

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON**

SIDIANE COLTRO RONCATO

**EXTRATO DE *Crambe abyssinica* E O CONSTITUINTE ALIL ISOTIOCIANATO NO
CONTROLE DE *Meloidogyne incognita* E *Meloidogyne javanica* EM TOMATEIRO**

MARECHAL CÂNDIDO RONDON - PARANÁ

2015

SIDIANE COLTRO RONCATO

**EXTRATO DE *Crambe abyssinica* E O CONSTITUINTE ALIL ISOTIOCIANATO NO
CONTROLE DE *Meloidogyne incognita* E *Meloidogyne javanica* EM TOMATEIRO**

Tese apresentada à Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, para obtenção do título de Doctor Scientiae.

Orientador: José Renato Stangarlin

Coorientador: Affonso Celso Gonçalves Júnior

Coorientador: Odair José Kuhn

MARECHAL CÂNDIDO RONDON - PARANÁ

2015

À Deus,

Aos meus pais Dinor e Marina Laura

Ao meu marido João Paulo

Às minhas irmãs Sonia e Solange

Aos meus sobrinhos (as) Artur, Ester, Iara

e Samuel

Aos meus amigos

Dedico!!!

AGRADECIMENTOS

Ao meu Senhor Jesus Cristo, força e conforto presente nas minhas tribulações.

Aos meus pais, por serem inspiração para lutar, sempre se esforçaram para meu sucesso, pelo amor, educação e incentivo.

Ao meu marido que não mediu esforços para a realização desta etapa em minha vida, pela paciência e compreensão quando ausente em casa, pelo amor, respeito e por fazer minha vida mais feliz e completa.

Às minhas irmãs, grandes incentivadoras, sempre transmitindo boas energias para que eu realizasse esta etapa em minha vida, amigas e confidentes.

Aos meus sobrinhos que me fizeram sorrir em muitos momentos de tribulações, e pela compreensão das poucas visitas da tia e madrinha.

À Universidade Estadual do Oeste do Paraná e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia pela oportunidade de realizar o curso e à CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Ao meu professor orientador José Renato Stangarlin, pela amizade, paciência, pela excelente orientação, pelos ensinamentos, e por servir de inspiração para dar o melhor de mim, agradeço por um dia ter apostado em mim, e me confiado a direção deste trabalho.

Ao professor Odair José Kuhn, pelos ensinamentos repassados, apoio e pela amizade.

Ao meu coorientador Affonso Celso Gonçalves Júnior, que sempre deixou à disposição o laboratório de química para o preparo dos extratos, empréstimo de solventes e serviu de inspiração para trabalhar com crambe.

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná por permitir o uso de HPLC e solventes para realização das análises.

Ao professor Éder Lisandro de Moraes Flores pela disponibilidade, paciência, atenção, pelo conhecimento transmitido e auxílio nas análises em HPLC, sua colaboração foi imprescindível para realização do trabalho.

Em especial aos amigos, colegas e todos que se fizeram presente neste período importante da minha vida, agradeço.

*“Hoje me sinto mais forte, mais feliz, quem sabe,
Só levo a certeza, de que muito pouco sei, ou nada sei
É preciso amor, pra poder pulsar,
É preciso paz pra poder sorrir,
É preciso a chuva para florir
Todo mundo ama um dia, todo mundo chora
Um dia a gente chega, e no outro vai embora
Cada um de nós compõe a sua história, cada ser em si
Carrega o dom de ser capaz e ser feliz”*

(Almir Sater)

LISTA DE FIGURAS

- Figura 4.1 - Efeito das doses dos extratos metanólico, hidroalcoólico e triturado de folhas de *Crambe abyssinica* sobre a eclosão de ovos de *Meloidogyne incognita*. *Letras iguais entre o tratamento químico e cada dose dentro de cada extrato, não diferem entre si pelo teste Dunnett à 5% de probabilidade. Marechal Cândido Rondon, PR, 2013. 46
- Figura 4.2 - Efeito das doses dos extratos metanólico, hidroalcoólico e triturado de folhas de *Crambe abyssinica* sobre a motilidade de juvenis de *Meloidogyne incognita*. *Letras iguais entre o tratamento químico e cada dose dentro de cada extrato, não diferem entre si pelo teste Dunnett à 5% de probabilidade. Marechal Cândido Rondon, PR, 2013. 47
- Figura 4.3- Efeito das doses dos extratos metanólico, hidroalcoólico e triturado de folhas de *Crambe abyssinica* sobre a mortalidade de juvenis de *Meloidogyne incognita*. *Letras iguais entre o tratamento químico e cada dose dentro de cada extrato, não diferem entre si pelo teste Dunnett à 5% de probabilidade. Marechal Cândido Rondon, PR, 2013. 48
- Figura 4.4 - Efeito das doses dos extratos metanólico, hidroalcoólico e triturado de folhas de *Crambe abyssinica* sobre a eclosão de ovos de *Meloidogyne javanica*. *Letras iguais entre o tratamento químico e cada dose dentro de cada extrato, não diferem entre si pelo teste Dunnett à 5% de probabilidade. Marechal Cândido Rondon, PR, 2013. 49
- Figura 4.5 - Efeito das doses dos extratos metanólico, hidroalcoólico e triturado de folhas de *Crambe abyssinica* sobre a motilidade de juvenis de *Meloidogyne javanica*. *Letras iguais entre o tratamento químico e cada dose dentro de cada extrato, não diferem entre si pelo teste Dunnett à 5% de probabilidade. Marechal Cândido Rondon, PR, 2013. 50
- Figura 4.6 - Efeito das doses dos extratos metanólico, hidroalcoólico e triturado de folhas de *Crambe abyssinica* sobre a motilidade de juvenis de *Meloidogyne javanica*. *Letras iguais entre o tratamento químico e cada dose dentro de cada extrato, não diferem entre si pelo teste Dunnett à 5% de probabilidade. Marechal Cândido Rondon, PR, 2013. 51
- Figura 4.7 - Concentração de alil isotiocianato do extrato hidroalcoólico (A) e metanólico (B) de folhas de *Crambe abyssinica*. O anexo (C) compara a concentração de cada solvente. *Concentração seguida da mesma letra na coluna não difere entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Marechal Cândido Rondon, PR, 2013. 52

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 - Efeito de extratos de folhas de <i>Crambe abyssinica</i> sobre a eclosão de ovos, motilidade e mortalidade de <i>Meloidogyne incognita</i> . Marechal Cândido Rondon, PR, 2013...	44
Tabela 4.2 - Efeito de extratos de folhas de <i>Crambe abyssinica</i> sobre a eclosão de ovos, motilidade e mortalidade de <i>Meloidogyne javanica</i> . Marechal Cândido Rondon, PR, 2013...	45
Tabela 5.1 - Massa de ovos em raízes de tomateiro inoculados com <i>Meloidogyne incognita</i> , na qual as raízes das plantas de tomateiro foram tratadas com extrato de <i>Crambe abyssinica</i> , e as mesmas plantas receberam o extrato em diferentes vias e em épocas distintas de aplicação, sendo antes da inoculação (três dias após o transplante das mudas); na inoculação (sete dias após o transplante); após a inoculação (uma semana após a inoculação); e semanalmente até aos 45 dias após a inoculação (incluindo as demais aplicações), o tratamento adicional é representado pela testemunha inoculada e não tratada. Marechal Cândido Rondon, abril de 2014.*	64
Tabela 5.2 - Galhas totais em raízes de tomateiro inoculados com <i>Meloidogyne incognita</i> , na qual as raízes das plantas de tomateiro foram tratadas com extrato de <i>Crambe abyssinica</i> , e as mesmas plantas receberam o extrato em diferentes vias e em épocas distintas de aplicação, sendo antes da inoculação (três dias após o transplante das mudas); na inoculação (sete dias após o transplante); após a inoculação (uma semana após a inoculação); e semanalmente até aos 45 dias após a inoculação (incluindo as demais aplicações), o tratamento adicional é representado pela testemunha inoculada e não tratada. Marechal Cândido Rondon, abril de 2014.*	66
Tabela 5.3 - Massa de ovos (MO) e galhas totais (GT) em raízes de tomateiro inoculados com <i>Meloidogyne incognita</i> , na qual a planta foi tratada com extrato de <i>Crambe abyssinica</i> em diferentes vias e em épocas distintas de aplicação, sendo após a inoculação (uma semana após a inoculação) e semanalmente até aos 45 dias após a inoculação, a testemunha é considerada como tratamento adicional e é representado por plantas inoculadas e não tratadas. Marechal Cândido Rondon, outubro de 2014.*	68
Tabela 5.4 - Ovos e juvenis de segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne incognita</i> por grama de raiz, na qual as raízes das plantas de tomateiro foram tratadas com extrato de <i>Crambe abyssinica</i> , e as mesmas plantas receberam o extrato em diferentes vias e em épocas distintas de aplicação, sendo antes da inoculação (três dias após o transplante das mudas); na inoculação (sete dias após o transplante); após a inoculação (uma semana após a inoculação); e semanalmente até aos 45 dias após a inoculação (incluindo as demais aplicações), o tratamento adicional é representado pela testemunha inoculada e não tratada. Marechal Cândido Rondon, abril de 2014.*	69

Tabela 5.5 - Ovos e juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita* por 100 cm³ de solo, na qual as raízes das plantas de tomateiro foram tratadas com extrato de *Crambe abyssinica*, e as mesmas plantas receberam o extrato em diferentes vias e em épocas distintas de aplicação, sendo antes da inoculação (três dias após o transplante das mudas); na inoculação (sete dias após o transplante); após a inoculação (uma semana após a inoculação); e semanalmente até aos 45 dias após a inoculação (incluindo as demais aplicações), o tratamento adicional é representado pela testemunha inoculada e não tratada. Marechal Cândido Rondon, abril de 2014.* 70

Tabela 5.6 - Ovos e juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita* por grama de raiz e por 100 cm³ de solo, na qual a planta foi tratada com extrato de *Crambe abyssinica* em diferentes vias e em épocas distintas de aplicação, sendo após a inoculação (uma semana após a inoculação) e semanalmente até aos 45 dias após a inoculação, a testemunha é considerada como tratamento adicional e é representado por plantas inoculadas e não tratadas. Marechal Cândido Rondon, outubro de 2014.* 71

Tabela 5.7 - Viabilidade de massa de ovos de *Meloidogyne incognita*, na qual a planta de tomateiro foi tratada com extrato de *Crambe abyssinica* em diferentes vias e em épocas distintas de aplicação, sendo após a inoculação (uma semana após a inoculação) e semanalmente até aos 45 dias após a inoculação, a testemunha é considerada como tratamento adicional e é representado por plantas inoculadas e não tratadas. Marechal Cândido Rondon, outubro de 2014. 72

Tabela 6.1 - Massa de ovos em raízes de tomateiro inoculados com *Meloidogyne incognita*, na qual as raízes das plantas de tomateiro foram tratadas com extrato de *Crambe abyssinica*, e as mesmas plantas receberam o extrato em diferentes vias e em épocas distintas de aplicação, sendo antes da inoculação (três dias após o transplante das mudas); na inoculação (sete dias após o transplante); após a inoculação (uma semana após a inoculação); e semanalmente até aos 45 dias após a inoculação (incluindo as demais aplicações), o tratamento adicional é representado pela testemunha inoculada e não tratada. Marechal Cândido Rondon, abril de 2014.* 83

