiro. Online. <http://s.anvisa.gov.br/wps/s/r/Nfh>
- Anvisa. 2013. Consulta pública nº 29, de 22 de maio de 2003. Online. [http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP\[4684-1-0\].PDF](http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP[4684-1-0].PDF).
- Ahmad, Y., and A. Ghaffar. 2007. Soil solarization: A management practice for mycotoxins in corn. *Pakistan Journal of Botany* 39:2215-2223.
- Barros, A. F., V. P. Campos, J. C. P. Silva, M. P. Pedroso, F. H. V. Medeiros, E. A. Pozza, and A. L. Reale. 2014. Nematicidal activity of volatile organic compounds emitted by *Brassica juncea*, *Azadirachta indica*, *Canavalia ensiformis*, *Mucuna pruriens* and *Cajanus cajan* against *Meloidogyne incognita*. *Applied Soil Ecology* 80:34-43.
- Bones, A. M., and J. T. Rossiter. 2006. The enzymic and chemically induced decomposition of glucosinolates. *Phytochemistry* 67:1053-1067.
- Campos, V. P., R. S. C. Pinho, and E. S. Freire. 2010. Volatiles produced by interacting microorganisms potentially useful for the control of plant pathogens. *Ciência e Agrotecnologia* 34:525-535.
- Charron, C. S., and C. E. Sams. 1999. Inhibition of *Pythiummultimum* and *Rhizoctoniasolani* by shredded leaves of *Brassica* species. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 124:462-467.
- Chitwood, B. G. 1951. Root-Knot nematodes. II - Quantitative relation of the root-knot nematode - *Meloidogyne hapla* Chitwood, 1949 with tomatoes, onions and lima beans *Plant and soil* 3:47-50.
- Ferraz, L. C. C. B., and M. G. C. Churata-Masca. 1983. Comportamento de cultivares de tomateiro (*Lycopersicon esculentum*, Mill) de crescimento determinado em relação ao nematóide *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1949. *Cientifica* 11:87-91.
- Freire, E. S., V. P. Campos, R. S. C. Pinho, D. F. Oliveira, M. R. Faria, A. M. Pohlit, N. P. Noberto, E. L. Rezende, L. H. Pfenning, and J. C. T. Silva. 2012. Volatile substances produced by *Fusarium oxysporum* from coffee rhizosphere and other microbes affect *Meloidogyne incognita* and *Arthrobotrysconoides*. *Journal of Nematology* 44:321-328.
- Gray, C. M., R. K. Monson, and N. Fierer. 2010. Emissions of volatile organic compounds during the decomposition of plant litter. *Journal of Geophysical Research-Biogeosciences* 115:1-9.
- Grimme, E., N. K. Zidack, R. A. Sikora, G. A. Strobel, and B. J. Jacobsen. 2007. Comparison of *Muscodoralbus* volatiles with a biorational mixture for control of seedling diseases of sugar beet and root-knot nematode on tomato. *Plant Disease* 91:220-225.
- Gu, Y. Q., M. H. Mo, J. P. Zhou, C. S. Zou, and K. Q. Zhang. 2007. Evaluation and identification of potential organic nematicidal volatiles from soil bacteria. *Soil Biology & Biochemistry* 39:2567-2575.
- Huang, Y., C. K. Xu, L. Ma, K. Q. Zhang, C. Q. Duan, and M. H. Mo. 2010. Characterisation of volatiles produced from *Bacillus megaterium* YFM3.25 and their nematicidal activity against *Meloidogyne incognita*. *European Journal of Plant Pathology* 126:417-422.
- Hussey, R. S., and K. R. Barker. 1973. A comparison of methods for collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. *Plant Disease Reporter* 57:1025-1028.
- Javed, N., S. R. Gowen, M. Inam-Ulhaq, and S. A. Anwar. 2007. Protective and curative effect of neem (*Azadirachta indica*) formulations on the

