



**ALEX OLIVEIRA BOTELHO**

**FATORES ENVOLVIDOS NA  
SUPRESSIVIDADE DE *MELOIDOGYNE EXIGUA*  
EM CAFEIEIRO: NOVA TÉCNICA PARA  
ANÁLISE DE COMPOSTOS VOLÁTEIS TÓXICOS  
A FITONEMATOIDES**

**LAVRAS – MG  
2010**

**ALEX OLIVEIRA BOTELHO**

**FATORES ENVOLVIDOS NA SUPRESSIVIDADE DE *MELOIDOGYNE*  
*EXIGUA* EM CAFEIEIRO: NOVA TÉCNICA PARA ANÁLISE DE  
COMPOSTOS VOLÁTEIS TÓXICOS A FITONEMATOIDES**

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

Orientador  
Dr. Vicente Paulo Campos

**LAVRAS - MG  
2010**

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca Central da UFLA**

Botelho, Alex Oliveira.

Fatores envolvidos na supressividade de *Meloidogyne exigua* em  
cafeeiro : nova técnica para análise de compostos voláteis tóxicos a  
fitonematoides / Alex Oliveira Botelho. – Lavras : UFLA, 2010.  
98 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2010.

Orientador: Vicente Paulo Campos.

Bibliografia.

1. Café. 2. Antagonismo. 3. Nematoides. 4. Controle biológico.  
5. Moléculas tóxicas. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 632.2

**ALEX OLIVEIRA BOTELHO**

**FATORES ENVOLVIDOS NA SUPRESSIVIDADE DE *MELOIDOGYNE*  
*EXIGUA* EM CAFEIEIRO: NOVA TÉCNICA PARA ANÁLISE DE  
COMPOSTOS VOLÁTEIS TÓXICOS A FITONEMATOIDES**

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

APROVADA em 21 de setembro de 2010.

Dra. Regina Cássia Ferreira Ribeiro	UNIMONTES
Dr. Luiz Antônio Augusto Gomes	UFLA
Dr. Mário Sobral de Abreu	UFLA
Dr. Paulo Estevão de Souza	UFLA

Dr. Vicente Paulo Campos  
Orientador

**LAVRAS - MG  
2010**

Primeiramente a Deus, que sempre está comigo me confortando e protegendo.

A minha namorada, pela paciência, compreensão e amor.

A minha mãe, por todo esforço para possibilitar meus estudos.

Ao meu pai, meu irmão, meus familiares e meus amigos, pelo apoio e incentivo.

## **OFEREÇO**

## AGRADECIMENTOS

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

Ao CNPq, pela bolsa de estudo.

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

Aos demais professores do DFP/UFLA, pelos ensinamentos.

Aos amigos de laboratório, Renata, Eduardo, Júlio e Tarley, por toda dedicação e ajuda nos experimentos.

Aos também amigos de nematologia Cleber, Lilian, Maria Clara, Davi, Willian pelo companheirismo.

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia, Ruth, Eloísa, Edinho, Mírian e Tia Dilurdes, pela prestatividade.

Aos colegas da Emater-MG, Dimas e Leonardo, pelo apoio na coleta de amostras.

Ao meu atual gerente, Edson Gazeta e ao meu antigo gerente, Marcos Fabri Júnior, pela compreensão.

Aos produtores rurais, por permitirem a coleta de amostras em suas propriedades.

## RESUMO

A rizosfera cafeeira infestada por *Meloidogyne exigua* em diferentes climas, solos e altitudes por vários anos pode levar as populações do nematoide à supressividade por algum fator biológico. Assim sendo, este trabalho teve por objetivo aprofundar estudos sobre os efeitos tóxicos diretos de compostos orgânicos voláteis (COV) no solo aos juvenis de segundo estágio (J2) de *M. exigua*, bem como os COVs produzidos pelos componentes da microflora da rizosfera cafeeira. Procurou-se também definir o papel de *Pasteuria penetrans* e da microflora fúngica de ovos na supressão da população desse nematoide na rizosfera cafeeira. Para análise dos COVs de solo sobre J2, desenvolveu-se nova técnica. O solo infestado por *M. exigua* de cada uma das 17 fazendas estudadas foi colocado dentro do tubo SUPELCO® e fechado. Após a formação dos gases, J2 de *M. incognita* foi injetado dentro do frasco num tubo eppendorf enterrado no solo até à metade. Após 24 horas, a mortalidade e imobilidade dos J2 foi avaliada. Fungos foram isolados de solo, ovos e massas de ovos de *M. exigua* e testados quanto à produção de COV tóxico a J2. Bactérias endofíticas foram testadas quanto à produção de COV tóxico a *Paecilomyces lilacinus* – agente de controle biológico de fitonematoídeos já comercializado. COVs tóxicos a J2 de *M. exigua* foram produzidos por solos em diferentes tempos de vedação de tubo SUPELCO® com solo. Em quatro fazendas, encontrou-se *Pasteuria penetrans* parasitando J2 em diferentes níveis. A eclosão do J2 foi sempre baixa (menos de 30% dos ovos) na maioria das fazendas amostradas. Porém, a infestação fúngica dos ovos foi alta, variando de 46% a 83%. Vários gêneros e espécies fúngicas foram isoladas da rizosfera cafeeira, predominando o gênero *Fusarium* sp.. Altas atividades nematicidas foram demonstradas pelos COVs produzidos por *F. oxysporum*, *Penicillium* sp., *Syncephalastrum* sp. e pelo inóculo 12 (não identificado). Alta e muito alta atividade fungicida a *P. lilacinus* foi proporcionada pelo COV de dois isolados de *Bacillus sphaericus* e um de *B. pumillus*. A relação entre desenvolvimento do embrião e multiplicação celular gerou um índice de desenvolvimento embrionário que correlacionou positivamente (0,28;  $p \leq 0,05$ ) com número de J2 por 100cc de solo. Os COVs, *P. penetrans* e a atuação da microflora no ovo, que afeta a eclosão e o desenvolvimento embrionário podem constituir fatores de supressividade de populações de *M. exigua* no cafezal. Contudo, bactérias podem impedir o sucesso da introdução de *P. lilacinus* (formulação comercial) como agente de controle de *M. exigua* na rizosfera cafeeira.

Palavras-chave: Supressividade. Voláteis. *Meloidogyne exigua*. *Coffea arabica*. Nematoide-das-galhas.

## ABSTRACT

The coffee rhizosphere infested by *Meloidogyne exigua* growing in different climates, soils and altitudes through several years may lead to *M. exigua* population suppressiveness by some biological factor. Therefore, the study aim was to investigate the volatile organic compounds (COVs) from soil directly toxic to second stage juveniles (J2) of *M. exigua*, as well as the VOCs produced by microflora components of coffee rhizosphere, besides the definition of *Pasteuria penetrans* and egg fungus microflora roles on the suppression of *M. exigua* population of coffee rhizosphere. In order to accomplish these objectives, a new and simple technique was developed to evaluate soil VOC toxicity to J2. Soil from each of the 17 infested farms by *M. exigua* was placed into SUPELCO® flasks and then sealed. After the gas formation, *M. incognita* J2s were infected by a hypodermic injection device inside an eppendorf tube half buried in the soil. After 24 hours, the J2 mortality and immobility were evaluated. Fungi were isolated from soil, *M. exigua* eggs and egg masses and tested for the production of VOCs toxic to J2. Endophytic bacteria were tested for the production of VOCs toxics to *Paecilomyces lilacinus* – a biological control of plant-parasitic nematodes commercialised as Bioact®. VOCs toxic to *M. exigua* J2 were produced by soil at different time periods in SUPELCO® flasks filled with farm soil. From the coffee farm sampled (17), four of them had *Pasteuria penetrans* parasitizing *M. exigua* J2 at different levels. The J2 hatching was consistently low (less than 30% of the eggs) in most of the 17 farms sampled. However, the fungus infestation on eggs was high, varying from 46% to 83%. Various fungus, genera and species were isolated from coffee rhizosphere predominating the *Fusarium* genus. High nematocidal activities were demonstrated by VOCs produced by *Fusarium oxysporum*, *Penicillium* sp., *Syncephalastrum* sp., and by isolate 12 (non-identified). High and very high fungicidal activities to *P. lilacinus* were demonstrated by VOCs from 2 isolates of *Bacillus sphaericus* and *B. pumillus*. The relationship between embryo development and cellular multiplication generated an index called embryonic development which correlated positively (0,28;  $p \leq 0,05$ ) with the number of J2 per 100cc of soil. The VOCs, *P. penetrans* and the micro flora effect upon the egg affecting the hatching and embryonic development became suppressive factors against *M. exigua* population of coffee farms. And bacteria halt the introduction success of *P. lilacinus* (commercialized formulation) as control agent of *M. exigua* in infested coffee rhizosphere.

Keywords: Suppressiveness. Volatile. *Meloidogyne exigua*. *Coffea arabica*. Root-knot-nematode.

## SUMÁRIO

	<b>CAPÍTULO 1</b> Introdução geral .....	10
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	10
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	12
<b>2.1</b>	<b>Supressividade a fitopatógenos</b> .....	12
<b>2.2</b>	<b>Fatores bióticos envolvidos na supressividade a fitonematoides</b> ...	13
<b>2.2.1</b>	<b>Fungos envolvidos na supressividade</b> .....	13
<b>2.2.2</b>	<b>Bactérias no controle de fitonematoides</b> .....	16
<b>2.3</b>	<b>Supressividade natural de fitonematoides campo</b> .....	19
<b>2.4</b>	<b>Fatores abióticos envolvidos na supressividade de nematoides</b> .....	20
<b>2.5</b>	<b>Voláteis e a supressividade em solos a fitonematoides</b> .....	22
<b>3</b>	<b>CONSIDERAÇÕES GERAIS</b> .....	25
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	26
	<b>CAPÍTULO 2</b> Fatores de supressividade a <i>M. exigua</i> na rizosfera cafeeira no campo: nova e simples técnica para avaliação de compostos orgânicos voláteis tóxicos a fitonematoides .....	36
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	39
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	42
<b>2.1</b>	<b>Amostragem</b> .....	42
<b>2.2</b>	<b>Voláteis em solo</b> .....	42
<b>2.3</b>	<b>Extração de ovos de raízes e de juvenis de segundo estágio (J2) de solo e quantificação de J2 com e sem <i>Pasteuria penetrans</i></b> .....	44
<b>2.4</b>	<b>Eclosão de J2</b> .....	46
<b>2.5</b>	<b>Ovos infestados por fungos</b> .....	46
<b>2.6</b>	<b>Matéria orgânica, textura e porcentagem de argila</b> .....	47
<b>2.7</b>	<b>Delineamento experimental</b> .....	47
<b>2.8</b>	<b>Análises estatísticas dos dados</b> .....	47
<b>3</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	49
<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	54
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	58
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	59
	<b>CAPÍTULO 3</b> Substâncias voláteis no antagonismo de fungos da rizosfera cafeeira a <i>Meloidogyne exigua</i> , de bactérias endofíticas a <i>Paecilomyces lilacinus</i> e relações entre desenvolvimento embrionário e juvenis de segundo estágio de <i>M. exigua</i> no solo ...	66
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	68
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODO</b> .....	70
<b>2.1</b>	<b>Amostragem</b> .....	70
<b>2.2</b>	<b>Extração de ovos das raízes e juvenis de segundo estágio (J2) do solo</b> .....	70

2.3	Desenvolvimento embrionário.....	71
2.4	Infestação fúngica nos ovos .....	71
2.5	Isolamento fúngico .....	72
2.5.1	A partir de ovos .....	72
2.5.2	A partir de massas de ovos .....	72
2.5.3	A partir de solo rizosférico de cafeeiro infestado por <i>M. exigua</i> ...	73
2.6	Cultura de <i>Paecilomyces lilacinus</i> .....	73
2.7	Isolados bacterianos .....	74
2.8	Atividade fungicida (AF) dos compostos orgânicos voláteis (COV) bacterianos .....	74
2.9	Atividade nematicida <i>in vitro</i> dos compostos orgânicos voláteis (COVs) fúngicos (imobilidade e mortalidade de J2) .....	75
2.10	Delineamento experimental .....	76
2.11	Análise estatística dos dados.....	76
2.12	Flutuação anual de temperatura e umidade relativa do ar das cidades de Lavras e Varginha, estado de Minas Gerais.....	76
3	RESULTADOS .....	78
4	DISCUSSÃO .....	85
5	CONCLUSÕES .....	88
	REFERÊNCIAS .....	89
	ANEXOS .....	96

## CAPÍTULO 1

### INTRODUÇÃO GERAL

#### 1 INTRODUÇÃO

No Brasil, o cultivo do café ocorre em extensas plantações, em diferentes climas, solos e altitudes (CAMARGO, 1977). Essa diversidade de ambientes promove adaptações em micro-organismos na colonização da rizosfera cafeeira, podendo surgir antagonismos que levem à supressividade de fitonematoides, principalmente na região Sul de Minas, MG, onde *Meloidogyne exigua* tem ampla disseminação nos cafezais (CASTRO et al., 2008), além de ser um patógeno presente nessa região do estado de Minas Gerais por muitas décadas.

Em outras culturas, a supressividade natural de origem biológica aos fitonematoides tem sido verificada tanto por fungos (GAIR; MATHIAS; HARVEY, 1969; HEIJBOEK, 1983), quanto por bactéria, principalmente por *Pasteuria penetrans* (BIRD; BRISBANE, 1988; DICKSON et al., 1994; WEIBELZAHN-FULTON; DICKSON; WHITTY, 1996). Também, tem-se induzido a supressividade por inoculações de fungos (CAMPOS; CAMPOS, 1997), bem como por *P. penetrans* (GIBLIN-DAVIS; MCDANIEL; BILZ, 1990; SAYRE; STARR, 1988a). Tem-se, também, isolado fungos e bactérias de ovos, massas de ovos e do solo de diversas culturas infestadas por fitonematoides (ASHOUB et al., 2009; CHEN et al., 1994; FREIRE et al., 2010; MIZOBUTZI et al., 1999; SUN et al., 2006) e demonstrado efeito predatório, parasitismo de ovos e cistos (HIDALGO et al., 2005; OLIVEIRA; FERRAZ; DIAS-ARIEIRA, 2002; SOARES et al., 2005; STIRLING, 1991; VERDEJO-LUCAS et al., 2003) além do efeito de substâncias solúveis em água

tóxicas a fitonematoides (COSTA, 2000; NITAO; MEYER; CHITWOOD, 1999).

Os estudos sobre compostos orgânicos voláteis (COV) tóxicos a fitopatógenos têm sido enfatizados na última década (CAMPOS; PINHO; FREIRE, 2010), sendo que alguns desses estudos tratam de seus efeitos tóxicos aos fitonematoides (FREIRE et al., 2010). Bactérias e fungos isolados de solos agricultáveis produzem COVs tóxicos aos fungos (fungistase) e aos fitonematoides (FREIRE et al., 2010; GU et al., 2007; HUANG et al., 2010; RIGA et al., 2008). Entretanto, o efeito direto de COV -- produzido no solo pela sua microflora -- aos fitonematoides ainda não foi demonstrado .

A produção de COVs pelo solo rizosférico do cafeeiro, bem como pelos organismos integrantes de sua microflora, tóxicos aos fitonematoides do cafeeiro, ainda precisa ser pesquisado.

A introdução massal de agentes de controle biológico via formulações comerciais no solo muitas vezes não é bem sucedida. Vários trabalhos têm demonstrado o antagonismo da microflora rizosférica a agentes de controle biológico como *Pochonia chlamyosporia* e *Arthrobotrys conoides* (FREIRE et al., 2010; KOK; PAPERT; HOK-A-HIM, 2001; ZOU et al., 2007), o que poderia explicar insucessos na introdução de formulações comerciais desses agentes na rizosfera de culturas infestadas por fitonematoides.

Portanto, neste trabalho procurou-se verificar a produção e o efeito de compostos orgânicos voláteis (COV) de solos, de bactérias e fungos sobre *M. incognita*, *P. lilacinus* e *M. exigua*, respectivamente. Além disso, objetivou-se também caracterizar fatores de supressividade a *M. exigua* em cafeeiro.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Supressividade a fitopatógenos

A supressividade natural em solos é relatada no mundo desde a década de 30 (BAKER; COOK, 1974). O fenômeno pode ocorrer em função de fatores físicos, químicos ou biológicos, individualmente, ou, nos casos mais comuns, pela interação dos três (BETTIOL; GHINI, 2001).

Dentre os elementos envolvidos na supressividade de solos a patógenos, os agentes biológicos mais pesquisados são fungos, bactérias, nematoides predadores, micorrizas e protozoários (BAKER; COOK, 1974). A ação destes organismos pode ocorrer por antibiose, indução de resistência, predação, parasitismo e pela interação de todos estes mecanismos (BETTIOL; GHINI, 2001). Segundo Cook e Baker (1983), em solos supressivos, um determinado patógeno tem sua atividade suprimida mesmo quando em contato com hospedeiros suscetíveis. Com isso, a supressividade pode ocorrer com o não estabelecimento do patógeno ou com o estabelecimento do patógeno, porém sem causar a doença ou com o estabelecimento do patógeno, provocando a doença, porém, com baixa intensidade. Trabalhos têm sido feitos com o intuito de comprovar a ligação entre a supressão de patógenos e a ação de agentes biológicos (BAKER; COOK, 1974; BETTIOL; GHINI, 2001; GU et al., 2007). Há relato de controle de *Heterodera avenae* em solos do norte da Europa pelos fungos *Nematophthora gynophila* e *Pochonia chlamydosporia* por mais de 20 anos (KERRY; CRUMP; MULLEN, 1980).

A supressividade está relacionada muitas vezes à atuação de vários micro-organismos. Contudo, a maioria dos estudos tentam demonstrar a eficiência de poucos organismos, ou mesmo apenas um, na promoção da supressividade. Sendo assim, acredita-se que a combinação da ação de diferentes

micro-organismos revela mais informações sobre a forma de supressão que ocorre no solo do que o estudo de um organismo isoladamente (ALABOUVETTE, 1999; MEYER; ROBERTS, 2002). Por exemplo, Freitas (1997) relacionou a supressividade no solo a *Meloidogyne arenaria* em tomate com a quantidade de endósporos da bactéria *Pasteuria penetrans* aderidos à superfície do corpo do nematoide, reduzindo a locomoção dos juvenis de segundo estágio (J2) no solo.

Rodrigues et al. (1999) estudaram a aplicação de silicato de cálcio e a autoclavagem de solo na supressividade natural a *Rhizoctonia solani* em feijão. Constataram que a autoclavagem do solo não aumentou a população do fungo no solo, indicando o envolvimento mais acentuado de fatores físicos e químicos na supressividade. Por outro lado, a aplicação de silicato de cálcio diminuiu a saturação por Al, de 70% para 19% e aumentou a saturação por bases de 9% para 21%, favorecendo o desenvolvimento de *R. solani* no solo.

## **2.2 Fatores bióticos envolvidos na supressividade a fitonematoides**

### **2.2.1 Fungos envolvidos na supressividade**

Inúmeros micro-organismos de solo são capazes de parasitar nematoides. No entanto, apenas algumas bactérias e alguns fungos podem ser utilizados no controle biológico (CAMPOS; SOUZA; SOUZA, 1998). Destes, os fungos têm papel de destaque, pois existem vários relatos de fungos controlando nematoides de forma eficiente, ou seja, desde formas de controle predatórias, até o parasitismo de ovos e fêmeas. Verdejo-Lucas et al. (2002) isolaram diversos fungos associados ao parasitismo de ovos de nematoides em Almeria e Barcelona (Espanha), como: *Pochonia chlamydosporia*, *Verticillium catenulatum*, *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *Acremonium strictum*,

*Clonostachys roseum*, *Cylindrocarpon* spp., *Engiodontium album* e *Dactylella oviparasitica*. Ferreira et al. (2008) estudaram o parasitismo de ovos de *Meloidogyne exigua* por dez isolados de *Pochonia chlamydosporia* e nove isolados de *Trichoderma* spp. e observaram maior eficiência no parasitismo de um isolado de cada espécie fúngica. Estes dois isolados foram submetidos a testes de compatibilidade, não se verificando nenhuma forma de supressão de um sobre o outro. Ao estudar três isolados de *P. chlamydosporia*, Mauchline, Kerry e Hirsch (2004) observaram que os isolados retirados de massas de ovos de *M. javanica* eram mais eficientes saprofiticamente que os fungos isolados de cistos do nematoide *Globodera rostochiensis* em tomate. Os autores observaram ainda que os isolados não interagiam entre si, podendo apresentar nichos diferentes no solo e na rizosfera, sendo que seus efeitos antagonistas aos nematoides se somavam. Os isolados do fungo retirados de cistos foram significativamente mais eficientes que os isolados de galhas para o controle do nematoide do cisto. No entanto, os isolados de galhas apresentaram maior eficiência no controle de *M. javanica* que os isolados dos cistos. Isto indica haver especificidade do isolado fúngico em relação ao hospedeiro. Acredita-se que os isolados mais promissores de *P. chlamydosporia* no controle de nematoides são aqueles que apresentam uma forma mais eficaz de sobrevivência saprofítica no solo, pois, na ausência do nematoide, este prevalecerá por mais tempo na área. Em seu estudo sobre a receptibilidade de solos à colonização por *P. Clamydosporia*, Monfort et al. (2006) observaram que os solos podem ser mais receptivos quando infestados com o fungo isolado do próprio solo. Isso indica que a microbiota do solo pode determinar a habilidade do fungo em colonizar a rizosfera. Campos e Campos (1997) verificaram que *P. chlamydosporia* reduziu o número de J2, o número de ovos e a população total de *M. exigua*, comparativamente à testemunha que recebeu apenas a inoculação com o nematoide. Resultados semelhantes foram encontrados por D'Angieri

Filho e Campos (1997), os quais estudaram o controle de *M. javanica* em jamborandi. Estes autores observaram que o fungo *P. chlamydosporia* reduziu significativamente a população do nematoide, quando comparado à testemunha. No mesmo trabalho, quando o fungo foi aplicado em conjunto com outros dois agentes de controle biológico, *Arthrobotrys conoides* e *Paecilomyces lilacinus*, alcançou-se o melhor resultado quanto à redução do número de galhas por sistema radicular.

Atualmente, além dos fungos tradicionalmente estudados no controle de fitonematoides, tem-se enfatizado o estudo de fungos endofíticos no controle de fitonematoides (POCASANGRE et al., 2000). A característica de um fungo endofítico é sua capacidade de colonizar tecidos internos das plantas sem causar doença (LATCH, 1993). Stolf, Pocasangre e Guerra (2006) estudaram o efeito de reinoculações de fungos endofíticos sobre o controle do nematoide cavernícola da bananeira (*Radopholus similis*). Dos isolados, *Trichoderma* spp. reduziu de forma significativa a população do nematoide em mudas micropropagadas, enquanto o melhor biocontrole por *Fusarium* spp. (não patogênico às plantas) ocorreu com três reinoculações do fungo, chegando a valores de até 69% de controle. O fungo endofítico da bananeira, *Fusarium oxysporum*, foi testado por Vu, Sikora e Gauschild (2004) no controle de *R. similis*. O ensaio demonstrou diminuição de 20% a 24 % da atividade do nematoide, comprovando a eficácia do agente de controle.

Outro grupo de fungos, as micorrizas, demonstram efeito no controle de fitopatógenos. As endomicorrizas têm a capacidade de aumentar a tolerância das plantas a patógenos (através da maior adsorção de P). Tais organismos podem ainda aumentar a espessura das paredes de células corticais de raízes (BETTIOL; GHINI, 2001). Ao colonizarem a superfície das raízes, as micorrizas promovem um efeito protetor à infecção por fitopatógenos, diminuindo a incidência e a severidade da doença. Várias alterações na

morfologia e fisiologia das raízes formam uma barreira química (produção de antibióticos) e físicas (RODRÍGUES-KABANA; CALVET, 1994).

Diederichs (1987) constatou o antagonismo à população de *M. javanica* em raízes de grão de bico, relacionando o fato à presença de espécies nativas de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) no solo.

Strobel, Hussey e Roncadori (1982) constataram que a presença de fungos micorrízicos abasculares proporcionaram o desenvolvimento de plantas de pêssego mais desenvolvidas, se comparadas às plantas sem a micorriza.

### **2.2.2 Bactérias no controle de fitonematoides**

Muitas das características importantes para o sucesso de um agente de controle biológico são apresentadas pela bactéria *Pasteuria penetrans*. Apesar de ser um parasita obrigatório, a bactéria produz uma estrutura de resistência, o endósporo, que pode sobreviver no campo por muitos anos, resistindo a estresses como calor e dessecação (OOSTENDORP; DICKSON; MITCHELL, 1990; SAYRE; STARR, 1988b; STIRLING; BIRD; CAKURS, 1986). *P. penetrans* é uma bactéria gram-positiva que apresenta a característica de crescer filamentosamente (micélio segmentado) dentro do hospedeiro (MANKAU; IMBRIANI, 1975; THORNE, 1940). O endósporo de *P. penetrans* adere à superfície do J2, penetrando em seu corpo através de um tubo germinativo (RAO et al., 1997; SAYRE; WERGIN, 1977). Tal característica permite uma possível utilização da bactéria para controle de fitonematoides dos mais diferentes gêneros, a exemplo de: *Meloidogyne* sp., *Pratylenchus* sp., *Heterodera* sp., *Globodera* sp. e *Belonolaimus* sp. (GIBLIN-DAVIS; MCDANIEL; BILZ, 1990; SAYRE; STARR, 1988a).

No caso de nematoides do gênero *Meloidogyne* sp., a bactéria atua reduzindo a penetração do J2 nas raízes, bem como a sua reprodução. Isso

ocorre em função da dinâmica populacional da bactéria no solo. Quando há uma quantidade muito grande de endósporos no ambiente, a concentração de endósporos por J2 é muito grande, impedindo a penetração. Em outra situação, quando a população da bactéria no solo é baixa, promovendo a aderência de poucos endósporos à cutícula do J2, este consegue penetrar na raiz, formar o sítio de alimentação e chegar à fase adulta. Porém, a ovoposição é comprometida. Dentro da fêmea, formam-se endósporos em vez de ovos, liberando, por conseguinte, milhões de endósporos no solo (BROWN; SMART, 1985; DAVIES; KERRY; FLYNN, 1988; STIRLING, 1984). Um alto grau de eficiência de *P. penetrans* no controle de nematoide tem sido constatado quando a textura do solo é mais arenosa. Isso ocorre porque a facilidade encontrada pelo J2 para se locomover em solos arenosos é maior do que em solos argilosos. Com isso, crescem as chances de contato do J2 com os endósporos da bactéria, conferindo maior sucesso ao controle (OOSTENDORP; DICKSON; MITCHELL, 1990; MATEILLE; DUPONNOIS; DIOP, 1995).

Outro fato relacionado à maior eficiência de *P. penetrans* em solos arenosos é a melhor distribuição dos endósporos nos solos. Em experimento realizado por Dabiré et al. (2007), comprovou-se maior percolação da água em solos arenosos, sendo que mais de 50% dos endósporos percolaram no fluxo de água em solo arenoso, enquanto apenas 0,1% dos endósporos percolou no solo argiloso.

Apesar de *P. penetrans* ser a principal bactéria estudada quanto ao antagonismo a fitonematoides, outras espécies bacterianas presentes na rizosfera das plantas podem contribuir de forma benéfica para o desenvolvimento das plantas, bem como promover sua resistência (BOWEN; ROVIRA, 1976; BOWEN; FOSTER, 1978). Neste ambiente, encontram-se as rizobactérias promotoras de crescimento de plantas. Tais bactérias podem atuar tanto por simbiose com as plantas (aumentando a produtividade), quanto como

antagonistas a patógenos (NEHL;BROWN, 1996). As rizobactérias promovem a alteração de exudatos de raízes ou até mesmo produzem substâncias tóxicas aos fitonemtoídes (WELLER et al., 2002). Esta última forma de ação ainda pode ser separada em produção de substâncias repelentes e substâncias que interferem no reconhecimento, pelos nematoídes, das raízes das plantas (OOSTENDORP; SIKORA, 1990).

O grupo de rizobactérias mais comumente isolado de rizosfera de plantas é *Pseudomonas* fluorescentes (STIRLING, 1991). Já as bactérias do gênero *Bacillus* sp. são mais frequentemente associadas ao controle de fitonematoides (SIKORA, 1988). Hoffmann-Hergarten, Gulati e Sikora (1998) testaram o efeito do tratamento de sementes de alface com as bactérias *Pseudomonas* sp. e *Bacillus cereus* e comprovaram a eficiência no controle de *M. incognita*. Em trabalho realizado com a aplicação de rizobactérias, associadas ou não a extratos de alga no controle de *M. javanica*, o efeito supressor ao nematoíde pela rizobactéria *Pseudomonas aeruginosa* foi demonstrado, bem como o controle de fungos fitopatogênicos como *Macrophomina phaseolina*, *R. solani* e *F. solani* (SULTANA; ARA; EHTESHAMUL-HAQUE, 2008). O patossistema maçã e *Pratylenchus penetrans* foi estudado por Mazzola e Gu (2000), os quais constataram a associação entre o aumento populacional da rizobactéria *Pseudomonas putida* e um maior crescimento das plantas, além de redução na infestação pelo nematoíde.

Além das rizobactérias, há também a participação de outras bactérias que podem estar presentes no ambiente, as bactérias endofíticas. Estas se encontram no interior das plantas, porém sem causar doenças (KLOEPPER et al., 1999). Hallmann et al. (1995) comprovaram a redução de 50% na população de *M. incognita* em plantas de pepino com o uso de bactérias endofíticas.

### 2.3 Supressividade natural de fitonematoides campo

Relatada em muitos trabalhos, a supressividade natural em solos muitas vezes está relacionada a fungos. Gair, Mathias e Havery (1969) foram os primeiros a verificar a supressividade natural de *Heterodera avenae* pelos fungos *P. chlamydosporia* e *Nematophthora gymnophila*. Tal solo foi cultivado com aveia em anos consecutivos de 1955 a 1968 e nenhum prejuízo causado pelo nematoide foi constatado. Em cultivos sucessivos de beterraba açucareira na Holanda (de 1965 a 1982), Heijbroek (1983) observou a supressão da população do nematoide *Heterodera schachtii* ao relacionar a supressividade aos fungos *P. chlamydosporia* e *Cylindrocarpon destructans*.

Contudo, a supressividade natural em solos a fitonematoides também vem sendo relacionada à *P. penetrans* (BIRD; BRISBANE, 1988; DICKSON et al., 1994; WEIBELZAHN-FULTON; DICKSON; WHITTY, 1996). Stirling (1984) observou baixa população de nematoides de galhas em uva na Austrália. Nesse solo, constatou-se a incidência de *P. penetrans*. O solo foi coletado e transferido para vasos, sendo que parte do solo transferido foi autoclavado e a outra parte não. A seguir, os solos foram infestados com juvenis de *Meloidogyne*. Nos solos não autoclavados, constatou-se menor número de galhas, comprovando a supressividade no solo por *P. penetrans*.

Em solos cafeeiros, *P. penetrans* já foi relatada na supressão de populações de *M. exigua* (BAEZA-ARAGÓN, 1978). No Brasil, este registro só foi observado 14 anos depois por Sharma e Lordello (1992) em cafezais infestados por *M. exigua* no estado de São Paulo.

Maximiniano, Campos e Souza (2001) estudaram o efeito de *P. penetrans* na dinâmica populacional de *M. exigua* durante um ano em cafeeiro infestado por ambos os organismos. Os autores verificaram que o parasitismo do nematoide pela bactéria foi maior nos meses do ano em que havia menor

densidade populacional de J2 no solo, coincidindo com o período do ano com menor quantidade de raízes novas, sugerindo que os nematoides percorriam maiores distâncias para encontrar raízes, aumentando as chances de infestação pelos endósporos.

#### **2.4 Fatores abióticos envolvidos na supressividade de nematoides**

Além da microbiota do solo, fatores físicos também estão relacionados à supressividade de fitonematoides em solos cultivados. Características como textura, teor de matéria orgânica, pH, nutrientes, temperatura e umidade muitas vezes interferem no efeito supressivo dos solos (RIME et al., 2003). A ação de tais elementos pode interferir na microbiota do solo, prejudicando ou favorecendo sua diversidade (ALABOUVETTE, 1999).

Muitos trabalhos confirmam que nematoides do gênero *Meloidogyne* sp. provocam mais danos em solos arenosos (CADET; THIOULOUSE, 1998; DABIRÉ et al., 2007; PROT; GUNDY, 1981; SIDDIQUI; MAHMOOD, 1998). Além disso, a textura pode interferir na supressividade de fitonematoide por *P. penetrans*. Um solo de textura arenosa favorece a locomoção do nematoide no solo, ocasionando maior contato com os endósporos (MATEILLE; DUPONNOIS; DIOP, 1995; OOSTENDORP; DICKSON; MITCHELL, 1990).

Avelino et al. (2009) observaram menor densidade populacional de *M. exigua* em solos da Costa Rica com altos teores de zinco e altos teores de areia (acima de 46,7%). Já em relação a *Pratylenchus coffee*, o resultado foi inverso. Solos com maiores teores de Zn e solos com textura arenosa desfavoreceram o nematoide. Nematoides do gênero *Meloidogyne* sp. provocam mais danos em solos arenosos (CADET; THIOULOUSE, 1998; DABIRÉ et al., 2007; PROT; GUNDY, 1981; SIDDIQUI; MAHMOOD, 1998 ).

Edongali, Ducan e Ferris (1982) constataram que o aumento na concentração de CaCl e NaCl, ou a combinação de ambos reduzia a infectividade de *M. javanica* em plantas de tomate. Os autores concluíram que tal efeito se deu em função do aumento da microbiota da rizosfera e por mudanças fisiológicas da planta (SIDDIQUI et al., 2003).

Avelino et al. (2009) observaram uma população menor de *M. exigua* em plantações de café localizadas em altitudes mais elevadas, não sendo observada, porém, infestação por *M. exigua* em cafezais localizados em altitudes superiores a 1500m. Verificou-se ainda que, em regiões cafeeiras com índices baixos de precipitação, ocorriam baixas populações de *M. exigua*.

O material em decomposição proporciona um microambiente propício ao crescimento de diversos micro-organismos, muitos deles com características saprofíticas, competindo por espaço e nutrientes e outros, com características de parasitismo e predação a nematoides (BETTIOL; GHINI, 2001; MAZZOLA, 2007).

Comprovadamente o plantio de crotalária reduz a população de nematoides no campo. Com isso, Wang, Sipes e Schmitt (2003) testaram o efeito da incorporação dos restos de cultura de crotalária na supressão a *Rotylenchulus reniformis*. O estudo demonstrou um aumento na quantidade de fungos nematófagos em campos de produção de abacaxi, levando à supressão da população do nematoide.

A matéria orgânica apresenta características importantes quanto a sua aplicação. Para ocorrer a resposta supressiva no solo, a incorporação do material em decomposição se faz necessária. Ainda assim, diferenças no tempo de resposta à supressividade de acordo com as características de cada solo podem ser verificadas (AIRES et al., 2009).

Araújo e Bettiol (2005) testaram o efeito da adição de lodo de esgoto para o controle de *M. javanica* e *Heterodera glycines* em soja. O lodo tem a

capacidade de modificar propriedades físicas e químicas de solos, visto que é um produto rico em matéria orgânica e nutrientes. O lodo de esgoto reduziu a reprodução e o número de fêmeas de *M. javanica* e reduziu o número de ovos por cisto de *H. glycines*. Nazareno (2009) testou o efeito da adição de esterco bovino no controle de *M. incognita* raça 1 e 3 e de *M. javanica* em cultivo protegido de alface. Para tanto, diferentes doses de esterco foram testadas e verificou-se que a aplicação de 3Kg/m<sup>2</sup> de esterco controlou ambas as raças de *M. incognita*. Contudo, o efeito supressivo na população de *M. javanica* causado pelo esterco ocorreu na aplicação da dose 4,5Kg/m<sup>2</sup>. Da mesma forma, Souza et al. (2006) constataram a redução da população de *M. mayaguensis* em goiabeira quando o solo foi tratado com adubos orgânicos, principalmente esterco bovino.

## **2.5 Voláteis e a supressividade em solos a fitonematoides**

Os COVs são líquidos lipofílicos que, sob alta pressão de vapor, são capazes de atravessar membranas e de se dispersar rapidamente pelo movimento da solução aquosa e pelo fluxo em massa de água no solo (PICHERSKY; NOEL; DUDAREVA, 2006).

Os voláteis são moléculas produzidas pelas plantas e por micro-organismos e podem afetar o meio onde são liberadas. Mais de 1700 moléculas voláteis produzidas por plantas já foram identificadas, representando 1 % dos metabólitos secundários por elas metabolizados. Contudo, a maior parte dos voláteis liberados é produzida pelos micro-organismos presentes no ambiente dos solos (DUDAREVA et al., 2006; LEFF; FIERER, 2008).

Entre os voláteis mais estudados que afetam micro-organismos, destacam-se o etileno, o cianeto de hidrogênio, o acetaldeído, a acetona, o etanol e o dióxido de carbono (CAMPBELL, 1989; TAMIMI; HUTCHINSON, 1975).

Entretanto, seus efeitos tanto podem estimular o desenvolvimento dos patógenos, quanto ser antagonísticos a este (MANGENOT; DIEM, 1979).

Nos últimos anos, cresce o número de trabalhos identificando compostos voláteis produzidos por antagonistas a patógenos. As técnicas empregadas para identificar os compostos orgânicos voláteis são a cromatografia a gás e a espectrometria de massa. Gu et al. (2007) identificaram nove moléculas orgânicas voláteis com efeito nematicida, sendo elas: fenol, 2-octanol, benzaldeído, benzeno-acetaldeído, decanol, 2-nonanona, 2-undecanona, cyclohexeno e dimetil-disulfido. A maior parte dos compostos orgânicos voláteis identificados por Huang et al. (2010) foram benzeno-acetaldeído, decanol, 2-nonanona, 2-undecanona e dimetil-disulfido, fenil-etanona, nonana, fenol, 3,5-dimetoxitolueno, 2,3-dimetil- butanodinitrila e 1-etnil-4-metoxibenzeno, todos apresentando efeitos antagonísticos a nematoides. Em recente trabalho sobre voláteis fúngicos, Freire et al. (2010) verificaram que um isolado de *F. oxysporum* apresentava alto efeito na mortalidade e imobilidade de *M. incognita*. Constataram ainda a presença de 47 voláteis fúngicos, como: cariofileno, 4-metil-2,6-di-tert-butilfenol, 1-(1,1-dimetiletil)-2-metil-1,3-propanodil-2-metilpropanato, acoradieno, entre outros. Zou et al. (2007) estudaram a produção de voláteis por bactérias sobre o crescimento de fungos. Cerca de 32% dos isolados bacterianos obtidos de solo produziram voláteis antagonísticos aos fungos *P. chlamydosporia* e *Paecilomyces lilacinus*, seja inibindo a germinação de esporos ou o crescimento micelial.

Em relação aos nematoides, Gu et al. (2007) testaram, em laboratório - isolados bacterianos produtores de compostos orgânicos voláteis contra o nematoide de vida livre *Panagrellus redivivus*. O ensaio demonstrou que 74,5% dos isolados demonstraram atividade nematicida contra o nematoide. Huang et al. (2010) estudaram o efeito de compostos orgânicos voláteis produzidos por *B. megaterium* sobre *M. incognita*. Os autores verificaram o efeito antagonístico dos

compostos bacterianos, provocando a ocorrência de inibição da eclosão dos ovos, alta mortalidade de J2, diminuição no número de galhas formadas e redução na quantidade de massas de ovos produzidas.

### 3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

É necessário desenvolver critérios que definam a supressividade de populações de fitonematoides. Talvez existam dificuldades para estabelecê-los, uma vez que o nível limiar de prejuízo ainda está indefinido para a maioria das plantas e nematoides. Fatores de supressividade -- principalmente os de causa biológica -- precisam ser avaliados em diferentes plantas e fitonematoides para se obter compatibilidade de sua aplicação em análise laboratorial. A eclosão e o desenvolvimento embrionário podem ser fatores de supressividade a nematoides? A simples presença da bactéria *Pasteuria penetrans* pode constituir-se em fator de supressividade ao seu hospedeiro?

Além dessas questões, na última década, observa-se uma ênfase nas pesquisas com compostos orgânicos voláteis (COVs), produzidos nos solos pela microflora. A medição de COV tóxico ao fitonematoide pode fazer com que este solo seja supressivo a este patógeno?

As pesquisas precisam avançar muito para gerar respostas a essas perguntas e assim auxiliar o produtor rural na sua decisão sobre a necessidade ou não de se aplicar nematicida nessas condições de relativa ou nenhuma supressividade. Ao aplicar nematicida a uma população de fitonematoide num solo supressivo, o produtor estaria aumentando seus custos de produção desnecessariamente, além de, paralelamente, concorrer para a contaminação do meio ambiente.

## REFERÊNCIAS

- AIRES, A. et al. Suppressing potato cyst nematode, *Globodera rostochiensis*, with extracts of brassicacea plants. **American Journal of Potato Research**, Orono, v. 86, n. 4, p. 327-333, Aug. 2009.
- ALABOUVETTE, C. *Fusarium* wild cuppressive soil: na exemplar of disease suppressive soil. **Australasian Plant Pathology**, v. 28, n. 1, p. 57-64, 1999.
- ARAÚJO, F. F.; BETTIOL, W. Supressividade dos nematoides *Meloydogine javanica* e *Heterodera glycines* em soja por adição de lodo de esgoto ao solo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 4, p. 806-812, jul./ago. 2005.
- ASHOUB, A. H. et al. Impact of some fungi species as biocontrol agent against the root-knot nematode, *Meloidogyne Incognita*. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 3, n. 4, p. 3617-3624, 2009.
- AVELINO, J. et al. Relationships between agro-ecological factors and population densities of meloidogyne exigua and pratylenchus coffeae sensu lato in coffee roots, in Costa Rica. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 43, n. 1, p. 95-105, Sept. 2009.
- BAEZA-ARAGÓN, C. A. Parasitismo de *Bacillus penetrans* em *Meloidogyne exigua* estabelecido em *Coffea arabica*. **Cenicafé**, Chinchina, v. 29, n. 3, p. 94-27, 1978.
- BAKER, K. F.; COOK, R. J. **Biological control of plant pathogens**. San Francisco: Freeman, 1974. 433 p.
- BETTIOL, W.; GHINI, R. Solos supressivos. In: MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E. G. T.; MENEZES, M. **Patógenos radiculares em solos tropicais**. Recife: UFPE, 2001. p. 125-152.
- BIRD, A. F.; BRISBANE, P. G. The influence of *Pasteuria penetrans* in field soils on the reproduction of root-knot nematodes. **Revue de Nématologie**, Bondy, v. 11, n. 1, p. 75-81, 1988.
- BOWEN, G. D.; FOSTER, R. C. Dynamics of microbial colonization of plant roots. In: SYMPOSIUM OF SOIL MICROBIOLOGY AND PLANT NUTRITION, 1978, Kuala Lumpur. **Anais...** Kuala Lumpur: University of Malaya, 1978. p. 14-31.

BOWEN, G. D.; ROVIRA, A. D. Microbial colonization of plant roots. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 14, p. 121-144, Sept. 1976.

BROWN, S. M.; SMART, G. C. J. Root penetration by *Meloidogyne incognita* juveniles infected with *Bacillus penetrans*. **Journal of Nematology**, College Park, v. 17, n. 2, p. 123-126, Apr. 1985.

CADET, P.; THIOULOUSE, J. Identification of soil factors that relate to plant parasitic nematode communities on tomato and yam in the French West Indies. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 8, n. 1/3, p. 35-49, May 1998.

CAMARGO, A. P. Zoneamento de aptidão climática para a cafeicultura de arábica e robusta no Brasil. In: **FUNDAÇÃO IBGE, recursos, meio ambiente e poluição**. [S.l.: n.s.], 1977. p. 68-76.

CAMPBELL, R. **Biological control of microbial plant pathogens**. Sidney: C.U.P., 1989. 218 p.

CAMPOS, H. D.; CAMPOS, V. P. Efeito da época e forma de aplicação dos fungos *Arthrobotrys conoides*, *A. musiformis*, *Paecilomyces lilacinus* e *Verticillium chlamydosporium* no controle de *Meloidogyne exigua* do cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 3, p. 361-365, 1997.

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, May/June 2010.

CAMPOS, V. P.; SOUZA, J. T.; SOUZA R. M. Controle de fitonematoides por meio de bactérias. In: LUZ, W.C. **Revisão anual de patologia de plantas**. Passo Fundo: [s.n.], 1998. v. 6, p. 285-327.

CASTRO, J. M. C. et al. Levantamento de fitonematoides em cafezais do sul de Minas Gerais. **Nematologia Brasileira**, Campinas, v. 32, n. 1, p. 56-64, mar. 2008.

CHEN, S. et al. Fungi associated with females and cysts of *Heterodera glycines* in a Florida soybean field. **Journal of Nematology**, College Park, v. 26, n. 3, p. 296-303, Sept. 1994.

COOK, R. J.; BAKER, K. F. **The nature and practice of biological control of plant pathogens**. Saint Paul: APS Press, 1983. 539 p.

COSTA, M. J. N. **Filtrados de culturas fúngicas e esterco animais, com ação antagonista a *Meloidogyne incognita* (Kofoid e White) Chitwood**. 2000. 60 p. Tese (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000.

D'ANGIERI FILHO, C. N. D.; CAMPOS V. P. Controle de *Meloidogyne javanica* em Jabarandi (*Pilocarpus microphyllus*) com *Arthrobotrys conoides*, *Paecilomyces lilacinus* e *Verticillium chlamydosporium*. **Nematologia Brasileira**, Campinas, v. 21, n. 2, p. 23-30, dez. 1997.

DABIRÉ, R. K. et al. Relationships between abiotic soil factors and epidemiology of the biocontrol bacterium *Pasteuria penetrans* in a root-knot nematode *Meloidogyne javanica*-infested field. **Biological Control**, Orlando, 40, n. 1, p. 22-29, Jan. 2007.

DAVIES, K. G.; KERRY, B. R.; FLYNN, C. A. Observations on the pathogenicity of *Pasteuria penetrans*, a parasite of root-knot nematodes. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 112, n. 3, p. 491-501, June 1988.

DIEDERICHS, C. Interaction between five endomycorrhizal fungi and the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* on chickpea under tropical conditions. **Tropical Agriculture**, Trinidad, v. 64, p. 353-355, 1987.

DICKSON, D. W. et al. Control of plant parasitic nematodes by biological antagonists. In: ROSEN, D.; BENNETT, F. D.; CAPINERA, J. L. **Pest management in the subtropics: biological control: a Florida perspective**. Andover: Intercept, 1994. p. 575-601.

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

EDONGALI, E. A.; DUCAN, L.; FERRIS, H. Influence of salt concentration on infectivity and development of *Meloidogyne incognita* on tomato. **Revue de Nématologie**, Bondy, v. 5, n. 1, p. 111-117, 1982.

FERREIRA, P. A. et al. Parasitismo de ovos de *Meloidogyne exigua* por fungos nematófagos e estudo da compatibilidade entre os isolados fúngicos. **Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas**, Chapadinha, v. 2, n. 3, p. 15-21, 2008.

FREIRE, E. S. et al. Volatile substances on the antagonism between fungi, bacteria and *Meloidogyne incognita* and potentially fungi for nematode control. **Journal of Nematology**, College Park, 2010. No prelo.

FREITAS, L. G. **The effects of soil solarization, organic amendment, and fumigant nematicides on *Pasteuria penetrans* and its infectivity to *Meloidogyne arenaria* race 1 in tomato**. 1997. 156 p. Dissertation (Master in Fitopatology) - University of Florida, Gainesville, 1997.

GAIR, R.; MATHIAS, P. L.; HARVEY, P. N. Studies of cereal nematode populations and cereal yields under continuous or intensive culture. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 63, n. 3, p. 503-512, Apr. 1969.

GIBLIN-DAVIS, R. M.; MC DANIEL, L. L.; BILZ, E. F. G. Isolates of the *Pasteuria penetrans* group from phytoparasitic nematodes in bermudagrass turf. **Journal of Nematology**, College Park, v. 22, n. 4, p. 750-762, Oct. 1990.

GU, Y. Q. et al. Evaluation and identification of potential organic nematicidal volatiles from soil bacteria. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 39, n. 10, p. 2567-2575, Oct. 2007.

HALLMANN, J. et al. Endophytic rhizobacteria as antagonists of *Meloidogyne incognita* on cucumber. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 85, n. 10, p. 1136, 1995.

HEIJBROEK, W. Some effects of fungal paorna stihes population development of the beet cyst nematode (*Heterodera schachtii* Schm.). **Meded Faculty Landbwet Riksuniv Gent**, v. 48, p. 433-439, 1983.

HIDALGO, L. et al. Effect of Klamic on the reduction of *Meloidogyne incognita* populations in vegetables crops. **Nematropica**, Bradenton, v. 35, n. 2, p. 77, Oct. 2005.

HOFFMANN-HERGARTEN, S.; GULATI, M. K.; SIKORA, R. A. Yield response and biological control of *Meloidogyne incognita* on lettuce and tomato with rhizobacteria. **Journal of Plant Diseases and Protection**, Stuttgart, v. 105, n. 4, p. 349-358, 1998.

HUANG, Y. et al. Characterisation of volatiles produced from *Bacillus megaterium* YFM3.25 and their nematicidal activity against *Meloidogyne incognita*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 126, n. 3, p. 417-422, Mar. 2010.

KERRY, B. R.; CRUMP, D. H.; MULLEN, L. A. Parasitic fungi, soil-moisture and multiplication of the cereal cyst nematode, *Heterodera avenae*.

**Nematologica**, Leiden, v. 26, n. 1, p. 57-68, 1980.

KLOEPPER, J. W. et al. Plant root-bacterial associations in biological control of soilborne diseases and potential extension to systemic and foliar diseases.

**Australasian Plant Pathology**, v. 28, n. 1, p. 21-26, 1999.

KOK, C. J.; PAPERT, A.; HOK-A-HIM, C. H. Microflora of *Meloidogyne* egg masses: species composition, population density and effect on the biocontrol agent *Verticillium chlamydosporium* (Goddard). **Nematologica**, Leiden, v. 3, n. 8, p. 729-734, 2001.

LATCH, G. C. M. Physiological interactions of endophytic fungi and their hosts: biotic stress tolerance imparted to grasses by endophytes. **Agriculture, Ecosystems & Environments**, Amsterdam, v. 44, n. 1/4, p. 143-156, Mar. 1993.

LEFT, J.W.; FIERER, N. Volatile organic compound (VOC) emissions from soil and litter samples. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 40, n.7, p. 1629-1636, July 2008.

MANGENOT, F.; DIEM, H. G. Fundamentals of biological control. In: KRUPA, S.V.; DOMMERGUES, Y. R. **Ecology of root pathogens**. Amsterdam: Elsevier, 1979. p. 207-265.

MANKAU, R.; IMBRAINI, J. L. The life cycle of an endoparasite in some tylenchid nematodes. **Nematologica**, Leiden, v. 21, n. 1, p. 89-94, 1975.

MATEILLE, T.; DUPONNOIS, R.; DIOP, M. T. Influence of abiotic soil factors and the host plant on the infection of phytoparasitic nematodes of the genus *Meloidogyne* by the actinomycete parasitoid *Pasteuria penetrans*. **Agronomie**, Paris, v. 15, p. 581-591, 1995.

MAUCLINE, T. H.; KERRY, B. R.; HIRSCH, P. R. The biocontrol fungus *Pochonia chlamydosporia* shows nematode host preference at the intra-specific level. **Mycological Research**, Cambridge, v. 108, n. 2, p. 161-169, Feb. 2004.

MAXIMINIANO, C.; CAMPOS, V. P.; SOUZA, R. M. de. Efeito de solo argiloso e substratos orgânico e mineral na adesão de endósporos de *Pasteuria penetrans*. **Nematologia Brasileira**, Campinas, v. 25, n. 1, p. 15-20, jun. 2001.

MAZZOLA, M.; GU, Y. H. Impact of wheat cultivation on microbial communities from replant soils and apple growth in greenhouse trials. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 90, n. 2, p. 114-119, Feb. 2000.

MAZZOLA, M. Manipulation of rhizosphere bacterial communities to induce suppressive soils. **Journal of Nematology**, College Park, v. 39, n. 3, p. 213-220, Sept. 2007.

MEYER, S. L. F.; ROBERTS, D. P. Combinations of biocontrol agents for management of plant-parasitic nematodes and soilborne plant-pathogenic fungi. **Journal of Nematology**, College Park, v. 34, n. 1, p. 1-8, Mar. 2002.

MIZOBUTZI, E. H. et al. Isolamento de fungos de ovos de *Heterodera glycines* coletados em diferentes regiões produtoras de soja no Brasil. **Nematologia Brasileira**, Campinas, v. 23, n. 2, p. 69-75, dez. 1999.

MONFORT, E. et al. In vitro soil receptivity assays to egg-parasitic nematophagous fungi. **Mycological Progress**, Berlin, v. 5, n. 1, p. 18-23, Mar. 2006.

NAZARENO, G. G. **Utilização de matéria orgânica no controle de nematoides das galhas em alface sob cultivo protegido**. 2009. 59 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade de Brasília, Brasília, 2009.

NEHL, D. B.; BROWN, J. F. Deleterious rhizosphere bacteria: an integrating perspective. **Applied Soil Ecology**, Oxford, v. 5, n. 1, p. 1-20, Jan. 1996.

NITAO, J. K.; MEYER, S. L. F.; CHITWOOD, D. J. In vitro assays of *Meloidogyne incognita* and *Heterodera glycines* for detection of nematode-antagonistic fungal compounds. **Journal of Nematology**, College Park, v. 31, n. 2, p. 172-183, June 1999.

OLIVEIRA, R. D. L.; FERRAZ, S.; DIAS-ARIEIRA, C. R. Eficácia de isolados de *Arthrobotrys* spp. no controle de *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* e *Heterodera glycines*. **Nematologia Brasileira**, Campinas, v. 26, n. 1, p. 49-57, jun. 2002.

OOSTENDORP, M.; DICKSON, D. W.; MITCHELL, D. J. Host range and ecology of isolates of *Pasteuria* spp. from the southeastern United States. **Journal of Nematology**, College Park, v. 22, n. 4, p. 525-531, Oct. 1990.

OOSTENDORP, M.; SIKORA, R. A. In vitro interrelationship between rhizosphere bacteria and *Heterodera schachtii*. **Revue de Nématologie**, Bondy, v. 13, n. 3, p. 269-274, 1990.

POCASANGRE, L. et al. Encuesta sobre los hongos endofíticos del banano de América Central y el cribado para el control biológico del nematodo barrenador (*Radopholus similis*). **InfoMusa**, Montpellier, v.9, n.1, p. 3-5, juin. 2000.

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

PROT, J. L.; GUNDY, S. D. van. Effect of soil texture and the clay component on immigration of *Meloidogyne incognita* second-stage juveniles. **Journal of Nematology**, College Park, v. 13, n. 2, p. 213-216, Apr. 1981.

RAO, M. S. et al. Relationship of *Pasteuria penetrans* spore encumbrance on juveniles of *Meloidogyne incognita* and their infection in adults. **Nematologia Mediterranea**, Bari, v. 25, n. 1, p. 129-131, 1997.

RIGA, E. et al. *Pratylenchus neglectus*, *P. thornei*, and *Paratylenchus hamatus* nematodes causing yield reduction to dryland peas and lentils in Idaho. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 92, n. 6, p. 36-54, June 2008.

RIME, D. et al. Comparison of sandy soils suppressive or conducive to ectoparasitic nematode damage on sugarcane. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 93, n. 11, p. 1437-1444, Nov. 2003.

RODRIGUES, F. A. et al. Efeito do silicato de cálcio e da autoclavagem na supressividade e na condutividade de dois solos à *Rhizoctonia solani*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 8, p.1367-1371, ago. 1999.

RODRÍGUES-KABANA, R.; CALVET, C. Capacidad del suelo para controlar enfermedades de origen edáfica. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 19, p. 129-138, 1994.

SAYRE, R. M.; STARR, M. P. Bacterial disease and antagonism of nematodes. In: POINAR, G. O.; JANSSON, H. B. **Diseases of nematodes**. Boca Raton: CRC Press, 1988a. v. 1, p. 69-101.

SAYRE, R. M.; STARR, M. P. Genus *Pasteuria* Metchnikoff. In: WILLIAMS, S. T.; SHARPE, M. E.; HOLT, J. G. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: W. Wilkins, 1988. p. 2601-2615, 1988b.

SAYRE, R. M.; WERGIN, W. P. Bacterial parasite of a plant nematode: morphology and ultrastructure. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 129, n. 2, p. 1091-1101, Feb. 1977.

SHARMA, R. D.; LORDELLO, R. R. A. Occurrence of *Pasteuria penetrans* in coffee plantations infested by *Meloidogyne exigua* in the state of São Paulo. In: CONGRESSOS BRASILEIROS DE FITOPATOLOGIA, 25., 1992, Gramado. **Resumos...** Brasília: SBS, 1992. p. 183.

SIDDIQUI, I. A. et al. Suppression of *Meloidogyne javanica* by *Pseudomonas aeruginosa* IE-6S(+) in tomato: the influence of NaCl, oxygen and iron levels. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 35, n. 12, p. 1625-1634, Dec. 2003.

SIDDIQUI, Z. A.; MAHMOOD, I. Effect of a plant growth promoting bacterium, an AM fungus and soil types on the morphometrics and reproduction of *Meloidogyne javanica* on tomato. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 8, n. 1/3, p. 77-84, May 1998

SIKORA, R. A. Interrelationship between plant health promoting rhizobacteria, plant parasitic nematodes and soil microorganisms. **Medicine Faculty Landbouww**, v. 53, p. 867-878, 1988.

SOARES, P. L. M. et al. Controle biológico de *Meloidogyne incognita* e *Rotylenchulus reniformis* na cultura da alfaca em ambiente protegido. **Nematologia Brasileira**, Campinas, v. 29, n. 1, p. 112-116, jun. 2005.

SOUZA, R. M. et al. Manejo do nematoide das galhas da goiabeira em São João da Barra (RJ) e relato de novos hospedeiros. **Nematologia Brasileira**, Campinas, v. 30, n. 2, p. 165-169, ago. 2006.

STIRLING, G. R. Biological control of *Meloidogyne javanica* with *Bacillus penetrans* **Phytopathology**, Saint Paul, v. 74, n. 1, p. 55-60, Jan. 1984.

STIRLING, G. R. **Biological control of plant parasitic nematodes**: progress, problems and prospects. Wallingford: CABI, 1991. 282 p.

STIRLING, G. R.; BIRD, A. F.; CAKURS, A. B. Attachment of *Pasteuria penetrans* spores to the cuticles of root-knot nematodes. **Revue de Nématologie**, Bondy, v. 9, n. 3, p. 251-260, 1986.

STOLF, E. C.; POCASANGRE, L. E.; GUERRA, M. P. Efeito de re-inoculaciones de fungos endofíticos sobre o controle do nematoide cavernicola da bananeira (*Radopholus similis*). In: REUNIÃO INTERNACIONAL ACORBAT, 17., 2006, Joinville. **Anais...** Joinville: ACORBART, 2006. p. 393.

STROBEL, N. E.; HUSSEY, R. S.; RONCADORI, R.W. Interaction of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi, *Meloidogyne incognita*, and soil fertility on peach. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 72, n. 6, p. 690-694, June 1982.

SULTANA, V.; ARA, J.; EHTESHAMUL-HAQUE, S. Suppression of root rotting fungi and root knot nematode of chili by seaweed and *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 156, n. 7/8, p. 390-395, Aug. 2008.

SUN, M. H. et al. Fungi and actinomycetes associated with *Meloidogyne* spp. eggs and females in China and their biocontrol potential. **Journal Invertebrate Pathology**, San Diego, 93, n. 1, p. 22-28, Sept. 2006.

TAMIMI, K. M.; HUTCHINSON, S. A. Differences between the biological effects of culture gases from several species of trichoderma. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v. 64, n. 3 p. 455-463, 1975.

THORNE, G. *Duboscqia penetrans*, n. sp. (*Sporozoa*, *Microsporidia*, *Nosematidae*), a parasite of the nematode *Pratylenchus pratensis* (deMan) Filipjev. **Proceeding of the Helminthological Society**, Washington, v. 7, n. 1 p. 51-53, 1940.

VERDEJO-LUCAS, S. et al. Evaluating *Pochonia chlamydosporia* in a double-cropping system of lettuce and tomato in plastic houses infested with *Meloidogyne javanica*. **Plant Pathology**, New York, v. 52, n. 4, p. 521-528, Aug. 2003.

VERDEJO-LUCAS, S. C. et al. Species of root-knot nematodes and fungal eggs parasites recovered from vegetable in Almeria and Barcelona, Spain. **Journal of Nematology**, College Park, v. 34, n. 4, p. 405-408, Dec. 2002.

VU, T.T.; SIKORA, R. A.; GAUSCHILD, R. Effects of endophytic *Fusarium oxysporum* towards *Radopholus similis* activity in absence of banana.

**Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences, Ghent University**, v. 69, n. 3, p. 381-385, 2004.

WANG, K. H.; SIPES, B. S.; SCHMITT, D. P. Enhancement of *Rotylenchulus reniformis* suppressiveness by *Crotalaria juncea* amendment in pineapple soils.

**Agriculture Ecosystems & Environment**, Amsterdam, v. 94, n. 2, p. 197-203, Feb. 2003.

WEIBELZAHN-FULTON, E.; DICKSON, D. W.; WHITTY, E. B. Suppression of *Meloidogyne incognita* and *M. javanica* by *Pasteuria penetrans* in field soil.

**Journal of Nematology**, College Park, v. 28, n. 1, p. 43-49, Mar. 1996.

WELLER, D. M. et al. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 40, p. 309-348, Sept. 2002.

ZOU, C. S. et al. Possible contributions of volatile-producing bacteria to soil fungistasis. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 39, n. 9, p. 2371-2379, Sept. 2007.

## CAPÍTULO 2

### **Fatores de supressividade a *M. exigua* na rizosfera cafeeira no campo: nova e simples técnica para avaliação de compostos orgânicos voláteis tóxicos a fitonematoides**

#### **RESUMO**

A supressividade de populações de fitonematoides envolve diversos fatores que precisam ser avaliados por métodos confiáveis e que possam definir a necessidade ou não de uso de nematicidas em lavouras infestadas por fitonematoides. A supressividade causada pela microbiota do solo tem como um de seus componentes a produção de compostos orgânicos voláteis (COV), cuja avaliação nos solos pode refletir o efeito de sua microbiota. Para isso, realizou-se o estudo de diversos aspectos da supressividade de *M. exigua* em 17 fazendas cafeeiras do Sul de Minas Gerais. Entre eles, consta o desenvolvimento de nova técnica para avaliação de COV nos solos, tóxicos a *M. exigua*. Solos de cafezais infestados por *M. exigua* foram colocados em frascos SUPELCO<sup>®</sup>, sendo a umidade ajustada para 80% da capacidade de campo e um tubo eppendorf de 1,5ml de capacidade, vedado foi enterrado parcialmente. Após períodos de tempo (3, 6 e 12 dias), uma suspensão de juvenis de segundo estágio (J2) de *M. incognita* foi infetada no tubo eppendorf e, 24 horas depois, os J2 mortos e vivos foram avaliados. O maior período de vedação dos tubos produziu mais COVs tóxicos a J2. Entretanto, no sexto dia, dos 17 solos avaliados, 12 não tinham produzido COVs e nos demais, verificou-se a ocorrência de COVs em níveis muito altos (5, 6 e 12) e alto (7 e 9). Além da avaliação das COVs, critérios adicionais podem auxiliar na decisão sobre ocorrência da supressividade. Por exemplo, em quatro dessas fazendas cafeeiras infestadas por *M. exigua*, constatou-se a presença de *Pasteuria penetrans*, com variações entre o número de J2 com endósporos de *P. penetrans* e porcentagem de J2 parasitados por 15 ou mais endósporos. A eclosão de J2 a partir de ovos de *M. exigua* foi sempre baixa (menos de 30% dos ovos) na maioria das fazendas amostradas. Nas fazendas, o teor de matéria orgânica, argila e textura foi variável. Em quatro solos amostrados (9, 15, 16 e 17), o número de J2 por 100cc de solo foi significativamente maior que nos demais. A porcentagem de ovos apresentando estruturas fúngicas foi alta, variando de 46% a 83%. O número de J2 no solo correlacionou-se positivamente (0,581,  $p \leq 0,05$ ) com a porcentagem de eclosão de J2. O número de J2 no solo correlacionou-se negativamente com o teor de

argila (-0,64,  $p \leq 0,05$ ) e com a matéria orgânica (-0,25,  $p \leq 0,05$ ). A técnica desenvolvida poderá discriminar solos quanto à velocidade de produção de COV pela sua microflora. Os demais aspectos de supressividade podem auxiliar a supressividade a *M. Exigua*, ou, isoladamente, constituir seus fatores.

Palavras-chave: Supressividade. *M. exigua*. Cafeeiro. Voláteis.

## ABSTRACT

The suppressiveness of plant-parasitic nematode populations involve several factors, which needs to be evaluated by reliable methods in order to help farmers decide on the need of applying nematicides in infested areas by plant-parasitic nematodes. The suppressiveness caused by soil microbiota has a component which is the production of volatile organic compounds (VOC) which evaluation in soil may reflect the microbiota effect. Then a study was done by searching for different aspects the *M. exigua* suppressiveness in seventeen coffee farms of South region of Minas Gerais state, Brazil. To accomplish that a technique was developed to evaluate soil VOCs toxics to *M. exigua*. Coffee soils infested by *M. exigua* were placed within SUPELCO flasks, and humidity was adjusted to 80% of field capacity and buried partially, an eppendorf tube of 1,5mL and hermetically sealed. After periods of time (3, 6 and 12 days) a second-stage juveniles (J2) suspension of *M. incognita* was infected by hypodermic injection needle into the eppendorf tube inside the SUPELCO flasks and 24 hours later was evaluated dead and alive J2. The longer sealed flasks periods the greater was the production of VOCs toxic to J2 by the soil. However, at 6 days, of the 17 soils evaluated 12 of them produced any VOCs but the remaining five produced high VOC levels toxic to J2. Additional criteria besides VOCs may be useful on the decision about suppressiveness incidence. For example, of the infested coffee farms by *M. exigua*, hier studied, four had the presence of *Pasteuria penetrans* with variations on the number of J2 with endospores and percentage of J2 parasitized with 15 or more endospores per J2. J2 hatching from the *M. exigua* eggs was always low (less than 30% of the eggs) in most of the 17 sampled farms. The clay and organic matter levels in those farms soil besides soil texture were avariable. The number of J2 per 100cc of soil, in four farms sampled soil (9, 15, 16 and 17) was significantly greater than the others (13 soils). The percentage of eggs showing fungus structures adhered to the eggs was high, varying from 46% to 83%. The number of J2 in the soil correlated positively (0,581;  $p \leq 0,05$ ) with the hatching percentage. The number of soil J2 correlated negatively with clay level (-0,64;  $p \leq 0,05$ ) and with organic matter (-0,25;  $p \leq 0,05$ ). The new technique will be able to separate soils with different capacity of VOCs production by theirs microflora. The other aspects of suppressiveness, hier evaluated, may be an additional suppressiveness factors or become major isolated factor on the *M. exigua* suppressiveness in the coffee farms.

Keywords: Suppressiveness. *Meloidogyne exigua*. Coffee tree. Volatiles.

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de café e a região do Sul de Minas - localizada no estado de Minas Gerais -- produz 66% de todo o café arábica brasileiro (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2009). No entanto, nessa mesma região, 22% dos cafezais estão infestados por *M. exigua* (CASTRO et al., 2008). A perenidade da cultura e a longa convivência da lavoura cafeeira com *M. exigua* criam condições para a seleção e a manutenção de antagonistas desse nematoide. Dessa forma, não é tão raro encontrar população baixa de *M. exigua* em fazendas cafeeiras (comunicação pessoal de Vicente Paulo Campos). A supressividade a outros patossistemas já foi constatada, ainda que a supressividade aos fitonematoides na rizosfera cafeeira ainda não tenha sido verificada (FREITAS, 1997; KERRY; CRUMP; MULLEN, 1980; OLATINWO; BECKER; BORNEMAN, 2006). A supressividade aos fitonematoides tem sido atribuída a predadores e parasitas do inóculo infectivo (ovos, fêmeas e juvenis) (BOURNE; KERRY; LEIJ, 1996; CAMPOS; CAMPOS, 1997; CAMPOS; SOUZA; SOUZA, 1998; KERRY, 1984; MAUCLINE; KERRY; HIRSCH, 2004; MONFORT et al., 2006; VERDEJO-LUCAS et al., 2002, 2003; VIAENE; ABAWI, 2000). Além de tais antagonistas, tem-se observado que fungos endofíticos (micorrizas) e formas não patogênicas de *Fusarium oxysporum* estão envolvidos na supressividade de populações de nematoides e na indução de crescimento da planta hospedeira (HUSSEY; RONCADORI, 1982; JAIZME-VEJA; PINOCHET, 1997; SIKORA et al., 2008). Contudo, a supressividade pode envolver também vários fatores abióticos como teor de matéria orgânica, textura do solo e pH, entre outros (BETTIOL; GHINI, 2001), sendo que um ou mais desses fatores podem estar envolvido no mesmo campo (WELLER et al., 2002). O efeito aditivo desses fatores em um mesmo solo pode aumentar o nível de supressividade.

Ainda não há definição quanto aos níveis de supressividade de populações de nematoides no campo.

Determinar a incidência desses fatores de supressividade no campo interessa ao produtor rural, pois evitará o uso desnecessário de nematicidas em solos supressivos. A bactéria *Pasteuria penetrans* tem sido considerada, isoladamente, fator de supressividade de *Meloidogyne incognita*, *M. arenaria* e *M. javanica* nas culturas de fumo, centeio, ervilha, amendoim, tomate e soja (BIRD; BRISBANE, 1988; CHANNER; GOWEN, 1988; MINTON; SAYRE, 1989; OOSTENDORP; DICKSON; MITCHELL, 1991; SHARMA; VIVALDI, 1999).

A microflora (fungos e bactérias) rizosférica e da superfície do inóculo (ovos e fêmeas) abundante e concentrada localmente (massa de ovos e sítios de alimentação) pode produzir compostos resultantes do seu crescimento e afetar o desenvolvimento do embrião e, conseqüentemente, sua eclosão. Moléculas solúveis em água, produzidas por fungos, bactérias endofíticas e rizobactérias crescidas artificialmente em meio de cultura têm demonstrado efeitos tóxicos a *Meloidogyne* spp. (AMARAL et al., 2009; CAMPOS; PINHO; FREIRE, 2010). Dessa forma, a análise da eclosão de juvenis de segundo estágio (J2) de ovos de *Meloidogyne* sp. pode indicar a supressividade em solos. Por outro lado, a presença de microflora diversificada não garante antagonismo se seus componentes não produzirem moléculas tóxicas ao fitonematoide alvo. Nos últimos anos, tem-se buscado avaliar outro grupo de moléculas – as voláteis – que passaram despercebidas devido à metodologia usada na análise de filtrados de culturas fúngicas e bacterianas (CAMPOS; PINHO; FREIRE, 2010). Alguns compostos orgânicos voláteis (COVs) demonstraram toxicidade aos fitonematoides (CAMPOS; PINHO; FREIRE, 2010; GU et al., 2007; ZOU et al., 2007). Entretanto, existe a possibilidade de se empregar a análise da toxicidade de compostos orgânicos voláteis ao fitonematoide alvo em substituição à

quantificação da microflora pelo método de plaqueamento (KLOEPPER et al., 1991), que é laborioso e demorado. Mas a técnica de análise de COVs precisa ser eficaz e de uso fácil. Dessa forma, objetivou-se neste trabalho: 1) caracterizar fatores de supressividade a *M. exigua* em diversas fazendas comerciais produtoras de café; 2) determinar o efeito dos COVs de solos cultivados com café em J2 de *M. incognita*; 3) desenvolver uma nova técnica mais simples e que possa definir níveis de COVs nos solos cafeeiros.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Amostragem

Foram amostrados solos de cafezais infestados por *Meloidogyne exigua* em 17 propriedades comercialmente produtoras de café na região do Sul de Minas, no estado de Minas Gerais. As amostras compostas de dois quilos de solo rizosférico e 500 gramas de raízes finas galhadas foram coletadas na projeção da copa da planta, na profundidade de 0 a 20 cm e estocadas a 8 – 10 °C por três dias e então utilizadas nos ensaios.

### 2.2 Voláteis em solo

Desenvolveu-se uma técnica para avaliar voláteis tóxicos aos juvenis de segundo estágio (J2) de *M. incognita* em solos de 17 fazendas cafeeiras amostradas e infestadas por *M. exigua*. Foi utilizado *M. incognita* devido à falta de inóculo de *M. exigua*. Essa técnica empregou frascos de 80 x 28 mm (39 ml de volume interno) SUPELCO™SPME com tampa rosqueada metálica, revestida internamente por uma película em silicone ligando a tampa metálica ao frasco, garantindo total vedação total (Figura 1 A e C). A parte superior do centro da tampa metálica deixa exposta a película de silicone (Figura 1C).

De cada amostra de solo das 17 fazendas cafeeiras, foram obtidas três amostras (repetições) de 25 gramas. Cada frasco recebeu 25 gramas de solo e a umidade foi ajustada para 80% da capacidade de campo. Para o controle, foram utilizadas 25g de areia fina, sem matéria orgânica. Um tubo eppendorf de 1,5 mL foi colocado na superfície superior, logo após inserido até à metade no solo ou areia (controle) (Figura 1D). Então, colocou-se a tampa com a película de silicone, vedando totalmente o frasco (Figura 1E). A seguir, os frascos com solo,

ou areia (Figura 1E) foram incubados a 28°C por 3, 6, ou 12 dias. Ao final de cada período, preparou-se uma suspensão de J2 de *M. incognita* em água na concentração de 500 J2 por mL. Com uma seringa (volume interno de 5 ml), obteve-se 1 mL da suspensão de J2 (500) (Figura 1F) e a película de silicone foi perfurada na sua parte exposta, para então se injetar 1 ml de J2 dentro do tubo eppendorf (Figura 1G). Retirou-se a seringa e com uma fita adesiva vedou-se o local perfurado (Figura 1G). Os frascos foram colocados a 28°C por 24 horas e depois abertos. A suspensão de J2 de cada tubo eppendorf foi transferida para os orifícios de placa Elisa e o número de J2 móveis e imóveis foi contado. A seguir, os J2 imersos? numa solução de NaOH 0,1M, conforme técnica descrita por Chen e Dickson (2000). Ao entrar em contato com NaOH, os J2 sem movimento foram considerados mortos.

A atividade nematicida (AN) foi calculada pela fórmula:  $AN = IN / SN \times 100$ , em que IN representa o número de J2 mortos e SN o número total de J2 estimado.

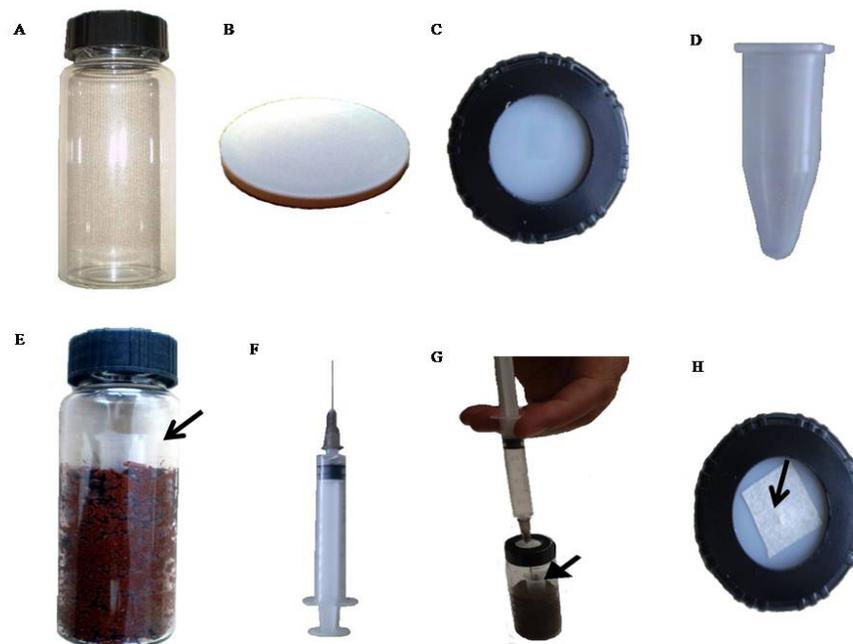


Figura 1 Material usado na avaliação de voláteis em solos agrícolas. A) frascos Supelco<sup>TM</sup>SPME; B) película de silicone; C) tampa metálica expondo, no topo, a película de silicone; D) tubos eppendorf; E) frasco com solo e J2, pronto para o bioteste de voláteis de solo tóxicos; F) seringa para injeção da suspensão de juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita*; G) selagem com fita adesiva do orifício de perfuração do silicone pela seringa; H) injeção da suspensão de juvenis de segundo estágio (J2)

### 2.3 Extração de ovos de raízes e de juvenis de segundo estágio (J2) de solo e quantificação de J2 com e sem *Pasteuria penetrans*

Foram feitas 5 amostragens nos meses de agosto de 2009, abril, maio junho e julho de 2010. Raízes finas e gahadas foram cortadas em pedaços de 0,5cm de comprimento e os ovos foram extraídos conforme a técnica de Hussey e Barker (1973).

O solo rizosférico de cada um dos 17 cafezais amostrados foi peneirado (peneira de 4mm), eliminando-se as raízes e os detritos e dele foram extraídas quatro amostras contendo 300 cc cada. De cada amostra, foram obtidas três subamostras de 100cc e das quais foram extraídos os J2, através da técnica de Jenkins (1964). Os nematoides obtidos das 3 subamostras foram reunidos em uma única suspensão em água. Os J2 foram contados em microscópio óptico, de objetivas invertidas e o número total foi dividido por 3, expressando-se, então, o número de J2 por 100cc de solo. Calculou-se a média dos resultados obtidos nas 5 amostragens feitas no campo.

Nas amostras contendo a bactéria *P. penetrans* (Figura 2), quantificou-se também o número de J2 com endósporos de *P. penetrans*, o número de endósporos por J2 e o número total de endósporos nos J2 parasitados. No entanto, os endósporos presentes na superfície oposta à dos J2 não foram estimados. A partir dos valores quantificados, calculou-se a porcentagem de J2 com endósporos, a média de endósporos por J2 parasitados e a porcentagem de J2 com 15 ou mais endósporos (dentre os J2 parasitados), observados na face superior.

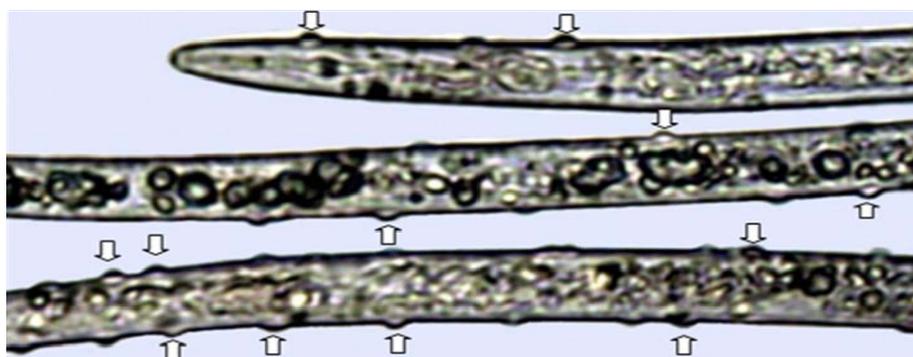


Figura 2 Juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne exigua* na rizosfera cafeeira de plantações do Sul de Minas, MG, infestados por *Pasteuria penetrans* (setas)

## 2.4 Eclosão de J2

Mil ovos de *M. exigua* extraídos de cada uma das 17 fazendas cafeeiras foram colocados em uma câmara de eclosão preparada em placa de Petri. Para tanto, foram utilizadas placas de Petri de 6 cm, nas quais foram imersos em água suportes plásticos circulares com telas de nylon de 0,35mm, presas ao suporte de modo a permitir a postura dos ovos de *M. exigua* em seu interior. A malha da tela não permite a passagem de ovos, porém permite a passagem dos J2 eclodidos. Os J2 eclodidos foram descartados nas primeiras 24 horas. A partir de então e durante os próximos 20 dias, o número de J2 eclodidos foi estimado diariamente foi estimado. A água da câmara de eclosão também foi trocada diariamente..

Para cada fazenda amostrada, foram preparadas 4 câmaras de eclosão (repetições) e foram feitas três amostragens (maio e junho de 2009 e julho de 2010). As câmaras de eclosão com os ovos foram colocadas em BOD, a 28°C. A cada 24 horas, recolhiam-se e contavam-se os J2 produzidos, renovando-se a água da suspensão de ovos. Calculou-se a porcentagem de J2 eclodidos durante os 20 dias de incubação dos ovos.

## 2.5 Ovos infestados por fungos

Logo após a extração dos ovos das raízes galhadas de *M. exigua*, 100 ovos foram escolhidos ao acaso no microscópio óptico de objetiva invertida, quando se observou a presença ou a ausência de estruturas fúngicas aderidas ao ovo, internamente, ou externamente. Foram feitas três contagens, tendo sido calculada, então, a média que representou a infestação fúngica nas amostras.

## 2.6 Matéria orgânica, textura e porcentagem de argila

Cerca de 400g de solo de cada amostra foram empregados para essas análises. Utilizou-se o método de colorimetria do IAC na avaliação do teor de matéria orgânica, utilizando para oxidação  $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  4N+  $\text{H}_2\text{SO}_4$  10N conforme técnica descrita por Walkley e Black (1934). O teor de argila e a textura dos solos foram caracterizados pelo método do densímetro Bouyoucos (1926).

## 2.7 Delineamento experimental

Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC) nos ensaios *in vitro*, com voláteis J2 no solo e infestação fúngica dos ovos em quatro repetições.

## 2.8 Análises estatísticas dos dados

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) ao nível de 5% de significância. As análises de correlação foram feitas através do programa Excel.

A atividade nematicida (AN) dos compostos voláteis dos solos analisados foi calculada como médias de quatro repetições. As categorias de compostos orgânicos voláteis (COVs) nos solos foram definidas através do agrupamento de médias pelo teste de Scott e Knott (1974) a 5% de probabilidade, definindo: 3 dias  $0 \leq \text{AN} \leq 4,3$  (I),  $\text{AN} = 34,3$  (II), em que I indica sem AN, II moderada AN; 6 dias  $0,6 \leq \text{AN} \leq 19,0$  (I),  $46,6 \leq \text{AN} \leq 58,6$  (II) e  $95,6 \leq \text{AN} \leq 99,3$  (III), em que I indica sem AN, II moderada AN e III alta AN; 12 dias  $\text{AN} = 22,3$  (I),  $\text{AN} = 89,4$  (II),  $93,4 \leq \text{AN} \leq 94,9$  (III),  $95,8 \leq \text{AN}$

$\leq 99,5$  (IV), em que I indica sem AN, II moderada AN, III alta AN, IV muito alta AN).

### 3 RESULTADOS

Uma técnica nova e simples -- desenvolvida para a análise de compostos orgânicos voláteis (COV) tóxicos a fitonematoides em solos -- possibilitou a detecção de COV nos três períodos de tempo estudados. A concentração dos COVs por três dias foi moderadamente tóxica (II) a J2 de *M. exigua* apenas no solo 6 e sem atividade nematicida (AN) nos demais. No sexto dia, a concentração tóxica da AN foi muito alta em 3 solos (5, 6 e 12), alta em dois solos (7 e 9) e sem efeito tóxico a juvenil de segundo estágio (J2) nos demais solos. Já aos 12 dias, a concentração tóxica da AN a J2 foi sempre superior a 89,4% (Tabela 1).

Houve incidência de *Pasteuria penetrans* em J2 de *M. exigua* em quatro fazendas cafeeiras do município de Capetinga, região do Sul do estado de Minas Gerais. O número de J2 com endósporos de *P. penetrans*, o número médio de endósporos por J2 e a porcentagem de J2 parasitado por 15 ou mais endósporos foi de 4 a 100%, de 2 a 39% e de 0 a 50%, respectivamente. O total de endósporos por J2 parasitados por *P. penetrans* decresceu em junho e julho em relação à amostragem de maio (Tabela 2).

Tabela 1 Atividade nematicida de voláteis produzidos a partir de solos infestados por *Meloidogyne exigua*, tóxicos a juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita* em 17 propriedades cafeeiras do Sul de Minas, estado de Minas Gerais

Propriedades cafeeiras número	Atividade nematicida (AN): mortalidade de J2 (%) nos períodos de exposição aos voláteis (dias)					
	3		6		12	
14	0,7	I	0,6	I	98,8	IV
15	2,1	I	1,0	I	99,5	IV
16	4,3	I	2,6	I	98,1	IV
13	1,8	I	3,3	I	97,0	IV
11	0,0	I	3,6	I	97,8	IV
10*	0,9	I	5,3	I	98,1	IV
4	4,2	I	5,6	I	89,4	II
1*	4,1	I	8,3	I	96,3	IV
8	2,8	I	10,0	I	97,8	IV
17	0,8	I	10,6	I	99,3	IV
3	0,0	I	15,0	I	96,8	IV
2	2,6	I	19,0	I	94,1	III
7	2,4	I	46,6	II	95,8	IV
9	3,3	I	58,6	II	98,4	IV
5*	4,3	I	95,6	III	94,9	III
6*	34,3	II	96,0	III	93,4	III
12	2,5	I	99,3	III	98,4	IV

Exposição aos COVs dos solos: I = sem AN, II = média alta AN, III = alta AN, IV = muito alta NA. Testemunhas – mortalidade de J2: aos 3 dias = 2,3%; 6 dias = 0,6%; 12 dias = 22,1%. \* Indicam as fazendas cafeeiras com incidência de *Pasteuria penetrans*

Tabela 2 Epidemiologia de *Pasteuria penetrans* em juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne exigua* em quatro propriedades cafeeiras do município de Capetinga, região Sul do estado de Minas Gerais

Lavouras cafeiras	Data de coleta de amostra	J2 com <i>Pasteuria</i> (%)	Nº de endósporos por J2 parasitado	J2 parasitados por 15 ou mais endósporos (%)	Total do endósporos nos J2 parasitados	J2 com 15 ou mais endósporos em relação ao total de J2 no solo (%)
5	Maio	66	21	33	432	21,78
	Junho	11	39	1	90	0,11
	Julho	35	9	9	216	3,15
	Média	37	23	14	246	8,35
1	Maio	31	9	8	118	2,48
	Junho	25	4	2	46	0,50
	Julho	4	2	0	4	0,00
	Média	20	5	3	56	0,99
6	Maio	60	8	14	352	8,40
	Junho	55	10	12	118	6,60
	Julho	25	4	0	37	0,00
	Média	47	7	9	169	10,53
10	Maio	88	5	5	114	4,40
	Junho	100	14	50	56	50,00
	Julho	55	5	3	115	1,65
	Média	81	8	19	95	18,68

Nos períodos estudados, a eclosão de J2 a partir de ovos de *M. exigua* foi sempre baixa (menos de 30%) na maioria dos 17 solos amostrados (Gráfico 1).

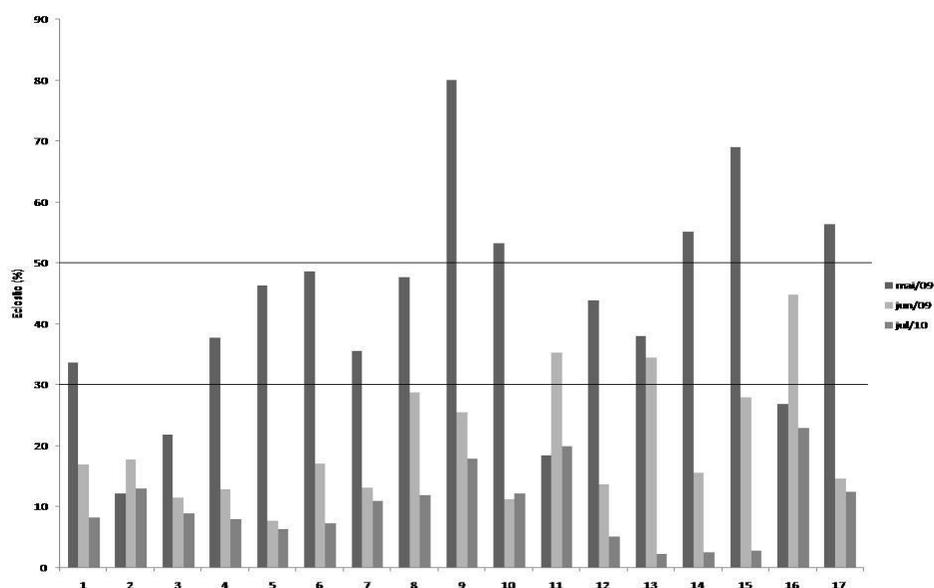


Gráfico 1 Eclosão de juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne exigua* em amostras de cafezais infestados por *M. exigua* em propriedades do Sul de Minas Gerais

O teor de matéria orgânica (MO) e a porcentagem de argila variaram de 2,2 a 6,9% e de 14 a 52%, respectivamente. A maioria dos solos estudados tinha textura argilosa (10 solos), um solo de textura arenosa e os demais, textura média (6 solos). Em 4 solos (9, 15, 16 e 17), o número de J2 por 100cc de solo foi significativamente maior do que todos os demais. A porcentagem de ovos que apresentaram estruturas fúngicas foi, em média, de 71,35%, variando de 46% a 83% (Tabela 3).

Tabela 3 Teores de matéria orgânica (MO), textura dos solos, número de J2 e porcentagem de ovos de *Meloidogyne exigua* infestados por fungos de 17 cafezais parasitados por *M. exigua* no Sul do estado de Minas Gerais

Cafezal infestado	MO (dag/Kg)	textura	argila (%)	J2/100cc de solo	% de ovos infestados por fungos
1*	5,8	média	33	33,50 a	70 <sup>ns</sup>
2	3,3	argilosa	42	63,50 a	76
3	4,9	argilosa	40	50,75 a	79
4	3,8	argilosa	42	26,00 a	64
5*	3,0	média	22	60,75 a	63
6*	3,6	argilosa	53	63,00 a	73
7	3,6	argilosa	47	46,50 a	75
8	3,4	argilosa	54	42,25 a	46
9	5,1	argilosa	38	143,00 b	76
10*	4,4	argilosa	52	21,25 a	71
11	3,3	argilosa	41	14,00 a	80
12	6,9	média	20	74,50 a	66
13	4,3	argilosa	46	47,75 a	72
14	4,6	média	33	53,25 a	79
15	2,2	arenosa	14	133,50 b	66
16	2,5	média	18	140,70 b	74
17	3,3	média	21	168,25 b	83

As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott e Knott ao nível de 5% de probabilidade (ns indica não significativo) \* indica as fazendas cafeeiras com incidência de *Pasteuria penetrans*

#### 4 DISCUSSÃO

A nova técnica desenvolvida para avaliação de compostos orgânicos voláteis (COV) tóxicos a *Meloidogyne exigua* possibilita a inserção dos J2 no tubo SUPELCO, onde o gás é formado e armazenado, em qualquer tempo (Figura 1). Já pela técnica da placa bipartida, o organismo teste é colocado no compartimento contíguo à fonte produtora (solo ou cultura de micro-organismo) no momento da vedação da placa (FERNANDO et al., 2005), ou na tampa da placa de mesmo diâmetro do fundo, onde estaria o solo, fonte produtora do gás (XU et al., 2004). Nos biotestes com fitonematoides, o prolongamento do período de vedação (acima de 24 – 48 horas) exauriu o oxigênio, causando a morte do J2, impossibilitando, assim, biotestes em períodos longos de vedação da placa bipartida. Em resumo, a nova técnica permite a detecção de gases tóxicos em períodos diferentes de vedação, possibilitando a estocagem dos gases por períodos mais longos.

A mortalidade diferenciada dos J2 nos diferentes tempos testados indica diferenças na quantidade do gás tóxico produzido pela microflora, além de demonstrar a sensibilidade da nova técnica na sua detecção. A produção de COV por causas não biológicas deveria ter se manifestado no terceiro dia. Porém, como essa produção foi baixa nesse período, mas aumentou com o tempo, essa evolução certamente foi decorrente do crescimento populacional da microflora. Na testemunha (areia), a produção do gás não ocorreu (0 a 22% de mortalidade do J2). Desta forma, a nova técnica é apropriada não só para constatar a produção de gás em solos, mas também cria possibilidade de avançar no sentido da sua quantificação no tempo de estocagem dos gases em diferentes solos agricultáveis. Talvez, no futuro, esta nova técnica possa ser empregada na avaliação de supressividade da microflora a fitonematoides, se os gases tóxicos produzidos constituírem o mecanismo mais relevante da supressividade.

A alta mortalidade de J2 (acima de 89,4%) em todos os solos testados aos 12 dias de estocagem e a 28°C é um indicativo de que estes solos têm uma microflora produtora de COVs tóxicos a *M. exigua*. Porém, testes com solos cultivados com outras culturas precisarão ser feitos para comparação. Na cafeicultura, a parte orgânica do solo aumenta com a queda das folhas e com a própria adição extra pelo produtor ao longo dos anos, já que é uma cultura perene (VIEIRA, 2008). Além disso, o solo não é revolvido ou exposto ao sol como em culturas anuais. Daí, talvez, a microflora seja mais rica e, conseqüentemente, mais eficaz na produção de COVs.

Apesar de o efeito direto dos COVs de solos em fitonematoides ainda não ter sido estudado, pesquisas sobre o efeito em fungos (fungistase) vêm sendo desenvolvidas por alguns pesquisadores (XU et al., 2004; ZOU et al., 2007). Bactérias e fungos isolados de solos têm demonstrado capacidade na produção de COV a nematoides (AL-REHIAYANI et al., 1999; FREIRE et al., 2010; GU et al., 2007; HUANG et al., 2010; NEIPP; BECKER, 1999; RIGA; LACEY; GUERRA, 2008).

Os quatro solos cafeeiros com *Pasteuria penetrans* apresentaram baixa população de J2 no solo, indicando que esta bactéria está reduzindo a população de *M. exigua*. Entretanto, tem sido grande a variação de J2 com *P. penetrans* entre eles, destacando-se sempre o solo da propriedade 10, em que a variação tem sido entre 55% e 100%. Porém ocorreu variação de 0 a 50% dos J2 parasitados por 15 ou mais endósporos nos J2 com *P. penetrans*. Entretanto, os demais J2 infectados (com menos de 15 endósporos) teriam capacidade de penetrar e produziram novos endósporos (DAVIES; KERRY; FLYNN, 1988). Gomes et al. (2002) verificaram que o aumento de endósporos aderidos aos J2 provoca a diminuição da penetração de *M. javanica* em plantas. Quando a média foi de 10 endósporos por J2, houve redução de 50% da penetração nas plantas. Porém, como os J2 parasitados infectarão o cafeeiro (J2 com menos de

15 endósporos), essa nova safra de endósporos teria um custo resultante do decréscimo da produção, resultado do parasitismo no nematoide, cujo prejuízo ao produtor poderia ser compensado pelo maior número de J2 parasitados no próximo ciclo de *M. exigua*. Isto causaria uma flutuação na população de J2 parasitados com diferentes números de endósporos, conforme se verificou neste trabalho (Tabela 2). Portanto, pela porcentagem de J2 parasitados, acredita-se que nos quatro solos com *P. penetrans* (1, 5, 6 e 10) esteja ocorrendo supressividade. Tem-se constatado a supressividade natural de populações de fitonematoides por *P. penetrans* em diferentes culturas (BIRD; BRISBANE, 1988; STIRLING, 1984; WEIBELZAHN-FULTON; DICKSON; WHITTY, 1996). A supressividade também tem sido conseguida por inoculação artificial de *P. penetrans* (FREITAS et al., 2009). Nestes trabalhos, o inóculo empregado tem sido produzido com a inoculação de plantas de tomate com J2 de *M. exigua* parasitados por 6 a 10 endósporos e triturações de raízes (STIRLING; WACHTEL, 1980).

Como a eclosão de J2 tem sido baixa e a porcentagem de ovos parasitados por fungos tem sido alta, sugere-se que a microflora fúngica pode estar causando mortalidade de embriões dentro dos ovos em adição ao efeito deletério das bactérias nas massas de ovos (KOK; PAPERT; HOK-A-HIM, 2001). Campos e Campos (1997) verificaram redução significativa na população de *M. exigua* quando havia parasitismo dos ovos. A obtenção de inóculo de *M. exigua* para uso em pesquisa tem sido mais difícil, se comparada à de outras espécies, como *M. javanica* e *M. incognita*. Dube e Smart (1987) encontraram porcentagem de eclosão de *M. incognita* em até 79%, enquanto Greco e Thomason (1980) verificaram a eclosão de *M. javanica* superior a 70%. Desta forma, a eclosão de J2 expressa a qualidade do inóculo e, por conseguinte, poderá constituir-se também num fator de supressividade. De fato, houve

correlação positiva entre o número de J2 / 100cc de solo e a eclosão (0,58;  $p \leq 0,05$ ).

A população de J2 por 100cc de solo correlacionou-se negativamente (-0,2487;  $p \geq 0,05$ ) com teor de matéria orgânica. Portanto, solos com altos teores de matéria orgânica apresentaram menor população de J2 no solo. A matéria orgânica estimula a microbiota do solo, possivelmente aumentando a produção de compostos tóxicos e a população parasitas e predadores do nematoide (BETTIOL; GHINI, 2001; MAZZOLA, 2007). Wang, Sipes e Schmitt (2003) observaram a redução da população de *Rotylenchulus reniformis* em solos cultivados com abacaxi, após a incorporação de resíduos de crotalária. A matéria orgânica aumentou a população de fungos nematófagos, como também aumentaram os compostos tóxicos a *R. reniformis*.

Dos solos com maior número de J2/100cc de solo, a metade era de solos com textura argilosa e os demais tinham textura média e arenosa, impossibilitando relações entre a textura e o aumento de J2. Entretanto, o teor de argila correlacionou-se negativamente (-0,6446;  $p \leq 0,05$ ) com o número de J2 /100cc de solo. Nesse caso, nos solos com textura argilosa (9) e alta população de J2, o nematoide não teve a incidência de outros fatores de supressividade, como produção de voláteis pela microflora, que foi baixa (Tabela 1) e alta eclosão (Gráfico 1), indicando ineficácia da microflora na qualidade do inóculo, superando o fator textura argilosa, contrário ao aumento populacional. A textura arenosa tem sido um fator relevante para o aumento populacional de fitonematoides no campo, enquanto a textura argilosa é mais restritiva ao aumento rápido da população (CADET; THIOULOUSE, 1998; DABIRÉ et al., 2007; OLABIYI; OLAYIWOLA; OYEDIRAN, 2009; PROT; GUNDY, 1981; SIDDIQUI; MAHMOOD, 1998).

## 5 CONCLUSÕES

A nova técnica permite avaliar o efeito de COVs tóxicos aos fitonematoides em períodos de tempo mais prolongados, pois o nematoide pode ser colocado em qualquer tempo.

*Pasteuria penetrans* reduz a população de J2 no solo das quatro fazendas cafeeiras onde a bactéria está presente.

Quanto maior o teor de argila, menor a população de J2 no solo.

Quanto maior o teor de matéria orgânica, menor a população de J2 no solo.

## REFERÊNCIAS

- AL-REHIAYANI, S. et al. Effects of *Pratylenchus neglectus*, *Bacillus megaterium*, and oil radish or rapeseed manure on reproductive potential of *Meloidogyne chitwoodi* on potato. **Nematropica**, Bradenton, v. 29, n. 1, p. 37-49, 1999.
- AMARAL, D. R. et al. Effect of plant and fungus metabolites on *Meloidogyne exigua*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. spe, p. 1861-1865, 2009.
- BETTIOL, W.; GHINI, R. Solos supressivos. In: MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E. G. T.; MENEZES, M. **Patógenos radiculares em solos tropicais**. Recife: UFPE, 2001. p. 125-152.
- BIRD, A. F.; BRISBANE, P. G. The influence of *Pasteuria penetrans* in field soils on the reproduction of root-knot nematodes. **Revue de Nématologie**, Bondy, v. 11, n. 1, p. 75-81, 1988.
- BOURNE, J. M.; KERRY, B. R.; LEIJ, F. A. A. M. de. The importance of the host plant on the interaction between root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) and the nematophagous fungus, *Verticillium chlamydosporium* Goddard. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 6, n. 4, p. 539-548, Dec. 1996.
- BOUYOUCOS, G. J. Rapid determination of the moisture content of soils. **Soil Science**, Baltimore, v. 24, p. 651- 652, 1926.
- CADET, P.; THIOULOUSE, J. Identification of soil factors that relate to plant parasitic nematode communities on tomato and yam in the French West Indies. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 8, n. 1/3, p. 35-49, May 1998.
- CAMPOS, H. D.; CAMPOS, V. P. Efeito da época e forma de aplicação dos fungos *Arthrobotrys conoides*, *A. musiformis*, *Paecilomyces lilacinus* e *Verticillium chlamydosporium* no controle de *Meloidogyne exigua* do cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 3, p. 361-365, 1997.
- 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, May/June 2010.

CAMPOS, V. P.; SOUZA, J. T.; SOUZA R. M. Controle de fitonematoides por meio de bactérias. In: LUZ, W. C. **Revisão anual de patologia de plantas**. Passo Fundo: [s.n.], 1998. v. 6, p. 285-327.

CASTRO, J. M. C. et al. Levantamento de fitonematoides em cafezais do sul de Minas Gerais. **Nematologia Brasileira**, Campinas, v. 32, n. 1, p. 56-64, mar. 2008.

CHANNER, A. G.; GOWEN, S. R. Preliminary studies on the potential of *Pasteuria penetrans* to control *Meloidogyne* species. In: PROCEEDINGS OF BRIGHTON CROP PROTECTION CONFERENCE, PESTS AND DISEASES, 1988, Surrey. **Proceedings...** Surrey: The British Crop Protection Council, 1988. v. 3, p. 1209-1214.

CHEN, S. Y.; DICKSON, D. W. A technique for determining live second-stage juveniles of *heterodera glycines*. **Journal of Nematology**, College Park, v. 32, n. 1, p. 117-121, Mar. 2000.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da Safra brasileira**: safra 2009: primeira estimativa: janeiro/2009. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/4cafe08.pdf>>. Acesso em: 05 ago. 2010.

DABIRÉ, R. K. et al. Relationships between abiotic soil factors and epidemiology of the biocontrol bacterium *Pasteuria penetrans* in a root-knot nematode *Meloidogyne javanica*-infested field. **Biological Control**, Orlando, 40, n. 1, p. 22-29, Jan. 2007.

DAVIES, K. G.; KERRY, B. R.; FLYNN, C. A. Observations on the pathogenicity of *Pasteuria penetrans*, a parasite of root-knot nematodes. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 112, n. 3, p. 491-501, June 1988.

DUBE, B.; SMART, C. G. Biological control of *Meloidogyne incognita* by *Paecilomyces lilacinus* and *Pasteuria penetrans*. **Journal of Nematology**, College Park, v. 19, n. 2, p. 222-227, Apr. 1987.

FERNANDO, W. G. D. et al. Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 37, n. 5, p. 955-964, May 2005.

FREIRE, E. S. et al. Volatile substances on the antagonism between fungi, bactéria and *Meloidogyne incognita* and potentially fungi for nematode control. **Journal of Nematology**, College Park, 2010. No prelo.

FREITAS, L. G. et al. Controle biológico de nematoides: estudo de casos. In: ZAMBOLIM, L. **Controle biológico: doenças e pragas - exemplos práticos**. Viçosa, MG: UFV, 2009. Disponível em: <[http://www.rizoflora.com.br/arquivos\\_internos/arquivos/manejo\\_integrado.pdf](http://www.rizoflora.com.br/arquivos_internos/arquivos/manejo_integrado.pdf)>. Acesso em: 5 maio 2010.

FREITAS, L. G. **The effects of soil solarization, organic amendment, and fumigant nematicides on *Pasteuria penetrans* and its infectivity to *Meloidogyne arenaria* race 1 in tomato**. 1997. 156 p. Dissertation (Master in Fitopatology) - University of Florida, Gainesville, 1997.

GOMES, C. B. et al. Efeito do número de endósporos de *Pasteuria penetrans* e do método de promoção da adesão sobre a penetração de *Meloidogyne javanica* e produção da bactéria em tomateiro. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 2, p. 119-130, Dec. 2002.

GRECO, N.; THOMASON, I. J. Effect of phenamiphos on *Heterodera schachtii* and *Meloidogyne javanica*. **Journal of Nematology**, College Park, v. 12, n. 2, p. 91- 96, Apr.1980.

GU, Y. Q. et al. Evaluation and identification of potential organic nematicidal volatiles from soil bacteria. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 39, n. 10, p. 2567-2575, Oct. 2007.

HUANG, Y. et al. Characterisation of volatiles produced from *Bacillus megaterium* YFM3.25 and their nematicidal 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 of collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. **Plant Disease Reporter**, Washington, v. 57, p. 1025-1028, 1973.

HUSSEY, R. S.; RONCADORI, R. W. Vesicular arbuscular mycorrhizae may limit nematode activity and improve plant growth. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 66, n. 1, p. 9-14, Jan.1982.

JAIZME-VEJA, M. C.; PINOCHET, J. Growth response of banana to three mycorrhizal fungi in *Pratylenchus goodeyi* infested soil. **Nematropica**, Bradenton, v. 26, n. 1, p. 69-76, 1997.

JENKINS, W. R. A rapid centrifugal – flotation technique for separating nematodes from soil. **Plant Disease Report**, Washington, v. 48, p. 692-695, 1964.

KERRY, B. R.; CRUMP, D. H.; MULLEN, L. A. Parasitic fungi, soil-moisture and multiplication of the cereal cyst nematode, *Heterodera avenae*. **Nematologica**, Leiden, v. 26, n. 1, p. 57-68, 1980.

KERRY, B. R. Nematophagous fungi and the regulation of nematode population in soil. **Helminthological Abstract**, Wallingford, v. 53, p. 1-14, 1984.

KLOEPPER, J. W. et al. Analysis of populations and physiological characterization of microorganisms in the rhizosphere of plant with antagonistic properties to phytopathogenic nematodes. **Plant and Soil**, The Hague, v. 136, n. 2, p. 95-102, Sept. 1991.

KOK, C. J.; PAPERT, A.; HOK-A-HIM, C. H. Microflora of *Meloidogyne* egg masses: species composition, population density and effect on the biocontrol agent *Verticillium chlamydosporium* (Goddard). **Nematologica**, Leiden, v. 3, n. 8, p. 729-734, 2001.

MAUCHLINE, T. H.; KERRY, B. R.; HIRSCH, P. R. The biocontrol fungus *Pochonia chlamydosporia* shows nematode host preference at the intraspecific level. **Mycological Research**, Cambridge, v. 108, n. 2, p. 161-169, Feb. 2004.

MAZZOLA, M. Manipulation of rhizosphere bacterial communities to induce suppressive soils. **Journal of Nematology**, College Park, v. 39, n. 3, p. 213-220, Sept. 2007.

MINTON, N. A.; SAYRE, R. M. Suppressive influence of *Pasteuria penetrans* in Georgia soils on reproduction of *Meloidogyne arenaria*. **Journal of Nematology**, College Park, v. 21, n. 4, p. 574-575, Oct. 1989.

MONFORT, E. et al. In vitro soil receptivity assays to egg-parasitic nematophagous fungi. **Mycological Progress**, Berlin, v. 5, n. 1, p. 18-23, Mar. 2006.

NEIPP, P. W.; BECKER, J. O. Evaluation of biocontrol activity of rhizobacteria from *Beta vulgaris* against *Heterodora schachtii*. **Journal of Nematology**, College Park, v. 31, n. 1, p. 54-61, Mar. 1999.

OLABIYI, T.I.; OLAYIWOLA, A. O.; OYEDIRAN, G. O. Influence of soil textures on distribution of phytonematodes in the South Western Nigeria. **World Journal of Agricultural Sciences**, v. 5, n. 5, p. 557-560, May 2009.

OLATINWO, R.; BECKER, O.; BORNEMAN, J. Suppression of *Heterodera schachtii* by *Dactylella oviparasitica* in four soils. **Journal of Nematology**, College Park, v. 38, n. 3, p. 345-348, Sept. 2006.

OOSTENDORP, M.; DICKSON, D. W.; MITCHELL, D. J. Population development of *Pasteuria penetrans* on *Meloidogyne arenaria*. **Journal of Nematology**, College Park, v. 23, n. 1, p. 58-64, Jan. 1991.

PROT, J. L.; GUNDY, S. D. van. Effect of soil texture and the clay component on immigration of *Meloidogyne incognita* second-stage juveniles. **Journal of Nematology**, College Park, v. 13, n. 2, p. 213-216, Apr. 1981.

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

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, 1974.

SHARMA, R. D.; VIVALDI, L. J. Controle de *Meloidogyne javanica* com *Pasteuria penetrans*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 11, p. 2065-2069, 1999.

SIDDIQUI, Z. A.; MAHMOOD, I. Effect of a plant growth promoting bacterium, an AM fungus and soil types on the morphometrics and reproduction of *Meloidogyne javanica* on tomato. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 8, n. 1/3, p. 77-84, May 1998

SIKORA, R. A. et al. Mutualistic endophytic fungi and in-plant suppressiveness to plant parasitic nematodes. **Biological Control**, Orlando, v. 46, n. 1, p. 15-23, July 2008.

STIRLING, G. R. Biological control of *Meloidogyne javanica* with *Bacillus penetrans* **Phytopathology**, Saint Paul, v. 74, n. 1, p. 55-60, Jan. 1984.

STIRLING, G. R.; WACHTEL, M. F. Mass production of *Bacillus penetrans* for the biological control of root-knot nematode *Meloidogyne javanica* in soil and its effect on infectivity. **Nematologica**, Leiden, v. 26, n. 3, p. 308-312, 1980.

VERDEJO-LUCAS, S. C. et al. Evaluating *Pochonia chlamydosporia* in a double-cropping system of lettuce and tomato in plastic houses infested with *Meloidogyne javanica*. **Plant Pathology**, New York, v. 52, n. 4, p. 521-528, Aug. 2003.

VERDEJO-LUCAS, S. C. et al. Species of root-knot nematodes and fungal eggs parasites recovered from vegetable in Almeria and Barcelona, Spain. **Journal of Nematology**, College Park, v. 34, n. 4, p. 405-408, Dec. 2002.

VIAENE, N.; ABAWI, G. S. *Hirsutilla rhossiliensis* and *Verticillium chlamydosporia* as biocontrol agents of the root-knot nematode *Meloidogyne hapla* on lettuce. **Journal of Nematology**, College Park, v. 32, n. 1, p. 85-100, Mar. 2000.

VIEIRA, H. D. Coffee: the plant and its cultivation. In. SOUZA, R. M. **Plant-parasitic nematodes of coffee**. [S.l.]: Springer Science Business, 2008. p. 3-18.

WALKLEY, A.; BLACK, I. A. An examination of the degtjareff method for determining soil organic matter, and proposed modification of the chromic acid titration method. **Soil Science**, Baltimore, v. 37, n. 1, p. 29-38, Jan. 1934.

WANG, K. H.; SIPES, B. S.; SCHMITT, D. P. Enhancement of *Rotylenchulus reniformis* suppressiveness by *Crotalaria juncea* amendment in pineapple soils. **Agriculture Ecosystems & Environment**, Amsterdam, v. 94, n. 2, p. 197-203, Feb. 2003.

WEIBELZAHN-FULTON, E.; DICKSON, D. W.; WHITTY, E. B. Suppression of *Meloidogyne incognita* and *M. javanica* by *Pasteuria penetrans* in field soil. **Journal of Nematology**, College Park, v. 28, n. 1, p. 43-49, Mar. 1996.

WELLER, D. M. et al. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 40, p. 309-348, Sept. 2002.

XU, C. K. et al. Soil volatile fungistasis and volatile fungistatic compounds. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 36, n. 12, p. 1997-2004, Dec. 2004.

ZOU, C. S. et al. Possible contributions of volatile-producing bacteria to soil fungistasis. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 39, n. 9, p. 2371-2379, Sept. 2007.

### CAPÍTULO 3

**Substâncias voláteis no antagonismo de fungos da rizosfera cafeeira a *Meloidogyne exigua*, de bactérias endofíticas a *Paecilomyces lilacinus* e relações entre desenvolvimento embrionário e juvenis de segundo estágio de *M. exigua* no solo**

#### RESUMO

A microflora do solo e dos ovos de *Meloidogyne exigua* influencia a dinâmica populacional desse nematoide nos cafezais. Entretanto, são necessários parâmetros para avaliar seu efeito na redução do inóculo infectivo de *M. exigua*. Este trabalho teve por objetivos: isolar fungos da rizosfera cafeeira, avaliar o efeito de compostos orgânicos voláteis (COV) na imobilidade e mortalidade de juvenis de segundo estágio (J2) de *M. Exigua* e estudar a relação entre o desenvolvimento embrionário, J2 no solo e parasitismo de ovos de *M. exigua* durante um ano. Quinze isolados fúngicos foram obtidos do solo, ovos e massas de ovos de *M. exigua*, com predominância (60% dos isolados) de *Fusarium* spp.. Foram isolados: *F. oxysporum*, *Penicillium* sp., *Syncephalastrum* sp., *Cladosporium* sp., *Fusarium* sp. e *Acremonium* sp.. COVs de *F. oxysporum*, *Penicillium* sp., *Syncephalastrum* sp. e do isolado 12 (não identificado) causaram as mais altas atividades nematicidas com mortalidade e imobilidade de J2 acima de 46%. COVs de dois isolados de *Bacillus sphaericus* e um de *B. pumilus* causaram atividade antifúngica a *Paecilomyces lilacinus* avaliada como muito alta e alta, respectivamente. A relação entre desenvolvimento do embrião e multiplicação celular gerou um índice de desenvolvimento embrionário que correlacionou positivamente (0,28;  $p \leq 0,05$ ) com o número de J2 de *M. exigua* por 100cc de solo. A infestação fúngica de ovos de *M. exigua* foi sempre elevada acima de 73% durante todo o ano sem grandes flutuações, apesar de ocorrerem flutuações marcantes na temperatura e umidade do ar nos períodos secos e chuvosos nos locais amostrados. O índice de desenvolvimento embrionário (número de ovos com desenvolvimento do embrião/número de ovos com multiplicação celular) e o antagonismo de voláteis a J2 podem constituir parâmetros explicativos da dinâmica populacional de *M. exigua* em cafezais.

Palavras-chave: Voláteis. *Meloidogyne exigua*. *Paecilomyces lilacinus*. Cafeeiro.

## ABSTRACT

The soil and *Meloidogyne exigua* eggs microflora influences the population dynamic of this nematode in coffee farms. However, to evaluate their effect on reduction of infective *M. exigua* inoculum, parameters needs to be searched. The aim of this work was to isolate fungi from coffee rhizosphere, evaluate the effect of volatile organic compounds (VOC) produced by them to the mortality and immobility of second-stage juvenile (J2) of *Meloidogyne exigua* besides to study a relationship between embryonic development, soil J2 and *M. exigua* eggs parasitism during the year. Fifteen fungus isolates were obtained from coffee soil, *M. exigua* eggs and eggs masses, with predominance (60% of the isolates) of *Fusarium* spp. The isolated species and genera were: *F. oxysporum*, *Penicillium* sp., *Syncephalastrum* sp., *Cladosporium* sp., *Fusarium* sp. and *Acremonium* sp. VOCs from *Fusarium oxysporum*, *Penicillium* sp., *Syncephalastrum* sp. and from isolate 12 (non-identified) caused the highest nematicidal activities with J2 mortality and immobility above 46%. VOCs from two isolates of *Bacillus sphaericus* and one from *B. pumilus* caused fungicidal activities to *Paecilomyces lilacinus* evaluated as very high and high, respectively. The relationships between embryonic development and cellular multiplication generated an index called embryonic development which correlated positively (0,28;  $p \leq 0,05$ ) to the J2 numbers of *M. exigua* per 100cc of soil. The *M. exigua* egg fungus infestation was always high above 73% during the year without great fluctuations although striking fluctuation occurred on air temperatures and humidity of dry and wet periods on the sampled farms. The embryonic development index (number of eggs with embryonic development / number of eggs with cellular multiplication) and the antagonism of VOC to J2 may turn to be parameters to explain the dynamic population of *M. exigua* in coffee farms.

Keywords: Volatiles. *Meloidogyne exigua*. *Paecilomyces lilacinus*. Coffee tree.

## 1 INTRODUÇÃO

O nematoide parasita do cafeeiro -- *Meloidogyne exigua* -- ocorre em vários países, como El Salvador, Venezuela, Costa Rica, República Dominicana, Guatemala, Peru, Panamá, Honduras, Porto Rico, Colômbia, Nicarágua e Bolívia (CAMPOS; VILLAIN, 2005). No Brasil, já está bastante disseminado, sendo que na região Sul do estado de Minas Gerais, esse nematoide ocorre em 22% das lavouras cafeeiras (CASTRO et al., 2008).

Devido à condição perene da cultura do café, o inóculo, os ovos e os juvenis de *M. exigua* estão expostos à influência dos fatores ambientais, como temperatura e umidade e à microflora (fungos e bactérias) durante todo o ano (VIEIRA, 2008). Essa perenidade tem motivado alguns estudos epidemiológicos de *M. exigua* no cafeeiro, que correlacionam, em sua maioria, juvenis de segundo estágio (J2) no solo com galhas, temperatura e umidade relativa do ar (ALMEIDA; CAMPOS, 1987; HUANG; SOUZA; CAMPOS, 1994; MAXIMINIANO et al., 2001; SOUZA; VOLPATO; VIANA, 2008). A relação entre o desenvolvimento do embrião e o J2 livre no solo pode suscitar o envolvimento da microflora rizosférica antagônica, podendo tornar-se fator de supressividade a esse patógeno. Contudo, esse aspecto da epidemiologia desse nematoide ainda não tem recebido a devida atenção dos pesquisadores.

Embora a microflora rizosférica de solo infestado, de ovos, fêmeas e juvenis de *Meloidogyne* spp. tenha sido muito estudada em várias culturas (BARRON, 1977; GRAY, 1987, 1988; JANSSON; NORDBRING-HERTZ, 1988; KERRY, 1984; KERRY; EVANS, 1996; MORGAN-JONES; RODRIGUES-KABANA, 1988; POINAR; JANSSON, 1988), tem sido pouco pesquisada no cafeeiro. Estudos sobre o uso de agentes fúngicos no controle de *M. exigua* do cafeeiro foram realizados empregando-se organismos isolados de outras plantas infestadas por *Meloidogyne* spp. (AMARAL et al., 2009;

CAMPOS; CAMPOS, 1997; OLIVEIRA et al., 2007, 2009). Antagonistas de *M. exigua* têm sido obtidos em tomateiros inoculados com solo rizosférico de cafeeiro infestado por esse patógeno (DIAZ et al., 2000).

O fungo *Paecilomyces lilacinus* é o agente de controle biológico de nematoides mais extensivamente testado em campo. É produzido comercialmente como Bioact<sup>®</sup> nas Filipinas (KERRY; EVANS, 1996). Contudo, foi encontrado antagonismo no solo cultivado com tabaco por *P. lilacinus* (ZOU et al., 2007), o que torna incerta a eficiência do controle de fitonematoides através da introdução do Bioact<sup>®</sup> na rizosfera antagonista.

Bactérias endofíticas e rizobactérias ocorrem na rizosfera e órgãos de várias plantas e já se constatou efeito antagônico à população de vários nematoides (HALLMANN et al., 1995, 1998; PINHO et al., 2008; SIDDIQUI; EHTESHAMUL-HAQUE, 2000, 2001).

Substâncias tóxicas solúveis em água têm sido constatadas e caracterizadas molecularmente (OLIVEIRA et al., 2009; SIKORA; BRIDGE; STARR, 2005; WHEATLEY, 2002). Também tem sido constatada a produção de substâncias orgânicas voláteis tóxicas a fitonematoides (AL-REHIAYANI et al., 1999; CAMPOS; PINHO; FREIRE, 2010; FREIRE et al., 2010; HUANG et al., 2010; RIGA; LACEY; GUERRA, 2008 ). Entretanto, o efeito de voláteis produzidos pelos fungos e bactérias da rizosfera cafeeira ainda precisa ser pesquisado. Dessa forma, objetivou-se neste trabalho: 1) isolar fungos de diferentes locais da rizosfera cafeeira infestada por *M. exigua* e estimar a produção de compostos orgânicos voláteis tóxicos a juvenis de segundo estágio (J2) de *M. exigua* por tais micro-organismos; 2) avaliar a atividade fungicida de voláteis produzidos por bactérias endofíticas a *P. lilacinus*; 3) correlacionar o desenvolvimento embrionário de ovos de *M. exigua* com a população de J2 no solo; 4) avaliar a infestação fúngica de ovos de *M. exigua* durante o ano.

## **2 MATERIAL E MÉTODO**

### **2.1 Amostragem**

No período de fevereiro de 2008 a fevereiro de 2009, foram amostrados solos e raízes de dois cafezais localizados nas cidades de Lavras e Varginha, estado de Minas Gerais. Estes locais foram selecionados porque os inóculos de *M. exigua* obtidos nestas lavouras cafeeiras têm demonstrado baixa eclosão em exames laboratoriais rotineiros. Desses cafezais, foram retiradas mensalmente 4 amostras em três plantas contendo raízes finas (100g cada), infectadas por *M. exigua* e solo (2Kg cada amostra). As amostras foram coletadas na projeção da copa do cafeeiro a uma profundidade de 0 a 20 cm, estocadas a uma temperatura entre 8 e 10°C por até 3 dias e então processadas.

### **2.2 Extração de ovos das raízes e juvenis de segundo estágio (J2) do solo**

As raízes finas galhadas foram cuidadosamente lavadas em água parada, tendo sido obtidas quatro amostras de 30 gramas. Para cada amostra, fez-se a extração de ovos conforme a técnica de Hussey e Barker (1973). O solo rizosférico amostrado foi peneirado (peneira de 4mm), eliminando-se raízes e detritos, sendo retirados, então, 300cc de cada amostra colhida no campo, subdivida, em seguida, em três subamostras de 100cc para a extração de J2 pela técnica de Jenkins (1964). Os nematoides obtidos das três subamostras foram reunidos em única suspensão em água. Os J2 foram contados em microscópio óptico de objetivas invertidas e o número total foi dividido por três, expressando-se o número de J2 por 100cc de solo. Calculou-se a média das 4 amostras de solo colhida no campo.

### **2.3 Desenvolvimento embrionário**

O desenvolvimento embrionário de ovos imediatamente após extração das quatro amostras de 30g de raiz foi avaliado, especificamente, em relação aos ovos que já tinham iniciado esse processo. Para isso, recolheram-se ao acaso 100 ovos de *M. exigua* e estimou-se o número deles nas fases: 2 e 4 células multicelular, gástrula, “tadpole”, juvenil formado, conforme Bird (1972). Essas avaliações foram repetidas por três vezes e obtida a média a fim de constituir uma repetição. Em cada período de amostragem, a avaliação foi realizada em 4 repetições. O número de ovos nas fases de multiplicação celular (2 e 4 células e multicelular) foi agrupado, como também ocorreu com o número de ovos nas fases do desenvolvimento embrionário (gástrula, “tadpole” e juvenil). Com esses valores totais, calculou-se a relação entre desenvolvimento embrionário e multiplicação celular nos diversos meses do ano de amostragem.

### **2.4 Infestação fúngica nos ovos**

Com auxílio de microscópio de objetivas invertidas, foram observados 100 ovos extraídos de raízes galhadas, escolhidos ao acaso, quanto à presença ou não de estruturas fúngicas aderidas tanto externamente, quanto internamente, sem distinção. Ovos com presença de estruturas fúngicas foram classificados como infestados. Essa avaliação foi repetida por três vezes e obtida a média a fim de constituir uma repetição. Em cada período de amostragem, a avaliação foi realizada em quatro repetições.

## **2.5 Isolamento fúngico**

### **2.5.1 A partir de ovos**

Dos ovos extraídos das raízes galhadas em suspensão aquosa, coletou-se, individualmente sob microscópio de objetiva invertida, o ovo que demonstrava a presença de estrutura fúngica, transferindo-o, em seguida, para placa de Petri (9cm de diâmetro) com agar-água (AA). Em uma mesma placa, foi possível colocar 5 ovos e a localização de cada um deles, marcada, no fundo da placa, com marcador para retroprojeter. Para cada repetição e época amostrada, foram feitas 10 placas. As placas foram vedadas com parafilme e armazenadas em BOD a 25°C no escuro. Diariamente, observou-se a presença de hifas fúngicas ao redor dos ovos, sob microscópio. Uma vez constatada a ocorrência de crescimento fúngico, os ovos foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura malte-agar (MA), sendo, então, armazenadas a 25°C, no escuro, em BOD. Em seguida, as colônias foram repicadas para novas placas para purificação e posterior identificação dos gêneros e espécies.

### **2.5.2 A partir de massas de ovos**

As galhas nas amostras colhidas no campo foram dilaceradas e delas retiraram-se as massas de ovos, transferindo-as, assepticamente, para placas de Petri contendo AA. As placas foram vedadas com parafilme e colocadas em BOD, a 25°C, no escuro. Diariamente, observou-se o desenvolvimento de colônias fúngicas. As colônias fúngicas -- crescidas a partir das massas de ovos em AA -- foram repicadas para placas com o meio MA. As colônias foram novamente repicadas para purificação e identificação dos gêneros e espécies.

### **2.5.3 A partir de solo rizosférico de cafeeiro infestado por *M. exigua***

Dez gramas de solo das amostras colhidas no campo foram suspensas em 200mL de água destilada e agitada a 180 rpm, por 10 minutos, conforme técnica de Silva, Abreu e Pflnning (2005). Após 2 minutos de decantação, o sobrenadante foi descartado. A técnica foi repetida mais duas vezes. Na terceira vez, o precipitado formado foi suspenso em água destilada, peneirado através de peneiras com malhas de 1mm, 0,7mm, 0,5mm e 0,21mm, empilhadas na respectiva ordem e lavado com jatos de água destilada. O material retido na peneira de malha 0,21mm foi recolhido com auxílio de uma pisseta com jato de água destilada e colocados, após secagem, em papel filtro em placas de Petri contendo meio MA. As placas foram vedadas com parafilme e armazenadas em BOD, a 25°C, no escuro. Diariamente, observou-se o crescimento de hifas fúngicas. As colônias crescidas isoladamente e que demonstravam ter morfologias diferentes foram repicadas para placas com meio MA. Após a colonização, fez-se nova repicagem para meio MA para purificação e identificação dos gêneros e espécies.

### **2.6 Cultura de *Paecilomyces lilacinus***

Foi empregada uma cultura de *P. Lilacinus*, preservada em água destilada estéril e anteriormente empregada em outros ensaios. Discos de cultura de *P. lilacinus* foram repicados para meio de cultura MA. Após o crescimento fúngico, fez-se nova repicagem para meio MA, sendo utilizado, então, nos ensaios com voláteis bacterianos.

## 2.7 Isolados bacterianos

Neste trabalho, foram utilizados isolados bacterianos (*Bacillus sphaericus* – 3 isolados, *B. pumilus* – 5 isolados, *B. amyloliquefaciens* – 2 isolados, Pim 11 – 1 isolado não identificado, *Paenibacillus macerans* – 1 isolado, *B. cereus* – 1 isolado) obtidos de caules de tomate e pimentão (SILVA et al., 2008), depositados no departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras, MG. Após seleção prévia, um total de 13 isolados bacterianos de 5 espécies e um não identificado foram examinados quanto ao potencial de produção de compostos orgânicos voláteis (COV) fungicidas. Esses isolados estavam incubados em meio peptona-glicerol (20mL de peptona, 10mL de glicerol, 1,5g de  $K_2HPO_4$ , 1 litro de água destilada) e estocados a  $-80^\circ C$ . Antes da montagem dos ensaios, as culturas estoque foram repicadas para meio Tryptic soy Agar (TSA) (Difco Laboratories, Detroit, MI- EUA) e incubadas a  $28^\circ C$  por 24 horas.

## 2.8 Atividade fungicida (AF) dos compostos orgânicos voláteis (COV) bacterianos

O fungo parasita de ovos *P. lilacinus* e os isolados bacterianos endofíticos obtidos de caules de tomateiro e pimentão (Tabela 2) foram usados no bioensaio delineado para permitir que apenas compostos voláteis das bactérias fossem a causa da inibição do crescimento micelial de *P. lilacinus*. Suspensão bacteriana (300mL) obtida pelo cultivo a  $28^\circ C$  por 24 horas em meio TSA foi colocada em placa bipartida na superfície do meio TSA. Na outra metade, colocou-se um disco de 5mm, obtido da borda da colônia em crescimento de *P. Lilacinus*, na superfície do meio MA. Em outra placa, como controle, colocou-se um disco de cultura de *P. lilacinus* na superfície do meio MA e, no compartimento contíguo, colocou-se apenas TSA, sem bactéria. Todas

as placas foram envolvidas por parafilme e incubadas a 25 °C, no escuro. A cada intervalo de 24 horas, mediu-se o crescimento linear do fungo filamentososo a partir da margem do disco do inóculo até a colônia alcançar a borda da placa. A atividade fungicida (AF) dos COVs bacterianos foi apresentada como porcentagem de redução do crescimento micelial comparado com o controle (somente meio TSA sem a bactéria).

### **2.9 Atividade nematocida *in vitro* dos compostos orgânicos voláteis (COVs) fúngicos (imobilidade e mortalidade de J2)**

As atividades nematocidas (ANs) em J2 de *M. exigua* dos COVs fúngicos isolados da rizosfera cafeeira infestada por *M. exigua* foram avaliadas de acordo com o método de Fernando et al. (2005), com algumas modificações. Cada fungo foi repicado para um dos dois compartimentos da placa bipartida contendo meio MA. Quando a colônia fúngica alcançou 4,5 cm de diâmetro, uma suspensão de aproximadamente 200 J2 de *M. exigua* foi pipetada na outra metade da placa, na superfície do meio AA. Como controle, a mesma quantidade de meio MA, sem crescimento fúngico, foi adicionada em um dos compartimentos e os J2, no compartimento contíguo. As placas foram imediatamente envolvidas com parafilme para prevenir o escape dos voláteis e, em seguida, armazenadas a 25°C, em BOD, no escuro, por 72 horas. Os J2 móveis e imóveis foram contados sob microscópio óptico de objetivas invertidas. A seguir, os J2 foram transferidos para poços de 300µL de placa Elisa que continham 200µL de água destilada esterilizada. Após 24 horas, os J2 imóveis foram considerados mortos (mortalidade). Este teste foi feito em quatro repetições e as atividades nematocidas (AN) foram calculadas usando-se a fórmula:  $AN = IN / SN \times 100$ , em que IN representa o número de J2 mortos ou imóveis e SN, o número total de J2 contado.

## 2.10 Delineamento experimental

Utilizou-se delineamento inteiramente casualizado (DIC) nos testes de voláteis produzidos por fungos e bactérias.

## 2.11 Análise estatística dos dados

Os dados foram analisados através da análise de variância (ANOVA), utilizando-se o programa estatístico Sisvar. A atividade nematicida – AN (imobilidade e mortalidade) e atividade fungicida – AF (diâmetro das colônias fúngicas) foram calculadas como médias de quatro repetições. As categorias dos COVs foram definidas de acordo com as análises de grupos de médias pelo teste de Scott e Knott (1974) ao nível de 5% de probabilidade. Dessa forma, definiram-se três categorias, tanto para imobilidade, quanto para mortalidade:  $4,5 \leq AN \leq 7,2$  (I),  $23 \leq AN \leq 37$  (II),  $42 \leq AN \leq 45$  (III) e  $53 \leq AN \leq 58$  (IV), classificados como: nenhum efeito de AN (I), moderada atividade nematicida (II), alta atividade nematicida (III) e muito alta atividade nematicida (IV). As atividades fungicidas (AF) para as categorias estabelecidas para os COVs de bactérias sobre *P. lilacinus* foram:  $0 \leq AF \leq 6$  (I),  $9 \leq AF \leq 15$  (II),  $AF = 31$  (III),  $AF = 46$  (IV),  $AF = 100$  (V), classificados como: I nenhum efeito de AF, II como baixa AF, III como média AF, IV como alta AF, V como muito alta. As análises de correlação foram feitas através do programa Excel.

## 2.12 Flutuação anual de temperatura e umidade relativa do ar das cidades de Lavras e Varginha, estado de Minas Gerais

Os dados médios mensais de temperatura e umidade relativa do ar foram obtidos na estação meteorológica de Lavras, localizada no Campus da

Universidade Federal de Lavras e na estação meteorológica do Procafé, localizado na cidade de Varginha. Os dados foram plotados em gráficos.

### 3 RESULTADOS

Quinze isolados fúngicos foram obtidos do solo, ovos e massas de ovos de *M. exigua* do cafeeiro. Os isolados 1, 3, 5, 6 e 11 foram isolados de cafezal de Varginha-MG e os isolados 2, 4, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14 e 15 foram isolados de cafezal de Lavras-MG. Os isolados pertencem aos gêneros e espécies: *F. oxysporum*, *Penicillium* sp., *Syncephalastrum* sp., *Cladosporium* sp., *Fusarium* sp., *Acremonium* sp.. Não foi possível identificar o gênero e a espécie dos isolados 9 e 12. No total, 3 isolados de *F. oxysporum* foram obtidos do solo cafeeiro (2, 11 e 15); 6 isolados de *Fusarium* spp., obtidos do solo (5 e 8); de ovos (4, 10 e 14) e massa de ovos (13). Um isolado de *Penicillium* sp. (7) do solo, um isolado de *Syncephalastrum* sp. de massas de ovos (3), um isolado de *Cladosporium* sp. do solo (6), um isolado de *Acremonium* sp. do solo (1) e dois isolados não identificados (9 e 12). A maioria dos fungos (10 isolados) foi obtida de solo rizosférico cafeeiro. *Fusarium* sp. foi encontrado nos diversos locais de isolamento (solos, ovos e massas de ovos).

COVs de *Fusarium oxysporum* (isolado 2), *Penicillium* sp. (7), *Syncephalastrum* sp. (3) e do isolado não identificado (12) causaram uma atividade nematicida muito alta, com mortalidade e imobilidade de J2 acima de 46%. Também os COVs dos isolados 11 e 15 de *Fusarium oxysporum* e do isolado 6 de *Cladosporium* sp. causaram alta atividade nematicida, com mortalidade e imobilidade de J2 entre 32 e 45%. Todos os demais isolados (1, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 13 e 14) causaram mortalidade e imobilidade moderada ou nenhuma atividade nematicida (Tabela 1).

Tabela 1 Isolados fúngicos (identificados por números sequenciais) com atividade nematicida (AN) dos compostos orgânicos voláteis (COVs) a juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne exigua*

Espécies/ gêneros fúngicos	Locais de isolamento	Isolados dentro das diferentes categorias (AN)							
		Imobilidade (%)				Mortalidade (%)			
		I	II	III	IV	I	II	III	IV
<i>Fusarium oxysporum</i>	Solo	---	---	11, 15	2	---	---	11, 15	2
<i>Penicillium</i> sp.	Solo	---	---	---	7	---	---	---	7
<i>Syncephalastrum</i> sp.	Massa de ovos	---	---	---	3	---	---	---	3
<i>Cladosporium</i> sp.	Solo	---	---	6	---	---	---	6	---
	Ovos	---	4, 10, 14	---	---	---	4, 10, 14	---	---
<i>Fusarium</i> sp.	massa de ovos	13	---	---	---	13	---	---	---
	Solo	5 e 8	---	---	---	5 e 8	---	---	---
<i>Acremonium</i> sp.	Solo	---	1	---	---	---	1	---	---
Isolado 1	Solo	---	9	---	---	---	12	---	---
Isolado 2	Solo	---	---	---	12	---	---	---	9
Total	15	3	5	3	4	3	5	3	4

Imobilidade = I – sem AN, II – moderada AN, III alta AN e IV muito alta AN. Mortalidade = I - sem AN, II – moderada AN, III alta AN e IV muito alta AN. Cada categoria difere entre si pelo teste de Scott Knott (1974) ao nível de 5% de probabilidade. Os isolados 1, 3, 5, 6 e 11 foram isolados de cafezal de Varginha-MG e os isolados 2, 4, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14 e 15 foram isolados de cafezal de Lavras-MG

Dos treze isolados bacterianos selecionados para produção de voláteis antifúngicos, apenas 2 isolados de *Bacillus sphaericus* e um de *B. pumillus* causaram uma atividade antifúngica a *P. lilacinus* muito alta e alta, respectivamente. Um isolado de *B. pumillus* causou média atividade antifúngica e os demais casaram baixa ou nenhuma atividade antifúngica contra *P. lilacinus* (Tabela 2).

Tabela 2 Isolados bacterianos com atividade fungicida (AF) a *Paecilomyces lilacinus* por compostos orgânicos voláteis (COV)

Espécies de bactérias	Número de isolados	Isolados dentro dos diferentes categorias (AN)				
		I	II	III	IV	V
<i>Bacillus pumilus</i>	5	1	2	1	1	---
Pim 11 (não identificada)	1		1	---	---	---
<i>Paenibacillus macerans</i>	1	1	---	---	---	---
<i>Bacillus sphaericus</i>	3	1	---	---	---	2
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	2	1	1	---	---	---
<i>Bacillus cereus</i>	1	1	---	---	---	---
Total	13	5	4	1	1	2

As categorias de Atividades fungicidas (AF): I – sem AF, II – baixa AF, III - media AF, IV - alta AF e V – muito alta AF. Cada categoria difere entre si pelo teste de Scott Knott (1974) ao nível de 5% de probabilidade

O número de ovos na fase de multiplicação celular do desenvolvimento embrionário foi sempre baixo nos cafezais amostrados nas fazendas das duas cidades (Lavras e Varginha), nos meses de março a julho. Contudo, esse número aumentou a partir de agosto e até fevereiro. De forma inversa, o número de ovos na fase de desenvolvimento do embrião foi muito elevado (83% a 98%) nos meses de março a julho e decrescem bastante (43% a 78%), entre agosto e fevereiro. A relação entre as duas fases -- isto é, desenvolvimento do embrião/multiplicação celular -- proporcionou um índice de desenvolvimento embrionário elevado (4,9 a 49) no período de março a julho e reduzido (0,8 a

3,5) entre agosto e fevereiro. Os meses com maiores índices de desenvolvimento embrionário (de março a julho) coincidiram com os meses de maior número de J2 por 100cc de solo. Do mesmo modo, os meses com índices de desenvolvimento embrionário baixos (de agosto a fevereiro) coincidiram com números baixos de J2 por 100cc de solo. Todos estes comportamentos foram semelhantes nos cafezais de Lavras e Varginha, estado de Minas Gerais (Tabela 3).

A infestação fúngica dos ovos de *M. exigua* foi semelhante e elevada (acima de 73%) nos cafezais das duas cidades amostradas com ligeira redução no cafezal de Varginha, nos meses de março a abril (Gráfico 1).

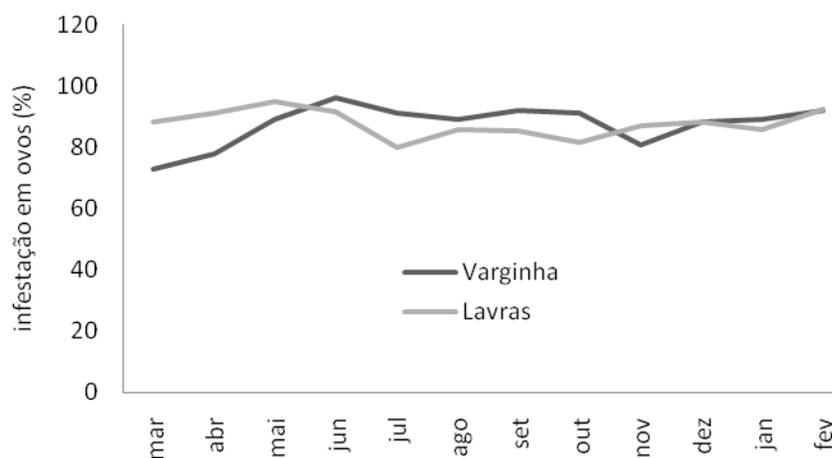


Gráfico 1 Flutuação anual da infestação fúngica em ovos de *Meloidogyne exigua* dos cafeeiros coletados nos municípios de Lavras e Varginha, no estado de Minas Gerais

Nas amostras dos cafezais do município de Lavras-MG, houve correlação positiva entre infestação dos ovos e temperatura e entre infestação dos ovos e umidade relativa de 0,022 ( $p \leq 0,05$ ) e de 0,632 ( $p \leq 0,05$ ), respectivamente. Contudo, nas amostras dos cafezais de Varginha-MG, para os

mesmos parâmetros, houve correlação negativa de -0,351 ( $p \leq 0,05$ ) e de -0,344 ( $p \leq 0,05$ ), respectivamente.

Houve correlação positiva de 0,28 ( $p \leq 0,05$ ) e de 0,99 ( $p \leq 0,05$ ) entre o número de J2 no solo por 100cc e o índice de desenvolvimento do embrião nos cafezais de Lavras-MG e Varginha-MG, respectivamente.

Tabela 3 Desenvolvimento do embrião, multiplicação celular e relação entre ambos em ovos recentemente extraídos de raízes de cafezais infestados por *Meloidogyne exigua*, colhidas mensalmente nas cidades de Lavras e Varginha, no estado de Minas Gerais e a população de juvenis de segundo estágio (J2) no solo.

Meses	Locais	J2/100cc de solo	Multipl. celular (total)	Desenvolv; do embrião (total)	Índice de desenv. embr.
Mar	Varginha	520	2	98	49,0
	Lavras	465	10	90	9
Abr	Varginha	178	6	94	15,7
	Lavras	153	11	89	8,1
Mai	Varginha	109	7	93	13,3
	Lavras	77	5	95	19
Jun	Varginha	43	17	83	4,8
	Lavras	23	15	85	5,7
Jul	Varginha	20	16	84	5,3
	Lavras	22	7	93	13,0
Ago	Varginha	11	22	78	3,5
	Lavras	7	22	78	3,5
Set	Varginha	3	46	54	1,2
	Lavras	3	23	78	3,4
Out	Varginha	9	57	43	0,8
	Lavras	20	32	68	2,1
Nov	Varginha	10	34	66	1,9
	Lavras	15	33	67	2,0
Dez	Varginha	14	32	68	2,1
	Lavras	20	34	66	1,9
Jan	Varginha	6	43	57	1,3
	Lavras	22	38	62	1,6
Fev	Varginha	39	44	56	1,3
	Lavras	37	42	59	1,4

As médias mensais da umidade relativa do ar e das temperaturas durante todo o período amostrado foram semelhantes nas duas cidades onde se localizavam os cafezais amostrados (distância entre as cidades de 106 Km). A

umidade relativa declinou entre os meses de junho e novembro e a temperatura foi baixa entre os meses de maio e setembro (Gráfico 2).

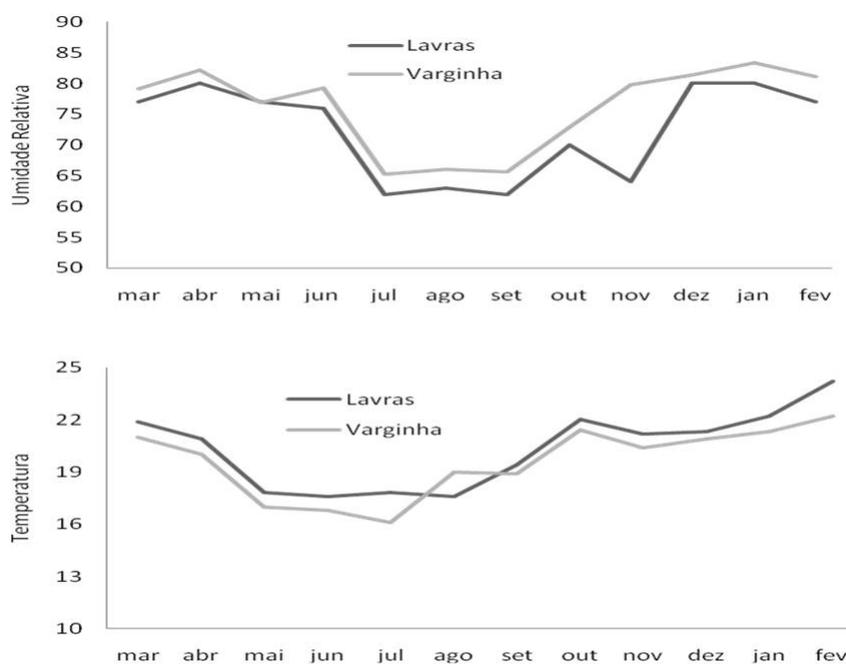


Gráfico 2 Flutuação anual da umidade relativa do ar da temperatura média nos municípios de Lavras e Varginha, estado de Minas Gerais

#### 4 DISCUSSÃO

Os fungos isolados e identificados neste trabalho estão de acordo com a literatura, uma vez que todas as espécies e gêneros identificados têm sido relatados em associação com ovos, cistos ou massas de ovos (ASHOUB et al., 2009; BERNARD; SELF; TYLER, 1996; CHEN et al., 1994; FREIRE et al., 2010; GINITIS; MORGAN-JONES; RODRIGUEZ-KABANA, 1983; NIGH; THOMASON; GUNDY, 1980; MIZOBUTZI et al., 1999; SUN et al., 2006; TRIFONOVA, KARADJOVA; GEORGIEVA, 2009). Por exemplo, Ribeiro e Campos (1993) relataram a presença do fungo *Penicillium* sp. em raízes de cafeeiro infestadas por *M. exigua*. Da mesma forma, outros pesquisadores têm descrito e isolado *Fusarium oxysporum* e *Fusarium solani* do solo e de cisto de nematoide (CHEN; DICKSON; MITCHELL, 2004; FREIRE et al., 2010; MIZOBUTZI et al., 1999; WESTPHAL ; BECKER, 2001).

Neste trabalho, *Fusarium* sp. representa o maior número de isolados encontrado na rizosfera de plantas de café infestadas por *M. exigua*, o que sugere boa adaptabilidade de desse fungo a essa rizosfera. Freire et al. (2010) também encontraram maior predominância do grupo *Fusarium* na rizosfera cafeeira.

Como os J2 estavam em contato direto com os voláteis produzidos pelos fungos, os efeitos tóxicos nos nematoides foram decorrentes de COVs produzidos pelos fungos (*Fusarium oxysporum*, *Penicillium* sp., *Syncephalastrum* sp., *Cladosporium* sp.). Trabalhos anteriores têm documentado a produção de COVs tóxicos a nematoides por fungos (FREIRE et al., 2010; RIGA; LACEY; GUERRA, 2008). Assim como demonstrado no estudo de Freire et al. (2010), a abundância de *Fusarium* sp. nos solos cafeeiros amostrados neste trabalho e a produção de COVs nematicida por *F. oxysporum* indicam a ocorrência -- possivelmente constante -- de antagonismo dessa rizosfera a *M. exigua*. Além disso, *F. oxysporum* não patogênico às plantas têm

sido endofítico e antagonico a *Meloidogyne* sp. (DABABAT; SIKORA, 2007; HALLMANN; SIKORA, 1994; MENDOZA; SIKORA, 2009; VU; HAUSCHILD; SIKORA, 2006).

Em relação a *P. Lilacinus*, dos treze isolados bacterianos testados, três tiveram uma atividade fungicida dos COVs alta e muito alta. Como essas bactérias são endofíticas (SILVA et al., 2008), a colonização de raízes por *P. lilacinus* pode ser dificultada na presença dessas espécies bacterianas na planta. Zou et al. (2007) também demonstraram o efeito tóxico de COVs bacterianos à germinação de conídios e ao crescimento micelial de *P. Lilacinus* e de *Pochonia chlamydosporia*. Contudo, COVs bacterianos têm efeito tóxico para várias espécies fúngicas saprófitas ou parasitas de plantas (CAMPOS ; PINHO; FREIRE, 2010; FERNANDO et al., 2005; KAI et al., 2007,2009; LIU et al., 2008; WAN et al., 2008).

A produção de compostos voláteis antimicrobianos por microorganismos saprófitas pode ser explorada como um método válido de controle de doenças de plantas sob condições relativamente herméticas (WAN et al., 2008). Os COVs fúngicos e bacterianos também podem ser usados como esqueletos principais no desenvolvimento de novos agentes nematicidas, através de futuras modificações químicas (GU et al., 2007).

A flutuação no índice de desenvolvimento embrionário no decorrer do ano sugere que componentes da microbiota agem de formas diferentes na população de ovos de *M. exigua* durante o ano. Sabe-se que ocorre fragilidade das defesas internas (camada de quitina e camada lipídica) do ovo quando ocorre a formação do juvenil, visto que, para a eclosão do ovo, ocorre uma alteração na permeabilidade da membrana abaixo da casca possibilitando a entrada de água e, conseqüentemente, hidratação do juvenil (JONES; TYLKA; PERRY, 1998). Entretanto, as barreiras a penetração de moléculas tóxicas ainda estão intactas na fase de multiplicação celular (LEE; ATKINSON, 1977). Porém,

parece que no período de agosto a fevereiro essas barreiras são transpostas e em muitos ovos pode ter promovido a morte de células, impedindo, por consequência, o avanço ao desenvolvimento do juvenil. Contudo, existe também a possibilidade desse efeito ter sido causado por processo predatório de fungos ao invés de toxicidade pela penetração de moléculas tóxicas de origem microbiana favorecido, talvez, por algum fator do meio ambiente. A correlação entre o índice de desenvolvimento embrionário e a população de J2 por 100cc de solo foi de 0,28 ( $P \leq 0,05$ ) para cafezal das faendas de Lavras-MG e 0,99 ( $P \leq 0,05$ ) para o cafezal das fazendas de Varginha-MG. Desta forma, a atividade fúngica parasita ou aderida em ovos de *M. exigua*, aqui demonstrada como elevada, pode ter atividades diferenciadas na morte de células e embrião dos ovos. Tem-se constatado grande diversidade de fungos residentes, predadores e parasitas de ovos (ASHOUB et al., 2009; FREIRE et al., 2010; SUN et al., 2006; TRIFONOVA; KARADJOVA; GEORGIEVA, 2009).

A flutuação de temperatura e umidade relativa nas áreas amostradas podem influenciar diferentemente fungos e bactérias da rizosfera, permitindo flutuações na predominância de certas espécies, as quais podem produzir substâncias tóxicas aos ovos de *M. exigua*. A correlação entre a população fúngica em ovos e a umidade foi de 0,632 ( $P \leq 0,05$ ) e entre a população fúngica e a temperatura foi de 0,022 ( $P \leq 0,05$ ) para os cafezais das fazendas de Lavras-MG e -0,34 ( $P \leq 0,05$ ) e entre população fúngica e temperatura foi de -0,35 ( $P \leq 0,05$ ) para os cafezais das fazendas de Varginha-MG.

Os voláteis produzidos pela microbiota da rizosfera cafeeira podem ser a causa do antagonismo a *M. exigua* e o índice de desenvolvimento embrionário aqui sugerido pode constituir uma medida antagônica ao efeito rizosférico na população de ovos de *M. exigua*.

## 5 CONCLUSÕES

Compostos orgânicos voláteis de *Fusarium oxysporum* (isolado 2) , *Penicillium* sp. (isolado 7), *Sincephalastrum* sp. (isolado 3) e do isolado não identificado (12) provocam uma atividade nematocida a *Meloidogyne exigua* muito alta.

Dois isolados (*Bacillus sphaericus* e *B. Pumillus*) foram categorizados, respectivamente, como isolados de muito alta e alta atividade antifúngica a *P. lilacinus*.

O maior número de J2 no solo ocorre nos períodos do ano com maiores valores de índice de desenvolvimento embrionário.

A infestação fúngica durante o ano, acima de 73%, é alta nas lavouras cafeeiras estudadas.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, V. S.; CAMPOS, V. P. Flutuação populacional de *Meloidogyne exigua* na rizosfera cafeeira. **Nematologia Brasileira**, Campinas, v. 11, p. 159-175, 1987.
- AL-REHIAYANI, S. et al. Effects of *Pratylenchus neglectus*, *Bacillus megaterium*, and oil radish or rapeseed green manure on reproductive potential of *Meloidogyne chitwoodi* on potato. **Nematropica**, Bradenton, v. 29, n. 1, p. 37-49, 1999.
- AMARAL, D. R. et al. Effect of plant and fungus metabolites on *Meloidogyne exigua*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. spe, p. 1861-1865, 2009.
- ASHOUB, A. H. et al. Impact of some fungi species as biocontrol agent against the root-knot nematode, *Meloidogyne Incognita*. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 3, n. 4, p. 3617-3624, 2009.
- BARRON, G. L. **The nematode destroying fungi**. Guelph: Canadian Biological, 1977. 140 p.
- BERNARD, E. C.; SELF, L. H.; TYLER, D. D. Fungal parasitism of soybean cyst nematode, *Heterodera glycines* (*Nemata: Heteroderidae*), in differing cropping-tillageregimes. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 5, n. 1, p. 57-70, Jan.1996.
- BIRD, A. F. Quantitative studies on the growth of syncytia induced in plants by root-knot nematodes. **International Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 2, n. 1, p. 70-157, Mar. 1972.
- CAMPOS, H. D.; CAMPOS, V. P. Efeito da época e forma de aplicação dos fungos *Arthrobotrys conoides*, *A. musiformis*, *Paecilomyces lilacinus* e *Verticillium chlamydosporium* no controle de *Meloidogyne exigua* do cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 3, p. 361-365, 1997.
- 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, May/June 2010.

CAMPOS, V. P.; VILLAIN, L. Nematode parasites of coffee and cocoa. In: LUC, M., SIKORA, R. A.; BRIDGE, J. **Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture**. Wallingford: CAB Internacional, 2005. chap. 14, p. 529-579.

CASTRO, J. M. C. et al. Levantamento de fitonematoides em cafezais do sul de Minas Gerais. **Nematologia Brasileira**, Campinas, v. 32, n. 1, p. 56-64, mar. 2008.

CHEN, S. Y.; DICKSON, D. W.; MITCHELL, D. J. Population development of *Heterodera glycines* in response to mycroflora in soil from Florida. **Biological Control**, Orlando, v. 6, p. 226-231, 2004.

CHEN, S. Y. et al. Fungi associated with females and cysts of *Heterodera glycines* in a Florida soybean field. **Journal of Nematology**, College Park, v. 26, n. 3, p. 296-303, Sept. 1994.

DABABAT, A.; SIKORA, R. A. Importance of application time and inoculum density of *Fusarium oxysporium* 162 for biological control of *Meloidogyne incognita* on Tomato. **Nematropica**, Bradenton, v. 37, n. 2, p. 276-275, 2007.

DIAZ, 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, dez. 2000.

FERNANDO, W. G. D. et al. Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 37, n. 5, p. 955-964, May 2005.

FREIRE, E. S. et al. Volatile substances on the antagonism between fungi, bactéria and *Meloidogyne incognita* and potentially fungi for nematode control. **Journal of Nematology**, College Park, 2010. No prelo.

GINITIS, B.; MORGAN-JONES; G.; RODRIGUEZ-KABANA, R. Fungi associated with several developmental stages of *Heterodera glycines* from an Alabama soybean field soil. **Nematropica**, Bradenton, v. 13, p. 181-200, 1983.

GRAY, N. F. Fungi attacking vermiforme nematodes. In: POINAR, G. O.; JANSSON, H. B. **Disease of nematodes**. Boca Raton: CRC Press, 1988. v. 2, p. 3-38.

GRAY, N. F. Nematophagous fungi with particular reference to their ecology. **Biological Reviews**, Cambridge, v. 62, p. 245-304, Aug. 1987.

GU, Y. Q. et al. Evaluation and identification of potential organic nematicidal volatiles from soil bacteria. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 39, n. 10, p. 2567-2575, Oct. 2007.

HALLMANN, J. et al. Endophytic rhizobacteria as antagonists of *Meloidogyne incognita* on cucumber. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 85, p. 1136, 1995.

HALLMANN, J. et al. Interaction between *Meloidogyne incognita* and endophytic bacteria in cotton and cucumber. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 30, p. 925-937, 1998.

HALLMANN, J.; SIKORA, R. A. Occurrence of plant parasitic nematodes and nonpathogenic species of *Fusarium* in tomato plants in Kenya and their role as mutualistic synergists for biological control of root knot nematodes. **International Journal of Pest Management**, London, v. 40, p. 321-325, 1994.

HUANG, S. P.; SOUZA, P. E.; CAMPOS, V. P. Seasonal variation of a *Meloidogyne exigua* population in a coffee plantation. **Journal of Nematology**, College Park, v. 16, n. 11, p. 115-117, 1984.

HUANG, Y. et al. Characterisation of volatiles produced from *Bacillus megaterium* YFM3.25 and their nematicidal 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 of collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. **Plant Disease Reporter**, Washington, v. 57, p. 1025-1028, 1973.

JANSSON, H. B.; NORDBRING-HERTZ, B. Infection events in the fungus-nematodes systems. In: POINAR, G. O.; JANSSON, H. B. **Diseases of nematodes**. Boca Raton: CRC Press, 1988. v. 2, p 59-72.

JENKINS, W. R. A rapid centrifugal – flotation technique for separating nematodes from soil. **Plant Disease Report**, Washington, v. 48, p. 692-695, 1964.

JONES, P. W.; TYLKA, G. L.; PERRY, R. N. Hatching. In: PERRY, R. N.; WRIGHT, D. J. **The physiology and biochemistry of free-living and plant-parasitic Nematodes**. [S.l.:s.n.], 1998. p. 438.

KAI, M. et al. Bacterial volatiles and their action potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Seoul, v. 81, n. 6, p.1001-1012, Jan. 2009.

KAI, M. et al. Volatiles of bacterial antagonists inhibit mycelial growth of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*. **Archives Microbiology**, Paris, v. 187, n. 5, p. 351-360, May 2007.

KERRY, B. R.; EVANS, K. New strategies for the management of plant parasitic nematodes In: HALL, R. **Principles and practice of managing soilborne plant pathogen**. Minnesota: [s.n.], 1996. p. 134-152.

KERRY, B. R. Nematophagous fungi and the regulation of nematode population in soil. **Helminthological Abstract**, Wallingford, v. 53, p. 1-14, 1984.

LEE, D. L. ATKINSON, H. J. **Physiology of nematodes**. New York: Columbia University, 1977. 215 p.

LIU, W. et al. Antagonistic activities of volatiles from four strains of *Bacillus* spp. and *Paenibacillus* spp. against soil-borne plant pathogens. **Agricultural Sciences in China**, Beijing, v.7, n. 9, p.1104-1114, Sept. 2008.

MAXIMINIANO, C. et al. Flutuação populacional de *Meloidogyne exigua* em cafezal infestado por *Pasteuria penetrans*. **Nematologia Brasileira**, Campinas, v. 25, n. 1, p. 63-69, jun. 2001.

MENDOZA, A. R.; SIKORA, R. A. Biological control of *Radopholus similis* in banana by combined application of the mutualistic endophyte *Fusarium oxysporum* strain 162, the egg pathogen *Paecilomyces lilacinus* strain 251 and the antagonistic bacteria *Bacillus firmus*. **BioControl**, Dordrecht, v. 54, n. 2, p. 263-272, Apr. 2009.

MIZOBUTZI, E. H. et al. Isolamento de fungos de ovos de *Heterodera glycines* coletados em diferentes regiões produtoras de soja no Brasil. **Nematologia Brasileira**, Campinas, v. 23, n. 2, p. 69-75, dez. 1999.

MORGAN-JONES, G.; RODRIGUEZ-KABANA, R. Fungi colonizing cysts and eggs. In: POINAR, G. O.; JANSSON, H. B. **Diseases of nematodes**. Boca Raton: CRC Press, 1988. v. 2, p. 39-58.

NIGH, E. A.; THOMASON, I. J.; GUNDY, S. D. van. Identification and distribution of fungal parasites of *Heterodera schachtii* eggs in California. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 70, p. 884-889, 1980.

OLIVEIRA, D. F. et al. Selection of rhizobacteria able to produce metabolites active against *Meloidogyne exigua*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 119, n. 4, p. 477-479, Dec. 2007.

OLIVEIRA, D. F. et al. The activity of amino acids produced by *Paenibacillus macerans* and from commercial sources against the root-Knot nematode *Meloidogyne exigua*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 124, n. 1, p. 57-63, May 2009.

PINHO, R. S. C. et al. Efeito de bactérias endofíticas no controle de *Meloidogyne incognita* e sua capacidade de colonização de raízes de tomateiro. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 33, n. 1, p. 54-60, 2008.

POINAR, G. O. J.; JANSSON, H. B. **Diseases of nematodes**. Boca Raton: CRC Press, 1988. v. 1, 149 p.

RIBEIRO, R. C. F.; CAMPOS, V. P. Controle de *Meloidogyne javanica* com fungos parasitas de ovos. **Nematologia Brasileira**, Campinas, v. 17, n. 2, p. 193-202, 1993.

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

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, 1974.

SIDDIQUI, I. A.; EHTESHAMUL-HAQUE, S. Suppression of the root rot-root knot disease complex by *Pseudomonas aeruginosa* in tomato: influence of inoculum density, nematode population, moisture and other plant-associated bacteria. **Plant and Soil**, The Hague, v. 237, n. 1/2, p. 81-89, Dec. 2001.

SIDDIQUI, I. A.; EHTESHAMUL-HAQUE, S. Use of *Pseudomonas aeruginosa* for the control of root rot-root knot disease complex in tomato. **Nematologia Mediterranea**, Bari, v. 28, p. 189-192, 2000.

SIKORA, R. A.; BRIDGE, J.; STARR, J. L. Management practices: an overview of integrated nematode management technologies. In: LUC, M.; SIKORA, R. A.; BRIDGE, J. (Ed.). **Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture**. Wallingford: CABI, 2005. chap. 22, p. 793-825.

SILVA, J. R. C. et al. Bactérias endofíticas no controle e inibição *in vitro* de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, agente da pinta bacteriana do tomateiro **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 4, p. 1062-1072, July/Aug. 2008.

SILVA, L. G. S.; ABREU, L. M.; PFLNNING, L. H. Metodologia para estudo de fungos de solo. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTIFICA DA UFLA, 8.; CONGRESSO DE EXTENSÃO, 1.; SEMINÁRIO DE AVALIAÇÃO do PIBIC/CNPq, 13.; SEMINÁRIO DE AVALIAÇÃO DO PBIICT/FAPEMIG, 8.,2005, Lavras. **Resumos...** Lavras: ULFA, 2005. p. 255.

SOUZA, R. M.; VOLPATO, A. R.; VIANA, A. P. Epidemiology of *Meloidogyne exigua* in an upland coffee plantation in Brazil, **Nematologia Mediterranea**, Bari, v. 36, p. 13-17, 2008.

SUN, M. H. et al. Fungi and actinomycetes associated with *Meloidogyne* spp. Eggs and females in China and their biocontrol potential. **Journal Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 93, n. 1, p. 22-28, Sept. 2006.

TRIFONOVA, Z.; KARADJOVA, J.; GEORGIEVA, T. Fungal parasites of the root-knot nematodes *Meloidogyne* spp. in southern Bulgaria. **Estonian Journal of Ecology**, v. 58, n. 1, p. 47-52, 2009.

VIEIRA, H. D. Coffee: The plant and its cultivation. In. SOUZA, R. M. **Plant-parasitic nematodes of coffee**. [S.l.]: Springer Science Business Media, 2008. p. 3-18.

VU, T. T.; HAUSCHILD, R.; SIKORA, R. A. *Fusarium oxysporum* endophytes induced systemic resistance against *Radopholus similis* on banana. **Nematology**, Leiden, v. 8, n. 2, p. 847-852, 2006.

WAN, M. et al. Effect of volatile substances of *Streptomyces platensis* F-1 on control of plant fungal diseases. **Biological Control**, Orlando, v. 46, n. 3, p. 552-559, Sept. 2008.

WESTPHAL, A.; BECKER, J. O. Components of soil supressiveness against *Heterodera schachtii*. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 33, n. 1, p. 9-16, Jan. 2001.

WHEATLEY, R. E. The consequences of volatile organic compound mediated bacterial and fungal interactions. **Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 81, n. 1/4, p. 357-364, Dec. 2002.

ZOU, C. S. et al. Possible contributions of volatile-producing bacteria to soil fungistasis. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 39, n. 9, p. 2371-2379, Sept. 2007.

## ANEXOS

Tabela 1A Número de J2 no solo encontrado em 17 propriedades do Sul de Minas, MG, em cinco coletas realizadas em julho de 2009 (1ª coleta), abril, maio, junho e julho de 2010 (2ª, 3ª, 4ª e 5ª coletas).

Propriedades cafeeiras	Julho/09	Abril/10	Maior/10	Junho/10	Julho/10	média
	Nº/ J <sub>2</sub>					
1*	12	38	42	42	19	33,50 a
2	36	28	60	130	115	63,50 a
3	54	82	30	51	16	50,75 a
4	4	14	64	22	59	26,00 a
5*	28	72	32	111	70	60,75 a
6*	16	144	70	22	43	63,00 a
7	16	46	16	108	135	46,50 a
8	16	42	34	77	53	42,25 a
9	76	56	222	218	27	143,00 b
10*	8	32	24	21	43	21,25 a
11	4	14	16	22	57	14,00 a
12	26	26	150	96	24	74,50 a
13	20	20	26	125	17	47,75 a
14	28	34	26	47	33	53,25 a
15	148	196	133	57	16	133,50 b
16	48	141	206	168	27	140,70 b
17	113	102	290	168	43	168,25 b

As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Scott e Knott a 5 % de probabilidade

Tabela 2A Porcentagem de infestação dos ovos de *Meloidogyne exigua* em raízes cafeeiras coletadas em 17 propriedades do Sul de Minas, MG, em quatro coletas realizadas em julho de 2009 (1<sup>a</sup> coleta), abril, maio e julho de 2010 (2<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> coletas)

Propriedades cafeeiras	Infestação (%)				
	Julho/09	abril/10	maio/10	julho/10	média
1*	93	90	16	80	70a
2	85	91	42	86	76a
3	88	99	43	87	79a
4	87	70	22	76	64a
5*	39	67	58	88	63a
6*	97	84	29	80	73a
7	90	81	29	100	75a
8	95	79	26	64	66a
9	89	76	54	83	76a
10*	81	87	46	71	71a
11	95	88	78	58	80a
12	73	89	37	65	66a
13	90	91	30	77	72a
14	86	84	66	81	79a
15	96	71	24	71	66a
16	98	85	44	68	74a
17	97	94	56	83	83a

As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Scott e Knott a 5 % de probabilidade

Tabela 3A Procedência e localização das amostras colhidas nas fazendas produtoras de café da região Sul de Minas, estado de Minas Gerais

<b>Amostra número</b>	<b>Nomes</b>	<b>Município</b>
1	Euripdes Sergio	Capetinga
2	Sebastião Ferreira Rosa	Capetinga
3	Osmar Alves Pereira (Mundo Novo)	Ibiraci
4	Adelcio Peixoto	Ibiraci
5	Charleston Tadeu Faleiras	Capetinga
6	José Donizete Faleiras	Capetinga
7	Itamar Avelino Arantes	Capetinga
8	Ronaldo Antônio Ferreira	Capetinga
9	Ulisses Faleiras	Capetinga
10	Vicente Alves Arantes	Capetinga
11	Osmar Alves Pereira (Catuai)	Ibiraci
12	Jose Luiz Silva Junior	Capetinga
13	Norton Beltoldi	Capetinga
14	Francisco de Assis Brandão	Capetinga
15	Cleomar de Andrade Pereira	Ibiraci
16	Mauricio Donizete Lourinho	Ibiraci
17	Michel Machado de Oliveira	Ibiraci