Tabela 6.2.- Galhas totais em raízes de tomateiro inoculados com *Meloidogyne incognita*, na qual as raízes das plantas de tomateiro foram tratadas com extrato de *Crambe abyssinica*, e as mesmas plantas receberam o extrato em diferentes vias e em épocas distintas de aplicação, sendo antes da inoculação (três dias após o transplante das mudas); na inoculação (sete dias após o transplante); após a inoculação (uma semana após a inoculação); e semanalmente até aos 45 dias após a inoculação (incluindo as demais aplicações), o tratamento adicional é representado pela testemunha inoculada e não tratada. Marechal Cândido Rondon, abril de 2014.* 85

Tabela 6.3 - Massa de ovos (MO) e galhas totais (GT) em raízes de tomateiro inoculados com *Meloidogyne incognita*, na qual as raízes das plantas de tomateiro foram tratadas com extrato de *Crambe abyssinica*, e as mesmas plantas receberam o extrato em diferentes vias e em épocas distintas de aplicação, sendo após a inoculação (uma semana após a inoculação); e semanalmente até aos 45 dias após a inoculação, o tratamento adicional é representado pela testemunha inoculada e não tratada. Marechal Cândido Rondon, outubro de 2014.* 88

Tabela 6.4 - Ovos e juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita* por grama de raiz, na qual as raízes das plantas de tomateiro foram tratadas com extrato de *Crambe abyssinica*, e as mesmas plantas receberam o extrato em diferentes vias e em épocas distintas de aplicação, sendo antes da inoculação (três dias após o transplante das mudas); na inoculação (sete dias após o transplante); após a inoculação (uma semana após a inoculação); e semanalmente até aos 45 dias após a inoculação (incluindo as demais aplicações), o tratamento adicional é representado pela testemunha inoculada e não tratada. Marechal Cândido Rondon, abril de 2014.* 89

Tabela 6.5 - Ovos e juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita* por 100 cm³ de solo, na qual as raízes das plantas de tomateiro foram tratadas com extrato de *Crambe abyssinica*, e as mesmas plantas receberam o extrato em diferentes vias e em épocas distintas de aplicação, sendo antes da inoculação (três dias após o transplante das mudas); na inoculação (sete dias após o transplante); após a inoculação (uma semana após a inoculação); e semanalmente até aos 45 dias após a inoculação (incluindo as demais aplicações), o tratamento adicional é representado pela testemunha inoculada e não tratada. Marechal Cândido Rondon, abril de 2014.* 91

Tabela 6.6 - Ovos e juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita* por grama de raiz e por 100 cm³ de solo, na qual as raízes das plantas de tomateiro foram tratadas com extrato de *Crambe abyssinica*, e as mesmas plantas receberam o extrato em diferentes vias e em épocas distintas de aplicação, sendo após a inoculação (uma semana após a inoculação); e semanalmente até aos 45 dias após a inoculação, o tratamento adicional é representado pela testemunha inoculada e não tratada. Marechal Cândido Rondon, outubro de 2014.* 92

Tabela 6.7 - Viabilidade de massa de ovos de *Meloidogyne incognita*, na qual as raízes das plantas de tomateiro foram tratadas com extrato de *Crambe abyssinica*, e as mesmas plantas receberam o extrato em diferentes vias e em épocas distintas de aplicação, sendo após a inoculação (uma semana após a inoculação); e semanalmente até aos 45 dias após a inoculação, o tratamento adicional é representado pela testemunha inoculada e não tratada. Marechal Cândido Rondon, outubro de 2014.* 93

Tabela 7.1- Massa de ovos em raízes de tomateiro inoculados com *Meloidogyne javanica*, na qual as raízes das plantas de tomateiro foram tratadas com extrato de *Crambe abyssinica*, e as mesmas plantas receberam o extrato em diferentes vias e em épocas distintas de aplicação, sendo antes da inoculação (três dias após o transplante das mudas); na inoculação (sete dias após o transplante); após a inoculação (uma semana após a inoculação); e semanalmente até aos 45 dias após a inoculação (incluindo as demais aplicações), o tratamento adicional é representado pela testemunha inoculada e não tratada. Marechal Cândido Rondon, abril de 2014.* 104

Tabela 7.2 - Galhas totais em raízes de tomateiro inoculados com *Meloidogyne javanica*, na qual as raízes das plantas de tomateiro foram tratadas com extrato de *Crambe abyssinica*, e as mesmas plantas receberam o extrato em diferentes vias e em épocas distintas de aplicação, sendo antes da inoculação (três dias após o transplante das mudas); na inoculação (sete dias após o transplante); após a inoculação (uma semana após a inoculação); e semanalmente até aos 45 dias após a inoculação (incluindo as demais aplicações), o tratamento adicional é representado pela testemunha inoculada e não tratada. Marechal Cândido Rondon, abril de 2014.* 106

- Tabela 7.3 - Massa de ovos (MO) e galhas totais (GT) em raízes de tomateiro inoculados com *Meloidogyne javanica*, na qual a planta foi tratada com extrato de *Crambe abyssinica* em diferentes vias e em épocas distintas de aplicação, sendo após a inoculação (uma semana após a inoculação) e semanalmente até aos 45 dias após a inoculação, a testemunha é considerada como tratamento adicional e é representado por plantas inoculadas e não tratadas. Marechal Cândido Rondon, outubro de 2014.* 107
- Tabela 7.4 - Ovos e juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* por grama de raiz, na qual as raízes das plantas de tomateiro foram tratadas com extrato de *Crambe abyssinica*, e as mesmas plantas receberam o extrato em diferentes vias e em épocas distintas de aplicação, sendo antes da inoculação (três dias após o transplante das mudas); na inoculação (sete dias após o transplante); após a inoculação (uma semana após a inoculação); e semanalmente até aos 45 dias após a inoculação (incluindo as demais aplicações), o tratamento adicional é representado pela testemunha inoculada e não tratada. Marechal Cândido Rondon, abril de 2014.* 109
- Tabela 7.5 - Ovos e juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* por 100 cm³ de solo, na qual as raízes das plantas de tomateiro foram tratadas com extrato de *Crambe abyssinica*, e as mesmas plantas receberam o extrato em diferentes vias e em épocas distintas de aplicação, sendo antes da inoculação (três dias após o transplante das mudas); na inoculação (sete dias após o transplante); após a inoculação (uma semana após a inoculação); e semanalmente até aos 45 dias após a inoculação (incluindo as demais aplicações), o tratamento adicional é representado pela testemunha inoculada e não tratada. Marechal Cândido Rondon, abril de 2014.* 111
- Tabela 7.6 - Juvenis de segundo estágio (J2) e ovos de *Meloidogyne javanica* por grama de raiz e por 100 cm³ de solo, na qual a planta foi tratada com extrato de *Crambe abyssinica* em diferentes vias e em épocas distintas de aplicação, sendo após a inoculação (uma semana após a inoculação) e semanalmente até aos 45 dias após a inoculação, a testemunha é considerada como tratamento adicional e é representado por plantas inoculadas e não tratadas. Marechal Cândido Rondon, outubro de 2014.* 112
- Tabela 7.7 - Viabilidade de massa de ovos de *Meloidogyne javanica*, na qual a planta de tomateiro foi tratada com extrato de *Crambe abyssinica* em diferentes vias e em épocas distintas de aplicação, sendo após a inoculação (uma semana após a inoculação) e semanalmente até aos 45 dias após a inoculação, a testemunha é considerada como tratamento adicional e é representado por plantas inoculadas e não tratadas. Marechal Cândido Rondon, outubro de 2014. 113
- Tabela 8.1 - Massa de ovos em raízes de tomateiro inoculados com *Meloidogyne javanica*, na qual as raízes das plantas de tomateiro foram tratadas com extrato de *Crambe abyssinica*, e as mesmas plantas receberam o extrato em diferentes vias e em épocas distintas de aplicação, sendo antes da inoculação (três dias após o transplante das mudas); na inoculação (sete dias após o transplante); após a inoculação (uma semana após a inoculação); e semanalmente até aos 45 dias após a inoculação (incluindo as demais aplicações), o tratamento adicional é representado pela testemunha inoculada e não tratada. Marechal Cândido Rondon, abril de 2014.* 126

Tabela 8.2 - Galhas totais em raízes de tomateiro inoculados com *Meloidogyne javanica*, na qual as raízes das plantas de tomateiro foram tratadas com extrato de *Crambe abyssinica*, e as mesmas plantas receberam o extrato em diferentes vias e em épocas distintas de aplicação, sendo antes da inoculação (três dias após o transplante das mudas); na inoculação (sete dias após o transplante); após a inoculação (uma semana após a inoculação); e semanalmente até aos 45 dias após a inoculação (incluindo as demais aplicações), o tratamento adicional é representado pela testemunha inoculada e não tratada. Marechal Cândido Rondon, abril de 2014.* 128

Tabela 8.3 - Massa de ovos (MO) e galhas totais (GT) em raízes de tomateiro inoculados com *Meloidogyne javanica*, na qual as raízes das plantas de tomateiro foram tratadas com extrato de *Crambe abyssinica*, e as mesmas plantas receberam o extrato em diferentes vias e em épocas distintas de aplicação, sendo após a inoculação (uma semana após a inoculação); e semanalmente até aos 45 dias após a inoculação, o tratamento adicional é representado pela testemunha inoculada e não tratada. Marechal Cândido Rondon, outubro de 2014.* 130

Tabela 8.4 - Ovos e juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* por grama de raiz, na qual as raízes das plantas de tomateiro foram tratadas com extrato de *Crambe abyssinica*, e as mesmas plantas receberam o extrato em diferentes vias e em épocas distintas de aplicação, sendo antes da inoculação (três dias após o transplante das mudas); na inoculação (sete dias após o transplante); após a inoculação (uma semana após a inoculação); e semanalmente até aos 45 dias após a inoculação (incluindo as demais aplicações), o tratamento adicional é representado pela testemunha inoculada e não tratada. Marechal Cândido Rondon, abril de 2014.* 131

Tabela 8.5 - Ovos e juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* por 100 cm³ de solo, na qual as raízes das plantas de tomateiro foram tratadas com extrato de *Crambe abyssinica*, e as mesmas plantas receberam o extrato em diferentes vias e em épocas distintas de aplicação, sendo antes da inoculação (três dias após o transplante das mudas); na inoculação (sete dias após o transplante); após a inoculação (uma semana após a inoculação); e semanalmente até aos 45 dias após a inoculação (incluindo as demais aplicações), o tratamento adicional é representado pela testemunha inoculada e não tratada. Marechal Cândido Rondon, abril de 2014.* 133

Tabela 8.6 - Junvenis de segundo estágio (J2) e ovos de *Meloidogyne javanica* por grama de raiz e 100 cm³ de solo, na qual as raízes das plantas de tomateiro foram tratadas com extrato de *Crambe abyssinica*, e as mesmas plantas receberam o extrato em diferentes vias e em épocas distintas de aplicação, sendo após a inoculação (uma semana após a inoculação); e semanalmente até aos 45 dias após a inoculação, o tratamento adicional é representado pela testemunha inoculada e não tratada. Marechal Cândido Rondon, outubro de 2014.* 134