- development of root-knot nematode *Meloidogyne javanica* in roots of tomato plants. *Crop Protection* 26:530-534.
- Kagai K. K., J. N. Aguyoh, and G. O. Tunya. 2012. Efficacy of selected plant biofumigants in the management of parasitic nematodes in asclepias (*Asclepias tuberosa* L.). *International Journal of Science and Nature* 3:728-734.
- Lazzeri, L., R. Tacconi, and S. Palmieri. 1993. In vitro activity of some glucosinolates and their reaction products toward a population of the nematode *Heterodera schachtii*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41:825-829.
- Lord, J. S., L. Lazzeri, H. J. Atkinson, and P. E. Urwin. 2011. Biofumigation for control of pale potato cyst nematodes: activity of brassica leaf extracts and green manures on *Globodera pallida* in vitro and in soil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59:7882-7890.
- Lordello, L. G. E. 1981. Nematóides das plantas cultivadas. São Paulo: Nobel, 314p.
- Lynn, O. M., W. G. Song, J. K. Shim, J. E. Kim, and K. Y. Lee. 2010. Effects of azadirachtin and neem-based formulations for the control of sweet potato whitefly and root-knot nematode. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry* 53:598-604.
- Matthiessen, J. N., B. Warton, and M. A. Schackleton. 2004. The importance of plant maceration and water addition in achieving high brassica-derived isothiocyanate levels in soil. *Agroindustria* 3:277-280.
- Mayton, H. S., C. Olivier, S. F. Vaughn, and R. Loria. 1996. Correlation of fungicidal activity of Brassica species with allylisothiocyanate production in macerated leaf tissue. *Phytopathology* 86:267-271.
- Morra, M. J., and J. A. Kirkegaard. 2002. Isothiocyanate release from soil-incorporated *Brassica* tissues. *Soil Biology & Biochemistry* 34:1683-1690.
- Moura, L., I. Queiroz, I. Mourao, L. M. Brito, and J. Duclos. 2012. Effectiveness of soil solarization and biofumigation for the control of corky root and root-knot nematode *Meloidogyne* spp. on tomato. In: XXVIII International Horticultural Congress on Science and Horticulture for People. *Acta Horticulturae* 933:399-405.
- Neves, W. S., L. G. Freitas, M. M. Coutinho, D. F. Parreira, S. Ferraz, and M. D. Costa. 2007. Biofumigação do solo com espécies de brássicas para o controle de *Meloidogyne javanica*. *Nematologia Brasileira* 31:195-201.
- Ojaghian, M. R., H. Jiang, G. L. Xie, Z. Q. Cui, J. Z. Zhang, and B. Li. 2012. In vitro biofumigation of brassica tissues against potato stem rot caused by *Sclerotinia clerotiorum*. *Plant Pathology Journal* 28:185-190.
- Roubtsova, T., J. A. Lopez-Perez, S. Edwards, and A. Ploeg. 2007. Effect of broccoli (*Brassica oleracea*) tissue, incorporated at different depths in a soil column, on *Meloidogyne incognita*. *Journal of Nematology* 39:111-117.
- Sasser, J. N. 1980. Root-knot nematodes: a global menace to crop production. *Plant Disease* 64:36-41.
- Sikora, R. A., J. Bridge and J. L. Starr. 2005. Management practices: An overview of integrated nematode technologies. Pp. 793-825 in M. Luc, R. A. Sikora, and J. Bridge, ed. *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture*, Wallingford: CAB International Publishing.
- Smolinska, U., and M. Horbowicz. 1999. Fungicidal activity of volatiles from selected cruciferous plants against resting propagules of soil-borne fungal pathogens. *Journal of Phytopathology* 147:119-124.
- Stapleton, J. J., and R. A. Duncan. 1998. Soil disinfestation with cruciferous amendments and sublethal heating: effects on *Meloidogyne incognita*, *Sclerotium rolfsii*, and *Pythium multivium*. *Plant Pathology* 47:737-742.
- Trudgill, D. L., and V. C. Block. 2001. Apomictic, polyphagous rootknot nematodes: exceptionally successful and damaging biotrophic root pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 39:53-77.
- Wang, D., C. Rosen, L. Kinkel, A. Cao, N. Tharayil, and J. Gerik. 2009. Production of methyl sulfide and dimethyl disulfide from soil-incorporated plant materials and implications for controlling soilborne pathogens. *Plant and Soil* 324:185-197.
- Zasada, I. A., and H. Ferris. 2003. Sensitivity of *Meloidogyne javanica* and *Tylenchulus semipenetrans* to isothiocyanates in laboratory assays. *Nematology* 93:747-750.
- Zeringue, H. J., and D. Bhatnagar. 1994. Effects of neem leaf volatiles on submerged cultures of aflatoxigenic *Aspergillus parasiticus*. *Applied and Environmental Microbiology* 60:3543-3547.

Received:

14/IV/2014

Accepted for publication:

22/IX/2014

Recibido:

Aceptado para publicación: