

## EFEITOS DE EXTRATOS VEGETAIS SOBRE A MOTILIDADE, MORTALIDADE E PATOGENICIDADE DE *Meloidogyne exigua*

AMARAL, D.R.<sup>1</sup>; OLIVEIRA, D.F.<sup>1</sup>; CAMPOS, V.P.<sup>1</sup> e CARVALHO, D.A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>UFLA, C. P. 37, 37200-000, Lavras-MG; <denilson@ufla.br>

**RESUMO:** A perda anual brasileira causada por fitonematóides na produção de café é da ordem de R\$ 1 bilhão, o que indica uma considerável necessidade de desenvolvimento de métodos mais eficientes para o controle desses fitoparasitas nos cafezais brasileiros. Para isso, uma possibilidade promissora consiste no emprego de produtos de origem vegetal, menos tóxicos ao homem e meio ambiente. Assim, buscou-se neste trabalho identificar extratos vegetais com atividades tóxicas a *Meloidogyne exigua*, que é um fitonematóide de ampla distribuição nos cafezais brasileiros. Foram preparados extratos metanólicos de 12 diferentes espécies vegetais para serem submetidos a testes *in vitro* de motilidade e mortalidade de juvenis do segundo estágio (J2) de *M. exigua*. Os melhores resultados foram obtidos com o extrato de *Allium cepa*. Este extrato também foi empregado em teste *in vivo* com mudas de café inoculadas com ovos de *M. exigua*. O referido extrato acarretou considerável redução no número de galhas, sem qualquer efeito fitotóxico sobre as mudas. Após concentração do extrato de *A. cepa* sob vácuo, obteve-se resíduo que foi submetido a partição líquido-líquido e lavagens com solventes de diferentes polaridades, para dar origem a diferentes frações. As frações foram submetidas aos testes *in vitro* com J2, o que permitiu verificar que, aparentemente, essa atividade se deve à presença de duas ou mais substâncias de alta polaridade, tóxicas ao referido nematóide.

**Palavras-chave:** *Coffea arabica*, *Meloidogyne exigua*, extratos vegetais.

## EFFECT OF BOTANICAL EXTRACTS ON THE MOBILITY, MORTALITY AND PATHOGENICITY OF *Meloidogyne exigua*

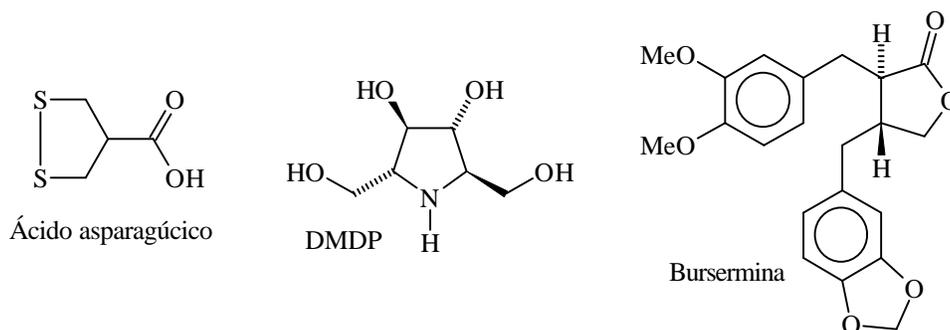
**ABSTRACT:** As part of a work aimed to the development of new methods not toxic to human beings or to the environment to control *Meloidogyne exigua* in coffee, twelve plant extracts were submitted to *in vitro* tests with second stage juveniles (J2) of that nematode. All the extracts presented some toxicity to *M. exigua*, but that from *Allium cepa* afforded the best results. Consequently, it was employed in *in vivo* tests with six months old coffee inoculated with *M. exigua* eggs. This prompted the reduction of the galls

without any toxic effect on coffee. Initial purification steps of the *A. cepa* extract with solvents of different polarities produced results that are in agreement with the existence of two or more active substances in such extract.

**Key words:** *Coffea arabica*, *Meloidogyne exigua*, plant extracts.

## INTRODUÇÃO

Os nematóides perfazem um grande conjunto de animais multicelulares. São cerca de 15.000 espécies descritas (Zacheo, 1993) e há estimativas de que o número total possa chegar à casa dos milhões (Ley, 2000). Do ponto de vista ecológico, podem ser divididos em três grandes grupos: parasitas de animais, de vida livre e parasitas de plantas, conhecidos como fitonematóides (Tsai et al., 1991). Os fitonematóides causam enorme prejuízo à agricultura, reduzindo as colheitas e a qualidade do produto final, além de limitarem o uso do solo e provocarem gastos adicionais com fertilizantes e defensivos agrícolas. No caso específico de café, que é uma cultura de grande importância econômica para o Brasil, acredita-se que a perda na produtividade anual causada por fitonematóides seja da ordem de R\$ 1 bilhão (Santos, 2000). Para contornar esse problema, uma possibilidade bastante promissora consiste no emprego de plantas antagonistas a fitonematóides (Ferraz & Vale, 1997). Em vários casos, tem-se observado que a ação dessas plantas se dá pela produção de substâncias tóxicas a esses parasitas, como é o caso do ácido asparagúico (Figura 1), isolado do extrato de *Asparagus* spp. (Takasugi et al., 1975).



**Figura 1** - Substâncias tóxicas a fitonematóides isoladas de extratos vegetais.

Também podem ser citados o DMDP e a burserina (Figura 1), isolados dos extratos de *Lanchoarpus costaricensis* (Birch et al., 1993) e de *Buphcerum salicifolium* (Gonzalez et al., 1994),

respectivamente. Conseqüentemente, tendo como objetivo contribuir para o desenvolvimento de metodologias mais eficientes e menos agressivas ao homem e meio ambiente para o controle de fitonematóides em café, este trabalho buscou identificar extratos vegetais com atividade tóxica contra *Meloidogyne exigua*, que é amplamente disseminado pelos cafezais brasileiros.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Preparo dos extratos vegetais.** O material vegetal foi picado e refluxado em metanol por 20 minutos. Após resfriar, filtrou-se a mistura resultante. O líquido obtido foi concentrado em evaporador rotatório, dando origem a um resíduo, que foi solubilizado em solução de Tween 80, em água. Empregaram-se as seguintes plantas: *Allium cepa*, *A. sativum*, *Brachiaria decumbens*, *Cajanus cajan*, *Catharantus rosea*, *Crotalaria juncea*, *Ficus elastica*, *Leucaena leucocephala*, *Punica granatum*, *Ruta graveolens*, *Stylosantes guianenses* e *Tagetes minuta*.

**Obtenção de ovos e de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne exigua*.** Raízes de cafeeiros infestadas por *M. exigua* foram colhidas e tiveram as galhas seccionadas. Estas foram trituradas em liquidificador com solução de hipoclorito de sódio 0,5%, conforme técnica descrita por Hussey & Barker (1973). Parte dos ovos obtidos foi colocada em câmara de eclosão, da qual selecionaram-se apenas J2 com 48 horas. Assim, formaram-se duas suspensões: uma com 250 ovos/mL e outra com 500 J2/ mL de água.

**Testes *in vitro* de extratos vegetais sobre a motilidade e mortalidade de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne exigua*.** Dez mL de extrato vegetal e 2 mL de suspensão de J2 foram colocados em placa de Petri de 5 cm de diâmetro. Cada placa constituiu uma unidade experimental, repetida seis vezes. Avaliaram-se 12 extratos vegetais, além de duas testemunhas: com 10 mL de água; e com 10 mL de solução aquosa do nematicida Aldicarb a 150 ppm. O ensaio foi montado em delineamento inteiramente casualizado. Doze e vinte e quatro horas após a exposição de J2 aos extratos vegetais, contaram-se os J2 que não apresentavam mobilidade para calcular a percentagem de inativação. A seguir, os extratos vegetais foram substituídos por água e, passadas mais vinte e quatro horas, contaram-se os J2 imóveis, os quais foram considerados mortos.

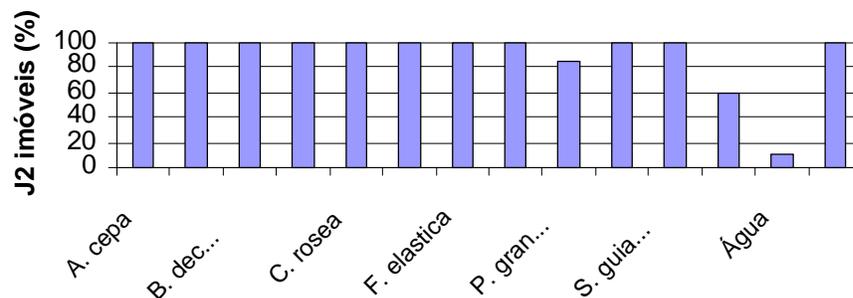
**Teste *in vivo* de extrato de *Allium cepa* com mudas de café (*Coffea arabica*) inoculadas com *Meloidogyne exigua*.** Em vaso de 3 L contendo mistura de terriço e areia na proporção de 1:2, plantou-se uma muda de café com seis meses de idade, que foi imediatamente inoculada com 8.000 ovos de *M. exigua* e tratada com 10 mL de extrato vegetal ou 10 mL de solução aquosa do nematicida Aldicarb a 150

ppm. Como testemunhas empregaram-se mudas de café com os seguintes tratamentos: 1) sem inoculação de *M. exigua* e sem aplicação de extrato ou de Aldicarb; 2) com aplicação de solução de Tween 80; 3) aplicação de extrato vegetal; e 4) inoculação de *M. exigua*. O ensaio foi montado em delineamento inteiramente casualizado, e cada vaso constituiu uma unidade experimental, repetida cinco vezes. Sessenta dias após a inoculação de *M. exigua*, as raízes foram separadas e lavadas em água parada, para contagem do número de galhas por planta.

**Fracionamento do extrato de *Allium cepa*.** Concentrou-se o extrato metanólico de *A. cepa* em evaporador rotatório, o que deu origem a uma suspensão aquosa. Esta foi submetida à partição líquido-líquido com hexano e acetato de etila. Alíquotas de todas as frações foram concentradas sob vácuo e solubilizadas em solução de Tween 80, para serem submetidas aos testes *in vitro*. Como apenas a aquosa se mostrou ativa, foi liofilizada e sucessivamente lavada com acetato de etila, metanol e água. Alíquotas dessas três novas frações também foram concentradas sob vácuo e dissolvidas em solução de Tween 80, para serem submetidas aos testes *in vitro*.

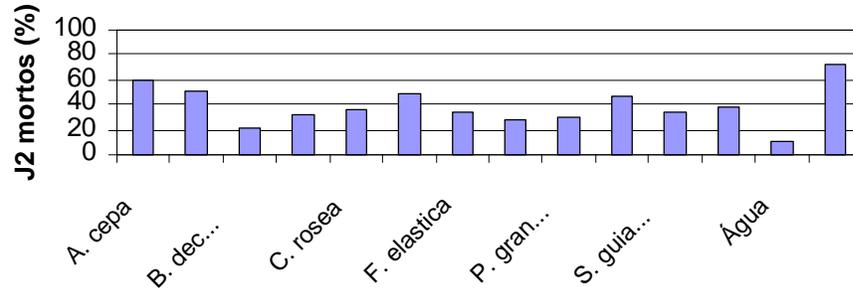
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os extratos testados inativaram os juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne exigua* quando expostos por 24 horas (Figura 2); na maioria dos casos, a porcentagem de inativação foi menor quando a exposição era de apenas 12 horas. Isso indica que, para as condições de trabalho empregadas, 24 horas constitui o tempo ideal para a realização desse teste, o que está de acordo com Costa (2000) e Silva (2001), que obtiveram resultado semelhante ao empregarem a mesma metodologia.



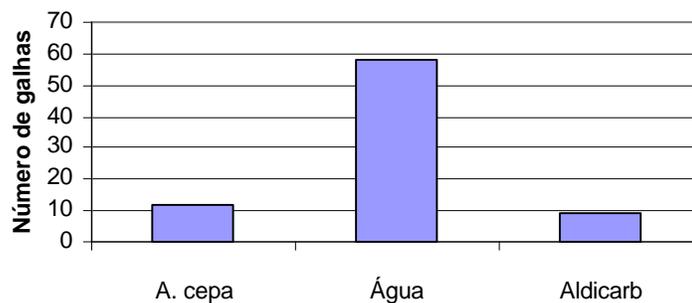
**Figura 2** - Efeito dos extratos vegetais sobre a motilidade de J2 de *M. exigua*, após 24 horas de exposição.

Quanto à avaliação de mortalidade, com exceção do extrato de *Brachiaria decumbens*, todos os outros causaram taxas de mortalidade de J2 estatisticamente superiores às observadas para a testemunha água (Figura 3).



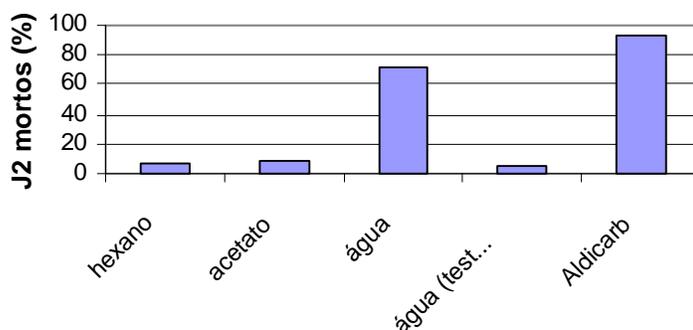
**Figura 3** - Efeito dos extratos vegetais sobre a mortalidade de J2 de *M. exigua*.

Levando-se em consideração os testes *in vitro* realizados, pode-se afirmar que as 12 plantas estudadas apresentaram atividade tóxica a *M. exigua*. No entanto, como o extrato de *Allium cepa* proporcionou os melhores resultados, também foi empregado no teste *in vivo*. Assim, observou-se que o referido extrato reduziu significativamente o número de galhas em café, indicando que o seu contato direto com o inóculo no solo causa a morte de grande parte da população de *M. exigua* (Figura 4).



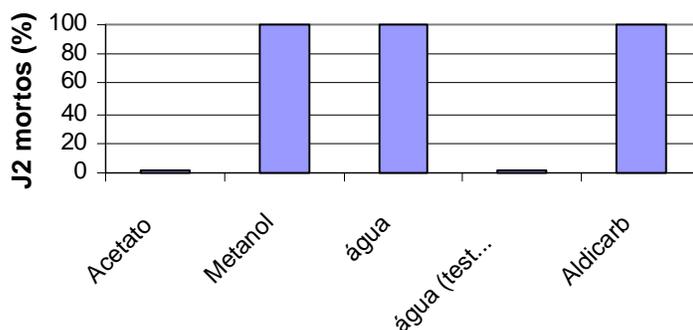
**Figura 4** - Efeito do extrato de *Allium cepa* sobre a formação de galhas de *M. exigua* em mudas de café.

Com base nos resultados expostos, deu-se início ao processo de purificação das substâncias tóxicas a *M. exigua* presentes no extrato de *Allium cepa*. No primeiro processo, o de partição líquido-líquido, observou-se que a única fração ativa era a aquosa, o que sugere alta polaridade por parte das substâncias de interesse para este trabalho (Figura 5).



**Figura 5** - Efeito das frações resultantes da partição líquido-líquido sobre J2 de *M. exigua*.

Como apenas a fração aquosa era ativa, ela foi submetida ao processo seguinte, que novamente resultou em três diferentes frações. Entretanto, ao contrário do que tinha sido observado antes, nesse caso tanto a fração aquosa quanto a metanólica eram ativas (Figura 6). Esse resultado sugere que haja mais de uma substância ativa contra *M. exigua* no extrato de *Allium cepa*.



**Figura 6** - Efeito das frações obtidas durante a lavagem do resíduo resultante da liofilização da fase aquosa sobre J2 de *M. exigua*.

## CONCLUSÕES

As atividades dos extratos vegetais contra *Meloidogyne exigua* deixam evidente que espécies vegetais podem produzir substâncias tóxicas a fitonematóides. No caso específico de cebola (*Allium cepa*), conclui-se que essas substâncias possuem elevada polaridade, uma vez que suas solubilidades se mostraram maiores em água do que em acetato de etila ou hexano.

**AGRADECIMENTOS**

Ao CNPq, por uma bolsa de iniciação científica.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- BIRCH, A.N.E.; ROBERTSON, W.M.; GEOGHEGAN, I.E.; MCGAVIN, W.J.; ALPHEY, T.J.N.; PHILLIPS, M.S.; FELLOWS, L.E.; WATSON, A.A.; SIMONDS, M.S.J. & PORTER, E.A. DMDP- A plant-derived sugar analogue with systemic activity against plant parasitic nematodes. *Nematologica*, 39: p.521-535. 1993.
- COSTA, M.J.N. **Filtrados de culturas fúngicas e extratos de plantas e de esterco animais, com ação antagonista a *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood**. Lavras: UFLA. Dissertação de Mestrado em Fitopatologia, p.115. 2000.
- FERRAZ, S. & VALLE, L.A.C. **Controle de fitonematóides por plantas antagônicas**. Editora UFV, Viçosa-MG. 1997.
- GONZÁLEZ, J.A.; ESTEVEZ-BRAUN, A.; ESTEVEZ-REYES, R.; RAVELO, A.G. Inhibition of potato cyst nematode hatch by lignans from *Bupleurum salicifolium* (Unbelliferae). *Journal of Chemical Ecology*, 20(3): p.517-524. 1994.
- HUSSEY, R.S.; BARKER, K.R.A. A comparison of methods for collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. **Plant Disease Reporter**, 57(12): p.1025-1028. 1973.
- LEY, P.D. Lost in worm space: phylogeny and morphology as road maps to nematode diversity. *Nematology* 2 (1): p.9-16. 2000.
- SANTOS, J.M. Fatos e feitos na história da nematologia no Brasil e principais desafios para o início do novo século. XXII Congresso Brasileiro de Nematologia, Uberlândia (MG). 2000.
- SILVA, G.H. **Purificação e caracterização de substâncias do metabolismo de fungos tóxicos a *Meloidogyne incognita***. Lavras: UFLA. Dissertação de Mestrado em Agroquímica e Agrobioquímica., p.72. 2001.
- TAKASUGI, M.; YACHIDA, Y.; ANETAI, M.; MASAMUNE, T.; KEGASAWA, K. Identification of asparagusic acid as a nematicide occurring naturally in the root of asparagus. **Chemistry Letters**, p.43-44. 1975.
- TSAY, B.Y.; WEST, J.; VAN GUNDY, S.D. Screening Plantas for Nematicidal Agents. In: KUBU, I. & JACOBSON, M. (eds). **Phytochemical Pesticides**. Oxford: CRC Press, 11: p.1-26. 1991.
- ZACHEO, G. "Introduction". In: *Nematode Interactions*. Khan, W.W. (ed.), Chapman and Hall, Londres, p.1-25. 1993.