SUMÁRIO

RESUMO	xiv
ABSTRACT	xv
1 INTRODUÇÃO.....	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 A CULTURA DO TOMATE.....	18
2.2 <i>Meloidogyne</i> EM TOMATEIRO.....	18
2.3 INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA A NEMATÓIDES	21
2.4 GLICOSINOLATOS E DERIVADOS SOBRE <i>Meloidogyne</i>	23
2.5 IDENTIFICAÇÃO DE DERIVADOS DE GLICOSINOLATOS	25
2.6 A ESPÉCIE <i>Crambe abyssinica</i> Hochst	26
2.7 CONTROLE ALTERNATIVO DE <i>Meloidogyne</i> POR EXTRATOS VEGETAIS	27
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29
4 CAPÍTULO 1 - AÇÃO NEMATICIDA DE ALIL ISOTIOCIANATO DE CRAMBE SOBRE <i>Meloidogyne spp.</i>	37
RESUMO	37
ABSTRACT	38
4.1 INTRODUÇÃO.....	39
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	40
4.2.1 Obtenção e Identificação de <i>Meloidogyne incognita</i> e <i>Meloidogyne javanica</i>	40
4.2.2 Extração e Quantificação de <i>Meloidogyne incognita</i> e <i>Meloidogyne javanica</i>	40
4.2.3 Ensaio 1 - Extratos de Crambe	41
4.2.4 Ensaio 2 - Doses dos Extratos de Crambe.....	42
4.2.5 Atividade Nematicida e Nematostática	42
4.2.6 Ensaio 3 - Quantificação e Identificação de Isotiocianato nos Extratos de Crambe	42
4.2.7 Análise Estatística	43
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.3.1 Ensaio 1 - Efeito dos Extratos de Crambe.....	43
4.3.2 Ensaio 2 - Efeito das Doses dos Extratos de Crambe.....	45
4.3.3 Ensaio 3 - Quantificação e Identificação de Isotiocianato nos Extratos de Crambe	52
4.4 CONCLUSÃO.....	54
4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
5 CAPÍTULO 2 - CONTROLE DE <i>Meloidogyne incognita</i> EM TOMATEIRO POR DIFERENTES FORMAS DE APLICAÇÃO DO EXTRATO DE <i>Crambe abyssinica</i>	57
RESUMO	57

ABSTRACT	58
5.1 INTRODUÇÃO.....	59
5.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	60
5.2.1 Condução do Experimento	60
5.2.2 Variáveis Analisadas	61
5.2.2.1 Massa de Ovos e Galhas Totais nas Raízes.....	61
5.2.2.2 Número de Ovos e Juvenis de Segundo Estádio (J2) por grama (g) de Raiz.....	61
5.2.2.3 Número de Ovos e J2 por 100 cm ³ de Solo.....	62
5.2.3 Primeiro Experimento	62
5.2.4 Segundo Experimento	63
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
5.4 CONCLUSÃO.....	72
5.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
6 CAPÍTULO 3 - EXTRATO DE <i>Crambe abyssinica</i> NO CONTROLE DE <i>Meloidogyne incognita</i> POR IMERSÃO DAS RAÍZES DE TOMATEIRO ASSOCIADA A OUTRAS VIAS DE APLICAÇÃO.....	76
RESUMO	76
ABSTRACT	77
6.1 INTRODUÇÃO.....	78
6.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	79
6.2.1 Condução do Experimento	79
6.2.2 Variáveis Analisadas	80
6.2.2.1 Massa de Ovos e Galhas Totais nas Raízes.....	80
6.2.2.2 Número de Ovos e Juvenis de Segundo Estádio (J2) por grama de Raiz.....	81
6.2.2.3 Número de Ovos e J2 por 100 cm ³ de Solo.....	81
6.2.3 Primeiro Experimento	81
6.2.4 Segundo Experimento	82
6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	83
6.4 CONCLUSÃO.....	93
6.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93
7 CAPÍTULO 4 - CONTROLE DE <i>Meloidogyne javanica</i> EM TOMATEIRO POR DIFERENTES FORMAS DE APLICAÇÃO DO EXTRATO DE <i>Crambe abyssinica</i>	97
RESUMO	97
ABSTRACT	98
7.1 INTRODUÇÃO.....	99

7.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	100
7.2.1 Condução do Experimento	100
7.2.2 Variáveis Analisadas	101
7.2.2.1 Massa de Ovos e Galhas Totais nas Raízes	101
7.2.2.2 Número de Ovos e Juvenis de Segundo Estádio (J2) por grama de Raiz.....	102
7.2.2.3 Número de Ovos e J2 por 100 cm ³ de Solo.....	102
7.2.3 Primeiro Experimento	102
7.2.4 Segundo Experimento	103
7.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	104
7.4 CONCLUSÃO.....	114
7.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	114
8 CAPÍTULO 5 – CONTROLE DE <i>Meloidogyne javanica</i> EM TOMATEIRO POR EXTRATO DE <i>Crambe abyssinica</i>	119
RESUMO	119
ABSTRACT	120
8.1 INTRODUÇÃO.....	121
8.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	122
8.2.1 Condução do Experimento	122
8.2.2 Variáveis Analisadas	123
8.2.2.1 Massa de Ovos e Galhas Totais nas Raízes	123
8.2.2.2 Número de Ovos e Juvenis de Segundo Estádio (J2) por grama de Raiz.....	124
8.2.2.3 Número de Ovos e J2 por 100 cm ³ de Solo.....	124
8.2.3 Primeiro Experimento	124
8.2.4 Segundo Experimento	125
8.3 RESULTADOS E DICUSSÃO.....	126
8.4 CONCLUSÃO.....	135
8.5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	135
9 CONCLUSÕES GERAIS	140

RESUMO

COLTRO-RONCATO, Sidiane. Dr. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Agosto de 2015. **Extrato de *Crambe abyssinica* e o constituinte alil isotiocianato no controle de *Meloidogyne incognita* e *Meloidogyne javanica* em tomateiro.** Orientador: José Renato Stangarlin. Coorientador: Affonso Celso Gonçalves Júnior. Coorientador: Odair José Kuhn.

O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito do extrato de folhas de *Crambe abyssinica* no controle de *Meloidogyne incognita* e *Meloidogyne javanica* em tomateiro e, possível atuação do componente alil isotiocianato nesta interação. Foram conduzidos cinco experimentos. O primeiro experimento foi realizado com ambas as espécies de *Meloidogyne in vitro*: folhas secas de crambe (200 mg L^{-1}) foram adicionadas nos solventes: água para infusão e trituração, acetona, água+álcool etílico, álcool metílico, hexano e clorofórmio. Após a evaporação rotativa, os extratos aquosos foram analisados *in vitro* para atividade nematicida (eclosão, mortalidade e motilidade de juvenis de segundo estágio (J2)). Após, os extratos com maior atividade foram testados nas doses 200, 300, 400 e 500 mg L^{-1} de folhas secas de crambe. Para quantificar o alil isotiocianato nos extratos foi utilizada cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). O segundo e terceiro experimento foram com *M. incognita* e extrato hidroalcoólico à 250 mg L^{-1} foi utilizado e, cada experimento foi repetido duas vezes, sendo a segunda vez com as duas melhores épocas da primeira. A primeira repetição do segundo experimento foi conduzido em esquema fatorial ($3 \times 4 + 1$) em casa de vegetação, com três vias de aplicação do extrato: foliar; solo; foliar+solo, em quatro épocas: antes da inoculação; na inoculação; após a inoculação; e semanalmente até 45 dias e um tratamento adicional (testemunha inoculada e não tratada). Na segunda repetição, o esquema fatorial foi ($3 \times 2 + 1$), três vias de aplicação como citado anteriormente, e duas épocas (após a inoculação e semanalmente). O terceiro experimento contempla os mesmos tratamentos, porém, nas vias de aplicação é adicionado a imersão das raízes de tomateiro. O quarto e quinto experimentos foram com *M. javanica*, com a mesma metodologia descrita para os experimentos com *M. incognita*. Os resultados dos extratos originados da solução hidroalcoólica, metanólica e por trituração apresentaram-se mais efetivos na ação contra os nematoides, porém, o hidroalcoólico ocasionou maior mortalidade, com 93% e 64% para *M. incognita* e *M. javanica*, respectivamente. O maior efeito foi na dose de 250 mg L^{-1} , e somente os extratos obtidos por solução metanólica e o hidroalcoólica apresentaram alil isotiocianato. Quando o extrato hidroalcoólico foi testado em casa de vegetação em plantas de tomateiro, para *M. incognita* as aplicações via solo e semanalmente não diferiram estatisticamente das aplicações via solo+folha para as variáveis analisadas. Quando foi adicionada a imersão do sistema radicular do tomateiro, aplicações semanais com as vias raiz+solo e raiz+solo+folha se destacaram, e a população do nematoide no solo foi reduzida em 75,55% e 71,95%, respectivamente, porém, o segundo experimento confirmou o controle apenas para a aplicação via raiz+solo+folha. Para *M. javanica*, aplicações do extrato via solo+folha semanalmente ocasionaram redução de galhas totais em 46,15%. Quando adicionada a imersão do sistema radicular, a aplicação semanal via raiz+solo+folha reduziu massa de ovos e galhas totais em 60,95% e 27,95%, respectivamente. Portanto, o extrato de crambe tem potencial para compor o manejo integrado de *M. javanica* e *M. incognita* em tomateiro.

Palavras-chave: *Solanum lycopersicum* L.. Nematóide de galhas. Controle alternativo. Glicosinolato. Cromatografia.

ABSTRACT

COLTRO-RONCATO, Sidiane. Dr. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Agosto de 2015. ***Crambe abyssinica* extract and allyl isothiocyanate constituent on control *Meloidogyne incognita* and control *Meloidogyne javanica* in tomato plants.** Orientador: José Renato Stangarlin. Coorientador: Affonso Celso Gonçalves Júnior. Coorientador: Odair José Kuhn.

The objective of this work was to study the effect of *Crambe abyssinica* leaf extract on *Meloidogyne incognita* and *Meloidogyne javanica* control in tomato plants, and the possible effect of allyl isothiocyanate component in this interaction. Five experiments were conducted. The first experiment was carried out with both *Meloidogyne* species *in vitro*: dried leaves of crambe (200 mg L⁻¹) were added in the solvents: water for infusion and grinding, acetone, water + ethanol, methyl alcohol, hexane and chloroform. After the evaporation rotative, the aqueous extracts were analyzed *in vitro* for nematicide activity (hatching, mortality and motility of second stage juveniles (J2)). After the extracts with increased activity were tested at doses of 200, 300, 400 and 500 mg L⁻¹ of crambe dry leaves. To quantify the allyl isothiocyanate in the extracts was used high performance liquid chromatography (HPLC). The second and third experiment were with *M. incognita* and hydroalcoholic extract to 250 mg L⁻¹ was used, and each experiment was repeated twice, being the second time with the two best times of the first. The first repetition of the second experiment was conducted in factorial design (3x4+1) in a greenhouse, with three extract application routes: leaf; soil; leaf+soil, in four periods: before inoculation; on inoculation; after inoculation; and weekly up to 45 days and an additional treatment (inoculated and untreated control). In the second repetition, the factorial design was (3x2+1), three routes of application as mentioned above, and two periods (after inoculation and weekly). The third experiment includes the same treatments, however, to the application routes is added the immersion of the tomato roots. The fourth and fifth experiments were with *M. javanica*, using the same methodology described for the experiments with *M. incognita*. The results derived from the extracts of hydroalcoholic solution, methanol and trituration were more effective in the action against nematodes, however, the hydroalcoholic one caused higher mortality, with 93% and 64% for *M. incognita* and *M. javanica*, respectively. The greatest effect was on the dose of 250 mg L⁻¹, and only the extracts obtained by methanol solution and the hydroalcoholic presented allyl isothiocyanate. When the hydroalcoholic extract was tested in a greenhouse in tomato plants, to *M. incognita* the applications via soil and weekly did not differ statistically from the applications soil+leaf for the analyzed variables. When the immersion of the tomato plants rooting system was added, weekly applications routes via root+soil and root+soil+leaf stood out, and nematode population in the soil was reduced by 75.55% and 71.95%, respectively, however, the second experiment confirmed the control only to the application via soil+root+leaf. For *M. javanica*, applications of the extract via soil+leaf weekly caused reduction of total galls on 46.15%. When added the immersion of the root system, the weekly application via root+soil+leaf reduced the egg masses and total galls on 60.95% and 27.95%, respectively. Therefore, crambe extract has potential to make up the integrated management of *M. javanica* and *M. incognita* on tomato plants.

Keywords: *Solanum lycopersicum* L.. Root-knot nematode. Alternative control. Glucosinolate. Chromatography.

1 INTRODUÇÃO

O tomateiro é uma cultura de grande importância social e econômica, pois são várias as possibilidades de utilização para o consumo humano. Por ser uma das hortaliças mais consumidas, demanda investimentos para aumentar a produção, tanto por parte da pesquisa como do produtor, para atender a um mercado consumidor cada vez mais exigente em produtos sem contaminação por pesticidas.

Vários são os fatores que interferem na produtividade do tomateiro, e as doenças se destacam nos danos causados em todo o ciclo da cultura. Dentre as doenças estão as galhas radiculares, causadas por nematoides do gênero *Meloidogyne*, que provocam danos expressivos no tomateiro. Essa doença é de difícil controle, pois apresenta elevada gama de hospedeiros, o que dificulta o manejo por rotação de culturas, e os produtos químicos para controle são tóxicos e persistentes, podendo contaminar a água subterrânea e assim trazer prejuízos a sociedade e ao meio ambiente. Cultivares resistentes nem sempre estão disponíveis, e além disso podem proporcionar populações que quebrem a resistência.

Em função destes problemas, a busca por métodos alternativos de controle se fazem necessários. Os vegetais apresentam inúmeros constituintes em seu metabolismo secundário que fazem parte da defesa da planta, e assim proporcionam inúmeras vantagens em comparação aos agrotóxicos, pois, além de não trazer consequências negativas do seu uso para o meio ambiente e para a sociedade, apresentam inúmeros constituintes com amplo modo de ação sobre os patógenos.

O uso de vegetais no controle de nematoides é promissor, uma vez que diversos mecanismos de ação podem estar envolvidos, como nematostático, nematicida, inibição da eclosão de ovos e indutora de resistência em plantas hospedeiras. A indução de resistência busca a ativação de mecanismos de defesa latentes em plantas, por meio de uma agente indutor. Várias são as metodologias de utilização de vegetais, e vários estudos mostram efetivo controle de doenças de plantas, mas poucos são os estudos que apresentam as substâncias envolvidas e o modo de ação destas.

Crambe abyssinica é uma cultura pouco estudada no controle de nematoides. No entanto, apresenta metabólitos como os glicosinolatos, que após reação com a mirosinase, liberam substâncias de defesa, e estudos mostram que estas substâncias tem ação contra fungos, bactérias, nematoides e insetos.

Nesse sentido, este trabalho teve os seguintes objetivos: a) avaliar *in vitro* diferentes métodos de obtenção de extratos de *C. abyssinica* no controle de *M. incognita* e *M. javanica*;

b) verificar a possível atuação do alil isotiocianato e a quantificação do mesmo nos extratos avaliados; c) verificar o efeito de doses dos extratos de *C. abyssinica* no controle de *M. incognita* e *M. javanica*; d) avaliar em tomateiros diferentes vias e épocas de aplicação das doses e dos extratos de *C. abyssinica* no controle de *M. incognita* e *M. javanica*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A CULTURA DO TOMATE

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* Linnaeus) é originário da América do Sul, pertence à família Solanaceae, gênero *Solanum*, cultivado em quase todo o mundo (FILGUEIRA, 2008). A produção no Brasil chegou a 4 milhões de toneladas no ano de 2014, com rendimento médio de 65.942 kg ha⁻¹, e a área cultivada com tomateiro vem aumentando nos últimos anos, em 2005 era de 60.639 ha, já em 2014 a área foi para 65.146 ha (IBGE, 2015).

O Brasil encontra-se em oitavo lugar na produção mundial de tomate, ficando atrás da China, Índia, Estados Unidos da América, Turquia, Egito, Irã e Itália (FAOSTAT, 2012). A posição do país neste ranking reflete a importância desta cultura para a economia, gerando emprego e renda, fortalecendo a agricultura familiar e diminuindo o êxodo rural (CARVALHO et al., 2014). A difusão de técnicas de irrigação, o uso intensivo de insumos e a introdução de híbridos mais produtivos e com menores perdas na pós-colheita, foram alguns dos principais fatores que contribuíram para o aumento da produtividade do tomate nacional (CARVALHO; PAGLIUCA, 2007).

O tomateiro pode ser cultivado em regiões tropicais e subtropicais no mundo, com formas diversas de consumo. Esta cultura é intensivamente cultivada, devido a melhoria nos aspectos de fenológicos houve aumento da área de produção, acarretando em problemas fitossanitários (SANTOS, 2009). Os fitonematoides são considerados como um dos principais patógenos do sistema radicular de tomateiro, sendo o gênero *Meloidogyne* o mais importante, devido às complexas interações com seus hospedeiros (WESTERICH et al., 2012).

2.2 *Meloidogyne* EM TOMATEIRO

Dentre as espécies do gênero *Meloidogyne*, quatro são consideradas mais importantes, pela ampla distribuição geográfica e alto grau de polifagismo que apresentam: *M. arenaria*, *M. incognita*, *M. javanica* e *M. hapla* (FERRAZ; MONTEIRO, 2011). As espécies predominantes mais comuns para o tomateiro são *M. incognita* e *M. javanica* (CHARCHAR; ARAGÃO, 2005). A gama de hospedeiros destes nematoides é muito ampla, pois parasitam quase todas as plantas cultivadas. Estima-se que os danos causadas por estes nematoides estejam em torno de 24% em tomateiro (FREITAS; OLIVEIRA; FERRAZ, 2009). As consequências vão desde a redução da produtividade e da qualidade dos produtos, que refletem em prejuízos para o

produtor e na elevação dos preços para o consumidor. Em termos mundiais, considera-se que as perdas causadas pelos nematoides em todas as culturas por ano são de 100 bilhões de dólares (FREITAS; OLIVEIRA; FERRAZ, 2009). Já em 2012, foi verificado que o gênero *Meloidogyne* causou perdas estimadas em 118 bilhões de dólares para as culturas no mundo (ATKINSON et al., 2012).

Os sintomas diretos causados por este gênero em tomateiro são a formação de galhas, onde ocorre aumento no diâmetro da raiz infectada, resultado da hiperplasia e hipertrofia celular, como consequência da reação das plantas às toxinas introduzidas pelo nematoide. Outro sintoma é a redução do volume do sistema radicular, tornando as plantas pouco eficientes na absorção e transporte de água e nutrientes do solo. Além destes, tem-se os sintomas reflexos, que compreendem a redução no desenvolvimento, clorose das folhas, tamanho desigual de plantas, deficiência nutricional, murcha, desfolha, redução na produção ou até mesmo a morte da planta (FERRAZ; MONTEIRO, 2011).

O gênero *Meloidogyne* pertence ao Reino Animalia, Filo Nematoda, Classe Secernentea, Ordem Tylenchida, Subordem Tylenchina e Família Meloidogynidae, como principal característica, este gênero promove alterações drásticas no desenvolvimento da raiz por induzir e manter as células gigantes que são fonte de nutrientes para os nematoides (CAILLAUD et al., 2008; FERRAZ et al., 2010; FERRAZ; MONTEIRO, 2011). Espécies pertencentes ao gênero *Meloidogyne* são biotróficos obrigatórios, e as galhas são reflexo da penetração de formas juvenis de segundo estágio (J2) na região de alongamento celular da raiz e migração intercelular próximo ao cilindro vascular. Nesta região, o J2 seleciona algumas células do parênquima e estabelece locais de alimentação dentro da raiz, que é essencial para o desenvolvimento e reprodução dos nematoides de galhas, uma vez que os nematoides podem regular a degradação de proteínas nas células hospedeiras à seu favor e suprimir a defesa do hospedeiro. As células selecionadas para o seu estabelecimento apresentam grandes volumes de citoplasma, tornam-se multinucleadas devido às repetidas mitoses de um único núcleo dentro da mesma célula, e pequenos vacúolos são formados (DAVIS et al., 2004; DAVIS et al., 2008; ENGLER et al., 2005).

O estilete é o órgão de adaptação dos nematoides para infectarem plantas. Ao penetrarem na célula hospedeira, os nematoides se deparam com uma barreira de celulose, e utilizam de ação mecânica do estilete para perfurar essa barreira, além de um arsenal de enzimas hidrolíticas que são lançadas pelo estilete, incluindo pectato liase e poligalacturonases que degradam polissacarídeos da lamela média, e enzimas que degradam celulose, como as

endoglucanases e hemicelulases (HUSSEY et al., 2002; JAUBERT et al., 2002; JASMER et al., 2003; POPEIJUS et al., 2000).

O estilete de *Meloidogyne* não perfura a membrana plasmática da célula, e o destino das moléculas secretadas vai para o espaço extracelular ou diretamente no citoplasma da célula por meio de uma abertura na membrana plasmática e o orifício do estilete, de onde o nematoide também retém a integridade celular para sua alimentação (DAVIS et al., 2004). As galhas geralmente contém mais de uma fêmea, e cada fêmea possui um grupo de duas a cinco células nutridoras ao redor da região anterior do corpo (MAISTRELLO et al., 2010). A expansão celular em células gigantes exige ampla e coordenada remodelação da parede celular, tais como, afrouxamento da parede que contém celulose e rede de ligação cruzada de glicano, e isto só é possível através de enzimas como endo- β -D-glucanases e xiloglucanas-endotransglicosilases (CAILLAUD et al., 2008).

As secreções emitidas pelas glândulas esofagianas são liberadas através de uma válvula para serem transportadas pelo estilete. Estas alteram a parede celular, auxiliando na migração dos juvenis nos tecidos do hospedeiro. Algumas secreções atuam na formação de células de alimentação, como a corismato mutase que atua no metabolismo da célula hospedeira e na síntese de aminoácidos aromáticos e metabolitos secundários, incluindo fitohormônios. Além disso, a secreção de peptídeos homólogos às plantas atuam na sinalização, regulam a alimentação através da degradação seletiva de proteínas da célula hospedeira e podem ainda atuar na sinalização no núcleo da célula hospedeira (DAVIS et al., 2004; DAVIS et al., 2008).

O ciclo de *M. javanica* e *M. incognita* completa-se em aproximadamente três a quatro semanas, e é dependente das condições ambientais como temperatura (ideal de 25 °C a 30 °C) e umidade. A massa de ovos produzida pelas fêmeas mantém-se unidas pela presença de substância gelatinosa, composta de glicoproteínas, secretada pelas glândulas retais, expostas em meio ao parênquima cortical ou sobre a superfície das raízes, podendo conter até 500 ovos, com produção diária de 30 a 40 ovos. A reprodução nestas espécies é por partenogênese mitótica obrigatória e, as populações são basicamente formadas por fêmeas e, os machos aparecem apenas em condições ambientais de estresse e não são fitoparasitas (AGRIOS, 2005; FERRAZ; MONTEIRO, 2011).

A embriogênese dá-se fora do corpo da fêmea. Após a postura, no interior dos ovos encontram-se juvenis de 1º estágio (J1), que sofrem a primeira ecdise originando juvenis de 2º estágio (J2), que eclodem após perfurar a casca do ovo com o estilete. O J2 é considerada a forma infectante de raízes. Os outros estádios de desenvolvimento ocorrem dentro da raiz, onde o J2 passa a ser denominado salsichóide, devido ao aumento do corpo e perda da mobilidade, e

os estádios J3 e J4 finalmente ocorrem com a formação de adultos (FERRAZ et al., 2010; FERRAZ; MONTEIRO, 2011).

Enzimas como lipases, proteinases, collagenases e quitinases desgastam as camadas do ovo resultando em maior flexibilidade para a saída do J2 (PERRY et al., 1992). A eclosão está relacionada com alterações na permeabilidade da parede do ovo, que podem ser promovida pelo J2 no seu interior, por meio da atividade das glândulas esofagianas estimuladas pelo meio externo, como por exemplo, os exsudatos radiculares (DIAS-ARIEIRA et al., 2002). A eclosão forçada por algum agente externo pode causar reduções no inóculo pela morte por falta de alimento, devido à eclosão na ausência do hospedeiro (SALGADO et al., 2007). Por outro lado, quanto maior o tempo que o juvenil leva para eclodir após a exposição ao estímulo, maior será o consumo de lipídeos do seu corpo, e, conseqüentemente, menor a infectividade e desenvolvimento (DIAS-ARIEIRA et al., 2002).

Produtos aplicados após eclosão podem causar distúrbios nos juvenis, suficientes para interferir na penetração e desenvolvimento (STEELE; HODGES, 1975). No entanto, fatores que inibam a eclosão são indicados para espécies que possuem ampla gama de hospedeiros ou hospedeiros perenes, podendo promover um escape nos períodos críticos do ciclo da cultura. Estes agentes de eclosão podem fazer com que o nematoide consuma suas reservas energéticas de forma a reduzir seu movimento e infectividade após a eclosão (DIAS-ARIEIRA et al., 2002).

2.3 INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA A NEMATOIDES

A planta não permite de maneira passiva a entrada do patógeno, pois possui sistema de defesa, incluindo proteínas relacionadas à patogênese (proteínas-RP), fitoalexinas e compostos fenólicos, entre outros (CAVALCANTI et al., 2005; MOLINARI, 1996; STANGARLIN et al., 2011). Os mecanismos de defesa são ativados em sequencia lógica, que inicia-se com o reconhecimento pela planta de sinais exógenos, seguidos de mecanismos de transdução de sinais, resultando na reprogramação do metabolismo da célula vegetal (PASCHOLATI, 2011). O tomateiro é uma planta que apresenta respostas de defesa ativadas em curto período de tempo (três a sete dias), quando induzidos pela aplicação de químicos ou por meio da pré-inoculação com patógenos não virulentos (BENHAMOU; BELANGER, 1998).

Diferentes mecanismos estruturais e bioquímicos podem contribuir para a resistência da planta contra fitopatógenos (BONALDO et al., 2005). Os mecanismos de resistência também são divididos em pré-formados, aqueles já presentes na planta antes da infecção, e pós-

formados, que estão ausentes ou presentes em baixos níveis antes da infecção ou ativação por agente externo (PASCHOLATI, 2011).

Segundo Kuhn (2007), indutores abióticos e bióticos, tais como, acibenzolar-S-metil e *Bacillus cereus*, respectivamente, podem promover incremento da atividade de peroxidase, quitinase, β -1,3-glucanase, proteases e aumento de lignina em feijoeiro. A proteção induzida pode se manifestar local ou sistemicamente, e o efeito protetor pode durar desde poucos dias até algumas semanas ou mesmo por todo o período de vida da planta (PASCHOLATI, 2011).

De acordo com Salgado e Silva (2005), a indução de resistência contra fitonematoides podem variar de acordo com a espécie e o estado nutricional da planta hospedeira e tipo de indutor, e pode atuar na formação de sítios de alimentação e na alimentação e desenvolvimento do nematoide nas raízes. No entanto, a indução de resistência não tem sido estudada minuciosamente para fitonematoides, pois são poucos os trabalhos que relatam a eficácia da indução de resistência em plantas contra esses patógenos, e, além disso, apresentam resultados contraditórios (SALGADO; SILVA, 2005; SALGADO et al., 2007). Alguns autores observaram indução de resistência no controle de fitonematoides utilizando indutores abióticos (MELO et al., 2012; MOLINARI; LOFFREDO, 2006; OKA; COHEN, 2001; SALGADO et al., 2007; SILVA et al., 2013). Alguns fatores devem ser considerados para a indução de resistência contra fitonematoides, como genética da planta hospedeira, patossistema envolvido e a necessidade de reativar os mecanismos de defesa, tendo em mente o efeito temporário do indutor (DIAS-ARIEIRA et al., 2013).

O aumento da atividade de peroxidase, polifenoloxidase e fenilalanina amônia-liase, bem como maior concentração de lignina e compostos fenólicos nas raízes, podem ocorrer em função da ativação de mecanismos de resistência em cafeeiro contra *M. exigua* (SILVA et al., 2010). Atividade de superóxido dismutase, quitinases e inibidores de proteinases também podem ser ativados em resposta à defesa contra nematoides (SALGADO; SILVA, 2005). Reação de hipersensibilidade também foi verificado em cafeeiro em respostas a população de *Meloidogyne* sp., interferindo no sítio de alimentação (RODRIGUES et al., 2000). Atividade enzimática de peroxidase e β -1,3-glucanase foi verificada em cana-de-açúcar contra *M. incognita* (GUIMARÃES et al., 2010). Fitoalexinas também são produzidas em respostas a estresses como defesa das plantas, e são considerados compostos biocidas, sendo prejudiciais a bactérias, fungos e nematoides, entre outros (CAVALCANTI et al., 2005).

Modificações bioquímicas ocorridas em plantas após serem induzidas para resistência, podem acarretar em modificações na natureza dos exsudatos radiculares e podem atrair ou repelir o nematoide (SALGADO; SILVA, 2005). Inibidores de proteinases são proteínas

cruciais para deter a alimentação e o desenvolvimento do nematoide, e são codificados pela rota do jasmonato (TURNER et al., 2002). LeEXPA5, um gene que codifica a expansina de tomate, é fortemente expresso por *Meloidogyne*, e a inibição deste gene afeta o desenvolvimento de galhas e a capacidade do nematoide de completar o ciclo (GAL et al., 2006). Algumas proteínas-RP, tais como inibidores de proteinase (RP-6) podem exercer efeitos inibitórios no desenvolvimento de nematoides (VAN LOON; VAN STRIEN, 1999).

Os mecanismos de resistência bioquímicos produzem substâncias tóxicas ao patógeno ou criam condições adversas para o crescimento do mesmo no interior da planta. Embora mecanismos estruturais possam atuar na defesa das plantas, são as substâncias produzidas nas células do hospedeiro antes ou após a infecção que contribuem significativamente para a resistência. Quando os mecanismos são bioquímicos pré-formados, estes estão presentes em altas concentrações nos tecidos saudáveis das plantas, e podem ser convertidos em substâncias altamente tóxicas aos patógenos, como exemplo, fenóis, alcalóides, terpenóides e glicosídeos, entre outros (PASCHOLATI, 2011). Dentro dos glicosídeos tem-se os glicosídeos sulfurados, na qual o glicosinolato faz parte, o qual apresenta enxofre na sua estrutura e está presente principalmente em Brássicas (PASCHOLATI, 2011).

2.4 GLICOSINOLATOS E DERIVADOS SOBRE *Meloidogyne*

Os glicosinolatos são derivados de aminoácidos, e pertencem ao metabolismo secundário das plantas e cuja decomposição libera substâncias de defesa, além de serem responsáveis pelo odor e pelo gosto característico de vegetais como repolho, brócolis e rabanete. A liberação desses compostos acontece quando a planta sofre ferimentos ou algum tipo de estresse, e a enzima tioglicosidase, denominada mirosinase, mantida na planta separadamente dos glicosídeos, catalisa e hidrolisa seu substrato glicosinolato liberando produtos altamente tóxicos, como isotiocianato, tiocianatos, nitrilas e epitionitrilas, de uma maneira dependente do substrato. A grande modificação da cadeia lateral é responsável pela diversidade química dos glicosinolatos. Embora não estejam esclarecidos os mecanismos de ação, sugere-se que os isotiocianatos sejam os metabólitos mais tóxicos, devido sua interação não específica e irreversível com grupos sulfidrila, ligação dissulfeto e grupos amino de proteínas (LEONI et al., 1997; PASCHOLATI, 2011; TAIZ; ZEIGER, 2004).

Os glicosinolatos (β -tioglicosídeo-*N*-hidroxissulfatos) são uma classe de nitrogênio (N) e enxofre (S), com mais de 120 moléculas já descritas, e já foram identificados em 16 famílias de plantas dicotiledôneas, mas principalmente nas Brássicas (FAHEY et al., 2001; LEONI et

al., 1997; MOHN et al., 2007). A biossíntese de glicosinolatos envolve a conversão de aminoácidos, por exemplo, alanina, metionina, valina, leucina ou isoleucina para glicosinolatos alifáticos, fenilalanina ou tirosina para os glicosinolatos aromáticos, e triptofano para os glicosinolatos indólicos (FAHEY et al., 2001). Glicosinolatos foram isolados e quantificados em diversas espécies de brássicas, como a sinigrina de origem de *Brassica juncea*, progoitrin de *Brassica napus*, *epi*-progoitrin de *Crambe abyssinica*, glicosinalbin de *Sinapis alba*, glicotropaeolin de *Lepidium sativum* e glicorafenin em *Raphanus sativus* (FINIGUERRA et al., 2001).

Os glicosinolatos são muito estáveis, solúveis em água (COTTAZ et al., 1996), estão presentes em todos os tecidos da planta e podem diferenciar entre as partes vegetais (BONES; ROSSITER, 2006). Para a formação de isotiocianatos, valores de pH devem estar próximos da neutralidade (DAUBOS et al., 1998). A mirosinase é uma enzima que apresenta elevada estabilidade térmica, sendo a temperatura ótima para sua atividade cerca de 60 °C (HOCHKOEPLER; PALMIERI, 1992). A formação de isotiocianatos é dependente da ação da mirosinase em glicosinolatos (FAHEY et al., 2001). A temperatura é um parâmetro que influencia a degradação térmica de glicosinolatos, principalmente em temperaturas acima de 50 °C. As perdas acima de 60% estão situadas em temperatura de 100 °C por 10 min, mas não há degradação enzimática em folhas sob temperatura ambiente. Temperaturas entre 70 °C e 100 °C inativam a enzima mirosinase (MOHN et al., 2007).

Pal Vig et al. (2009) destacam os efeitos benéficos dos glicosinolatos e seus produtos hidrolíticos, que tem ação antifúngica, antibacteriana, herbicida, antioxidante, antimutagênica e anticarcinogênica. Os isotiocianatos são capazes de se ligar a proteínas e grupos amino, e alterar as funções das proteínas, como a tubulina, que é uma proteína que desempenha importante função na divisão celular, e a ligação com isotiocianato faz com que o crescimento celular seja inibido, prevenindo câncer, por exemplo. Além da inibição da mitose celular, inibindo a proliferação celular, os isotiocianatos são essenciais para inibição do crescimento celular, pois, de forma geral, as proteínas são os principais locais de ligação de isotiocianato no interior da célula (JACKSON; SINGLETARY, 2004; MI et al., 2008). O isotiocianato pode atuar também na inibição do transporte de elétrons dentro da célula, inativando proteínas (JACOB et al., 2011).

São vários os isotiocianatos já identificados, tais como, benzil, fenetil, sulforafano isotiocianatos (MI et al., 2008), fenil, 4-fenilbutil, 6-fenilhexil, erucin, dehidroerucin, iberin e alil isotiocianato (ZHANG, 2004). Vários estudos demonstram o potencial do alil isotiocianato contra fitonematoides. *Tylenchulus semipenetrans* e *Meloidogyne javanica* foram controlados

por isotiocianato, porém os mais promissores foram benzil e alil isotiocianato (ZASADA; FERRIS, 2003). Segundo Borek et al. (1995), o alil isotiocianato está presente em *B. carinata*, *B. juncea*, *B. napus*, *B. nigra*, *B. oleracea* e *C. abyssinica*, e é importante para o controle de patógenos do solo e amplamente utilizado como nematicida (AISSANI et al., 2013).

Neves et al. (2009) observaram que óleo de mostarda e produtos à base de capsaicina, capsainóides e alil isotiocianato reduziram em 90% a eclosão de J2 de *M. javanica*. Segundo Wu et al. (2011), produtos sintetizados a partir de isotiocianatos derivados dos glicosinolatos de Brássicas apresentam efeito nematicida contra *M. javanica* e tem potencial para serem usados como bio-fumigantes, como o acrilóil isotiocianato (>95% AcITC) e alil isotiocianato (>94% AITC), além de apresentarem pouca toxicidade a organismos não alvo e sem perigos de aplicação. Esses autores relatam ainda que o modo de ação de AITC e AcITC sobre nematoides ainda não foi totalmente determinado, entretanto, um certo número de hipóteses foram propostas, sugerindo que um mecanismo de dano oxidativo ao DNA pode ser induzido por AITC (MURATA et al., 2000).

2.5 IDENTIFICAÇÃO DE DERIVADOS DE GLICOSINOLATOS

Numerosas técnicas tem sido propostas para quantificação e identificação, assim como a purificação de moléculas de origem vegetal, tais como a cromatografia líquida de alta eficiência, cromatografia de troca-iônica e cromatografia de exclusão molecular (COLTRO-RONCATO et al., 2015). A quantificação e identificação de glicosinolatos foram inicialmente realizadas por cromatografia em papel, destilação a vapor e titulação de isotiocianato, cromatografia gasosa e, em 1984, foi desenvolvido o método da cromatografia líquida de alta pressão com fase reversa, para identificação e quantificação de glicosinolatos e seus subprodutos, tais como alil isotiocianato, a qual vem sendo a mais utilizada. Porém, outras técnicas sofisticadas também são utilizadas, como espectrometria de massa e cromatografia de fluido supercrítico (CAI et al., 2004; FAHEY et al., 2001; HERZALLAH; HOLLEY, 2012).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), ou em inglês *high-pressure liquid chromatography* ou *high-performance liquid chromatography* (HPLC), ou seja, cromatografia líquida de alta pressão ou de alta eficiência (JARDIM et al., 2006; JORGE, 2010) tem sido um método muito empregado. É um tipo de cromatografia líquida que emprega colunas recheadas com materiais especialmente preparados e uma fase móvel eluída sob altas pressões. Tem capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande variedade de compostos presentes em diversos tipos de amostras, em escala de tempo de poucos minutos,

com alta resolução, eficiência e detectabilidade (JARDIM et al., 2006). Análises qualitativas também são realizadas, se um composto de referência tem um tempo de retenção igual ao de um pico no cromatograma, então as duas substâncias podem ser idênticas (JORGE, 2010).

As fases reversas são mais empregadas em HPLC, portanto cromatografia em fase-reversa apresenta uma fase estacionária que é apolar, como exemplo grupos octadecil ($C_{18}H_{37}$), e a fase móvel é relativamente polar, por exemplo, um solvente polar como a água separa mais lentamente do que um solvente menos polar como a acetonitrila. O grau de retenção depende da polarização de cada molécula ou grupo funcional (JARDIM et al., 2006; JORGE, 2010).

Extrato de *Brassica napus* foi analisado em HPLC para identificação dos glicosinolatos, e no tempo de 4 a 5 min foram observados os picos de progoitrin, epi-progoitrin e sinigrina (LAZZERI et al., 1993), assim como foi observado para os glicosinolatos presentes em *C. abyssinica* por Warwick e Gugel (2003).

2.6 A ESPÉCIE *Crambe abyssinica* HOCHST

O gênero *Brassica* representa uma de mais de 350 gêneros da família Brassicaceae, que por sua vez é uma das 16 famílias que contém glicosinolatos, e muitas espécies tem utilidades culinárias e medicinais, sendo que nos últimos anos a pesquisa tem investigado suas propriedades fungicidas, bactericidas, nematicidas e alelopáticas (FAHEY et al., 2001). Walker (1996) identificou redução nas galhas em tomateiros quando farelo de crambe e colza foram adicionados ao solo infestado por *Meloidogyne arenaria*.

O crambe (*Crambe abyssinica* Hochst) é nativo da região mediterrânea, é uma planta da família Brassicaceae, planta anual e uma cultura que ao longo dos últimos anos vem sendo introduzido em muitos países, como nova fonte de óleo (teor de óleo de 35%), contendo alto teor de ácido erúico (ácido graxo de cadeia longa), com alto valor para fins industriais (lubrificantes, plásticos, nylon e cosméticos, entre outros) e para produção de biodiesel, com menor impacto ambiental por ser mais biodegradável que os óleos minerais. A cultura apresenta custo baixo, colheita mecanizada e uma alternativa para a safrinha, tolerando a seca e o frio (DAUBOS et al., 1998; FALASCA et al., 2010; LAZZERI et al., 1994; LEONI et al., 1997). No Brasil, estudos relacionados à cultura do crambe para produção de óleo iniciaram-se recentemente, quando os produtores e pesquisadores nacionais passaram a ter acesso a cultivar FMS Brilhante (OLIVA, 2010).

Segundo Leoni et al. (1997), o crambe contém glicosinolatos, e o isolamento demonstrou que o epi-progoitrin (2 S-2-hydroxy-3-butenyl-glicosinolato) é o principal. O

contato deste glicosinolato e a enzima mirosinase pode fornecer imediatas e diferenciadas reações de proteção contra ataques de patógenos e de insetos, sem produzir prejuízos para a planta (FINIGUERRA et al., 2001).

2.7 CONTROLE ALTERNATIVO DE *Meloidogyne* POR EXTRATOS VEGETAIS

São vários os fitoquímicos derivados de plantas que atuam na mortalidade de *Meloidogyne* sp., com diferentes mecanismos de ação (ANDRADE et al., 2010; BABU et al., 2012; COLTRO-RONCATO et al., 2015). Extratos vegetais além de promoverem controle de fitonematoides, se destacam com várias vantagens comparados aos produtos químicos, como, o baixo custo, fácil biodegradação e baixa ou ausente toxicidade aos animais e ao homem, além de apresentar uma grande diversidade de constituintes químicos e com amplo modo de ação sobre microrganismos (ALMEIDA et al., 2012).

O incentivo à produtividade na agricultura acarretou em aumento na utilização de defensivos visando o controle de pragas, doenças e plantas daninhas. O uso intensivo e indiscriminado têm causado diversos problemas de contaminação no ambiente, intoxicação de agricultores, eliminação de microrganismos benéficos e resistência de fitopatógenos, pragas e plantas daninhas (SCHWAN-ESTRADA, 2009). A eliminação de brometo de metila em 2005 por questões ambientais e de saúde humana, afetou as estratégias de controle de nematoides, sendo que atualmente, apenas um pequeno número de nematicidas, como os organofosfatos e carbamatos, por exemplo, estão disponíveis para controle de nematoides na maioria dos países. Porém, entre os pesticidas, os nematicidas são os mais problemáticos porque esses produtos químicos são altamente tóxicos para os seres humanos, pode ocasionar contaminação das águas subterrâneas (OKA, 2010).

Portanto, novos nematicidas devem ser desenvolvidos, visto que, as plantas são capazes de produzir uma incrível variedade de compostos, derivados de metabólitos secundários, e são mais seguros para o ambiente e para os seres vivos (CHITWOOD, 2002). A utilização de extratos vegetais não só pode exercer um efeito tóxico direto sobre o patógeno, mas também induzir resistência no hospedeiro (PAUL; SHARMA, 2002). Para o pequeno produtor, o uso de extratos vegetais para o controle de fitonematoides é uma alternativa viável (SILVA et al., 2011). Técnicas de preparo, assim como os solventes utilizados são essenciais para a obtenção de extratos vegetais com efeito sobre os nematoides (ALMEIDA et al., 2012), assim como, a qualidade da planta a ser utilizada, pois, a produção de metabólitos secundários presentes em

plantas pode ser afetada pela sazonalidade, temperatura, local e época de plantio e altitude, entre outros fatores (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Vários extratos vegetais tem atuado no controle de nematoides (BALDIN et al., 2012; BORGES et al., 2013; FERREIRA et al., 2013; FRANZENER et al., 2007; LOPES et al., 2005; SILVA et al., 2011). No entanto, pouco se sabe sobre as moléculas atuantes, e o mecanismo de ação das mesmas, o que reforça a necessidade de estudos para identificação dessas moléculas oriundas dos vegetais (ROCHA et al., 2006). Embora muitas plantas apresentem potencial para controle de nematoides, a integração com outros métodos é muitas vezes necessária para atingir níveis desejados de controle (OKA, 2010). Diversos constituintes com efeito nematicida foram isolados de espécies vegetais, porém, a purificação de moléculas a partir de extratos vegetais para controle de nematoides, pode não ter a ação nematicida e ou nematostática requerida para o controle, comparado aos extratos vegetais (JAVED et al., 2008).

Sendo assim, é necessário o desenvolvimento de alternativas não tóxicas ao meio ambiente e aos seres vivos, como o uso de extratos vegetais, porém, com identificação de possíveis moléculas envolvidas no controle de nematoides.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**. 5. ed. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005. 922 p.
- AISSANI, N.; TEDESCHI, P.; MAIETTI, A.; BRANDOLINI, V.; GARAU, V. L.; CABONI, P. Nematicidal activity of allyl isothiocyanate from horseradish (*Armoracia rusticana*) roots against *Meloidogyne incognita*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 61, p. 4723-4727, 2013.
- ALMEIDA, F.A.; PETTER, F.A.; SIQUEIRA, V.C.; ALCÂNTARA NETO, F.; ALVES, A.U.; LEITE, M.L.T. Preparation methods of plant extracts on *Meloidogyne javanica* in tomato. **Nematropica Journal**, Flórida, v. 42, p. 9-15, 2012.
- ANDRADE, L.B.S.; OLIVEIRA, A.S.; RIBEIRO, J.K.C.; KIYOTA, S.; VASCONCELOS, I.M.; OLIVEIRA, J.T.A.; SALES, M.P. Effects of a novel pathogenesis-related class 10 (PR-10) protein from *Crotalaria pallida* roots with papain inhibitory activity against root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Washington, v. 58, p. 4145-4152, 2010.
- ATKINSON, H.J. LILLEY, C.J.; URWIN, P.E. Strategies for transgenic nematode control in developed and developing world crops. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 23, p. 251-256, 2012.
- BABU, R.O.; MOORKOTH, D.; AZEEZ, S.; EAPEN, S.J. Virtual screening and *in vitro* assay of potential drug like inhibitors from spices against Glutathione-S-Transferase of *Meloidogyne incognita*. **Bioinformation**, Singapore, v. 8, n. 7, p. 319-325, 2012.
- BALDIN, E.L.L.; WILCKEN, S.R.S.; PANNUTI, L.E.R.; SCHLICK-SOUZA, E.C.; VANZEI, F.P. Uso de extratos vegetais, manipueira e nematicida no controle do nematoide das galhas em cenoura. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 38, n. 1, p. 36-41, 2012.
- BENHAMOU, N.; BÉLANGER, R.R. Benzothiadiazole-mediated induced resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in tomato. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 118, p. 1203-1212, 1998.
- BONALDO, M.S.; PASCHOLATI, S.F.; ROMEIRO, R.S. Indução de resistência: noções básicas e perspectivas. In: CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO, R.M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S.F.; RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R.S. **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005. cap. 1, p. 11-27.
- BONES, A.M.; ROSSITER, J.T. The enzymic and chemically induced decomposition of glucosinolates. **Phytochemistry**, New York, v. 67, p. 1053-1067, 2006.
- BORGES, F.G.; KUHN, O.J.; BATTISTUS, A.G.; ESTEVEZ, R.L.; COLTRO, S. Toxidade de tratamentos alternativos e químicos *in vitro* sobre *Tubixaba tuxaua* e *Meloidogyne incognita*. **Scientia Agraria Paranaensis**, Cascavel, v. 12, p. 440-449, 2013.
- CAI, Z.W.; CHEUNG, C.Y.; MA, W.T.; AU, W.M.; ZHANG, X.Y.; LEE, A. Determination of two intact glucosinolates in vegetables and Chinese herbs. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 378, p. 827-833, 2004.

CAILLAUD, M.C.; DUBREUIL, G.; QUENTIN, M.; PERFUS-BARBEOCH, L.; LECOMTE, P.; ENGLER, J.A.; ABAD, P.; ROSSO, M.N.; FAVERY, B. Root-knot nematodes manipulate plant cell functions during a compatible interaction. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 165, p. 104-113, 2008.

CARVALHO, J.L.; PAGLIUCA, L.G. Tomate, um mercado que não para de crescer globalmente. **Hortifruti Brasil**, Piracicaba, n. 58, p. 6-14, 2007.

CARVALHO, C.R.F.; PONCIANO, N.J.; SOUZA, P.M.; DE SOUZA, C.L.M.; DE SOUSA, E.F. Viabilidade econômica e de risco da produção de tomate no município de Cambuci/RJ, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 12, p. 2293-2299, 2014.

CAVALCANTI, L.S.; BRUNELLI, K.R.; STANGARLIN, J.R. Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência induzida. In: CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO, R.M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S.F.; RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R.S. **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005. cap. 2, p. 29-50.

CHARCHAR, J.M.; ARAGÃO, F.A.S. Reprodução de *Meloidogyne* spp. em cultivares de tomate e pepino sob estufa plástica e campo. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 29, n. 2, p. 243-249, 2005.

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

COLTRO-RONCATO, S.; GONÇALVES, E.D.V.; DILDEY, O.D.F.; KUHN, O.J.; STANGARLIN, J.R. Fitoquímicos como controle alternativo de nematoides. In: KUHN, O.J.; NUNES, R.V.; STANGARLIN, J.R.; RAMPIM, L.; FEY, R.; COSTA, N.V.; COSTA, P.B.; GUIMARÃES, V.F.; ZAMBOM, M.A. **Ciências agrárias: tecnologias e perspectivas**. Marechal Cândido Rondon: UNIOESTE, 2015. cap. 10, p. 188-206.

COTTAZ, S.; HENRISSAT, B.; DRIGUEZ, H. Mechanism-based inhibition and stereochemistry of glucosinolate hydrolysis by myrosinase. **Biochemistry**, Washington, v. 35, p.15256-15259, 1996.

DAUBOS, P., GRUMEL, V., IORI, R., LEONI, O., PALMIERI, S., ROLLIN, P. *Crambe abyssinica* meal as starting material for the production of enantiomerically pure fine chemicals. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 7, p. 187-193, 1998.

DAVIS, E.L.; HUSSEY, R.S.; BAUM, T.J. Getting to the roots of parasitism by nematodes. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 20, n. 3, p. 134-141, 2004.

DAVIS, E.L.; HUSSEY, R.S.; MITCHUM, M.G.; BAUM, T.J. Parasitism proteins in nematode-plant interactions. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 11, p. 360-366, 2008.

DIAS-ARIEIRA, C.R.; FERRAZ, S.; FREITAS, L.G.; MIZOBUTSI, E.H. Penetração e desenvolvimento de *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* e *Heterodera glycines* em quatro gramíneas forrageiras. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 26, n. 1, p. 35-41, 2002.

DIAS-ARIEIRA, C.R.; SANTANA-GOMES, S.M.; PUERARI, H.H.; FONTANA, L.F.; RIBEIRO, L.M.; MATTEI, D. Induced resistance in the nematodes control. **African Journal of Agricultural Research**, Nairobi, v. 8, n. 20, p. 2312-2318, 2013.

ENGLER, J.A.; FAVERY, B.; ENGLER, G.; ABAD, P. Loss of susceptibility as an alternative for nematode resistance. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 16, p. 112-117, 2005.

FAHEY, J.W.; ZALCMANN, A.T.; TALALAY, P. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. **Phytochemistry**, New York, v. 56, p. 5-51, 2001.

FALASCA, S.L.; FLORES, N.; LAMAS, M.C.; CARBALLO, S.M.; ANSCHAU, A. *Crambe abyssinica*: An almost unknown crop with a promissory future to produce biodiesel in Argentina. **International journal of hydrogen energy**, Oxford, v. 35, p. 5808-5812, 2010.

FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Statistics Division**. Agriculture Data. Roma, 2012. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acesso em: 13 jun. 2015.

FERRAZ, S.; FREITAS, L.G.; LOPES, E.A.; DIAS-ARIEIRA, C.R. **Manejo sustentável de fitonematoides**. 1. ed. Viçosa: UFV, 2010. 304 p.

FERRAZ, L.C.C.B.; MONTEIRO, A.R. Nematoides. In: AMORIM, L.; RESENDE, J.A. M.; BERGAMIM FILHO, A. **Manual de Fitopatologia**: princípios e conceitos. 4 ed. São Paulo: Agrônômica Ceres, 2011. cap. 13, p. 277-305.

FERREIRA, I.C.M.; SILVA, G.S.; NASCIMENTO, F.S. Efeito de extratos aquosos de espécies de Asteraceae sobre *Meloidogyne incognita*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 39, n. 1, p. 40-44, 2013.

FILGUEIRA, F.A.R. **Novo manual de olericultura**: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. 3.ed. Viçosa: UFV, 2008. 41 p.

FINIGUERRA, M.G.; IORI, R.; PALMIERI, S. Soluble and total myrosinase activity in defatted *Crambe abyssinica* Meal. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Washington, v. 49, p. 840-845, 2001.

FRANZENER, G.; FRANZENER, A.S.M.; STANGARLIN, J.R.; FURLANETTO, C.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. Proteção de tomateiro a *Meloidogyne incognita* pelo extrato de *Tagetes patula*. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 31, n. 1, p. 27-36, 2007.

FREITAS, L.G.; OLIVEIRA, R.D.L.; FERRAZ, S. **Introdução à nematologia**. Viçosa: UFV, 2009, 92 p.

GAL, T.Z.; AUSSENBERG, E.R.; BURDMAN, S.; KAPULNIK, Y.; KOLTAL, H. Expression of a plant expansin is involved in the establishment of root knot nematode parasitism in tomato. **Planta**, Berlin, v. 224, p. 155-162, 2006.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GUIMARÃES, L.M.P.; PEDROSA, E.M.R.; COELHO, R.S.B.; COUTO, E.F.; MARANHÃO, S.R.V.L.; CHAVES, A. Eficiência e atividade enzimática elicitada por metil jasmonato e silicato de potássio em cana-de-açúcar parasitada por *Meloidogyne incognita*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 36, n. 1, p. 11-15, 2010.

HERZALLAH, S.; HOLLEY, R. Determination of sinigrin, sinalbin, allyl and benzyl isothiocyanates by RP-HPLC in mustard powder extracts. **Food Science and Technology**, London, v. 47, p. 193-299, 2012.

HOCHKOEPLER, A.; PALMIERI, S. Kinetic properties of myrosinase in hydrated reverse micelles. **Biotechnology Progress**, New York, v. 8, p. 91-96, 1992.

HUSSEY, R.S.; DAVIS, E.L.; BAUM, T.J. Secrets in secretions: genes that control nematode parasitism of plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Campos dos Goytacazes, v. 14, n. 3, p. 183-194, 2002.

IBGE-Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Levantamento sistemático da produção agrícola: pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil**. Rio de Janeiro, v. 29, n. 4, p. 1-18, 2015.

JACKSON, S.J.T.; SINGLETARY, K.W. Sulforaphane: a naturally occurring mammary carcinoma mitotic inhibitor, which disrupts tubulin polymerization. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 25, n. 2, p. 219-227, 2004.

JACOB, C.; JAMIER, V.; BA, L.A. Redox active secondary metabolites. **Current Opinion in Chemical Biology**, London, v. 15, n. 1, p. 149-155, 2011.

JARDIM, I.C.S.F.; COLLINS, C.H.; GUIMARÃES, L.F.L. Cromatografia líquida de alta eficiência. In: COLLINS, C.H., BRAGA, G.L., BONATO, P.S. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas: Unicamp, 2006. cap. 9, p. 273-398.

JASMER, D.P.; GOVERSE, A.; SMANT, G. Parasitic nematode interactions with mammals and plants. **Annual Reviews Phytopathology**, Palo Alto, v. 41, p. 245-270, 2003.

JAUBERT, S.; LAFFAIRE, J.B.; ABAD, P.; ROSSO, M.N. A polygalacturonase of animal origin isolated from the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 522, p. 109-112, 2002.

JAVED, N.; GOWEN, S.R.; EL-HASSAN, S.A.; INAN-UL-HAQ, SHAHIMA, F.; PEMBROKE, B. Efficacy of neem (*Azadirachta indica*) formulations on biology of root-knot nematodes (*Meloidogyne javanica*) on tomato. **Crop Protection**, Amsterdam, v. 27, p. 36-43, 2008

JORGE, F.S. **Métodos de Taguchi aplicados à análise cromatográfica na identificação de isotiocianatos**. 2010. 387 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Gestão Industrial) – Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2010.

KUHN, O.J. **Indução de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) por acibenzolar-S-metil e *Bacillus cereus*: aspectos fisiológicos, bioquímicos e parâmetros de crescimento e**

produção. 2007. 138 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2007.

LAZZERI, L.; TACCONI, R.; PALMIERI, S. *In vitro* activity of some glucosinolates and their reaction products toward a population of the nematode *Heterodera schachtii*. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Washington, v. 41, p. 825-829, 1993.

LAZZERI, L.; LEONI, O.; CONTE, L.S.; PALMIERI, S. Some technological characteristics and potential uses of *Crambe abyssinica* products. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 3, p. 103-112, 1994.

LEONI, O.; IORI, R.; PALMIERI, S.; ESPOSITO, E.; MENEGATTI, E.; CORTESI, R.; NASTRUZZI, C. Myrosinase-generated isothiocyanate from glucosinolates: isolation, characterization and *in vitro* antiproliferative studies. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 5, n. 9, p. 1799-1806, 1997.

LOPES, E.A.; FERRAZ, S.; FREITAS, L.G.; FERREIRA, P.F.; AMORA, D.X. Efeito dos extratos aquosos de Mucuna Preta e de Manjeriçao sobre *Meloidogyne incognita* e *M. javanica*. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 29, p. 67-74, 2005.

MAISTRELLO, L.; VACCARI, G.; SASANELLI, N. Effect of chestnut tannins on the root-knot nematode *Meloidogyne javanica*. **Helminthologia**, Berlim, v. 47, n. 1, p. 48 – 57, 2010.

MELO, T.A.; SERRA, I.M.R.S.; SILVA, G.S.; SOUSA, R.M.S. Produtos naturais aplicados para manejo de *Meloidogyne incognita* em tomateiros. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 38, n. 3, p. 223-227, 2012.

MI, L.; XIAO, Z.; HOOD, B.L.; DAKSHANAMURTHY, S.; WANG, X.; GOVIND, S.; CONRADS, T.P.; VEENSTRA, T.D.; CHUNG, F.L. Covalent Binding to Tubulin by Isothiocyanates: a mechanism of cell growth arrest and apoptosis. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 283, n. 32, p. 22136–22146, 2008.

MOHN, T.; CUTTING, B.; ERNST, B.; HAMBURGER, M. Extraction and analysis of intact glucosinolates - A validated pressurized liquid extraction/liquid chromatography–mass spectrometry protocol for *Isatis tinctoria*, and qualitative analysis of other cruciferous plants. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, n. 1166, p. 142–151, 2007.

MOLINARI, S. Molecular aspects of plant-nematode interaction. **Nematologia Mediterrânea**, Cabo, v. 24, p. 139-154, 1996.

MOLINARI, S.; LOFFREDO, E. The role of salicylic acid in defense response of tomato to root-knot nematodes. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, Malden, v. 68, p. 69-78, 2006.

MURATA, M.; YAMASHITA, N.; INOUE, S.; KAWANISHI, S. Mechanism of oxidative DNA damage induced by carcinogenic allyl isothiocyanate. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 28, n. 5, p. 797–805, 2000.

NEVES, W.S.; FREITAS, L.G.; COUTINHO, M.M.; DALLEMOLE-GIARETTA, R.; FABRY, C.F.S.; DHINGRA, O.D.; FERRAZ, S. Ação nematicida de extratos de alho,

mostarda, pimenta malagueta, de óleo de mostarda e de dois produtos à base de capsainóides e alil isotiocianato sobre juvenis de *Meloidogyne javanica*, (treub) Chitwood, 1949, em casa de vegetação. *Summa Phytopathologica*, Botucatu, v. 35, n. 4, p. 255-261, 2009.

OKA, Y. Mechanisms of nematode suppression by organic soil amendments - A review. *Applied Soil Ecology*, Amsterdam, v. 44, p. 101–115, 2010.

OKA, Y.; COHEN, Y. Induced resistance to cyst and root-knot nematodes in cereals by DL- β -amino-*n*-butyric acid. *European Journal of Plant Pathology*, London, v. 107, p. 219-227, 2001.

OLIVA, A.C.E. **Qualidade de sementes de crambe submetidas a métodos de secagem e períodos de armazenamento**. 2010. 78 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2010.

PAL VIG, A.; RAMPAL, G.; THIND, T.S.; ARORA, S. Bio-protective effects of glucosinolates. *LWT - Food Science and Technology*, London, v. 42, p. 1561–1572, 2009.

PASCHOLATI, S.F. Fisiologia do parasitismo: como as plantas se defendem dos patógenos. In: AMORIN, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Ceres, 2011. cap. 35, p. 593-633.

PAUL, P.K.; SHARMA, P.D. *Azadirachta indica* leaf extract induces resistance in barley against leaf stripe disease. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, Malden, v. 61, p. 3-13, 2002.

PERRY, R.N.; KNOX, D.; BEANE, J. Enzymes released during hatching of *Globodera rostochiensis* and *Meloidogyne incognita*. *Fundamental and Applied Nematology*, Peña, v. 15, p. 283-288, 1992.

POPEIJUS, H.E.; OVERMARS, H.; JONES, J.; BLOK, V.; GOVERSE, A.; HELDER, J.; SCHOTS, A.; BAKKER, J.; SMANT, G. Degradation of plant cell walls by nematodes. *Nature*, London, v. 406, p. 36–37, 2000.

ROCHA, T.L.; MURAD, A.M.; EVARISTO, R.G.S.; ALMEIDA, W. S.; MAGALHÃES, J.C.C.; MATTAR, M.C.S.; GROSSI-DE-SÁ, M.F. **Efeito nematicida de extratos aquosos de sementes de plantas sobre juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne incognita***. Comunicado técnico 144, Brasília: Embrapa, 2006. Disponível em:< <https://www.embrapa.br/documents/1355163/2022523/cot144.pdf/cad1e8c1-f889-4b44-88fd-7c2554c6155b>>. Acesso em: 08 jun. 2015.

RODRIGUES, A.C.F.O.; ABRANTES, I.M.O.; MELILLO, M.T.; BLEVE-ZACHEO, T. Ultrastructural response of coffee roots to root-knot nematodes, *Meloidogyne exigua* and *M. megadora*. *Nematropica Journal*, Flórida, v. 30, p. 201-210, 2000.

SALGADO, S.M.L.; SILVA, L.H.C.P. Potencial da indução de resistência no controle de fitonematoides. In: CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO, R.M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S.F.; RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R.S. **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, v. 13, 2005. p.155-165.

SALGADO, S.M.L.; RESENDE, M.L.V.; CAMPOS, V.P. Efeito de indutores de resistência sobre *Meloidogyne exigua* do cafeeiro. **Ciência agrotecnológica**. Lavras, v. 31, n. 4, p. 1007-1013, 2007.

SANTOS, F.F.B. **Obtenção e seleção de híbridos de tomate visando a resistência ao *Tomato yellow vein streak vírus* (ToYVSV)**. 2009. 86 p. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) – Instituto Agronômico, Campinas, São Paulo, 2009.

SCHWAN-ESTRADA KRF. Extratos vegetais e de cogumelos no controle de doenças de plantas. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 4038-4045, 2009.

SILVA, R.V.; OLIVEIRA, R.D.L.; NASCIMENTO, K.J.T.; RODRIGUES, F.A. Biochemical responses of coffee resistance against *Meloidogyne exigua* mediated by silicone. **Plant Pathology**, Oxford, v. 59, p. 586-593, 2010.

SILVA, G.A.; COIMBRA, J.L.; SANTOS, F.S.; NUNES, H.B. Efeito de extratos vegetais sobre o parasitismo do *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1949, no algodoeiro. **Natureza on line**, Santa Teresa, v. 9, n. 2, p.82-86, 2011.

SILVA, R.V.; OLIVEIRA, R.D.L.; FERREIRA, P.S.; FERREIRA, A.O.; RODRIGUES, F.A. Defense responses to *Meloidogyne exigua* in resistant coffee cultivar and non-host plant. **Tropical Plant Pathology**, Viçosa, v. 38, n. 2, p. 114-121, 2013.

STANGARLIN, J.R.; KUHN, O.J.; TOLEDO, M.V.; PORTZ, R.L.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; PASCHOLATI, S.F. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**, Cascavel, v. 10, p. 18-46, 2011.

STEELE, A.E.; HODGES, L.R. In vitro and in vivo effects of aldicarb on survival and development of *Heterodera schachtii*. **Journal of Nematology**, Hanover, v. 7, p. 305-312, 1975.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed. p. 317-327, 2004.

TURNER, J.G.; ELLIS, C.; DEVOTO, A. The jasmonate signal pathway. **The Plant Cell**, Waterbury, v. 14, suplemento, p. 153-164, 2002.

WALKER, J. T. Crambe and rapeseed meal as soil amendments: nematicidal potential and phytotoxic effects. **Crop Protection**, Amsterdam, v. 15, n. 5, p. 433-437, 1996.

WARWICK, S.I.; GUGEL, R.K. Genetic variation in the *Crambe abyssinica* – *C. hispanica* – *C. glabrata* complex. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 50, p. 291–305, 2003.

WESTERICH, J.N.; RODELLA, R.A.; ROSA, J.M.O.; WILCKEN, S.R.S. Alterações anatômicas induzidas por *Meloidogyne enterolobii* (= *M. mayaguensis*) e *Meloidogyne javanica* em tomateiros resistentes a meloidoginose. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 38, n. 3, p. 192-197, 2012.

WU, H.; WANG, C.J.; BIAN, X.W. B.; ZENG, S.Y.; LIN, K.C.; WU, B.; ZHANG, G.A.; ZHANG, X. Nematicidal efficacy of isothiocyanates against root-knot nematode *Meloidogyne javanica* in cucumber. **Crop Protection**, Amsterdam, v. 30, p. 33-37, 2011.

VAN LOON, L.C.; VAN STRIEN, E.A. The families of pathogenesis related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, Malden, v. 55, p. 85-97, 1999.

ZASADA, I.A.; FERRIS, H. Sensitivity of *Meloidogyne javanica* and *Tylenchulus semipenetrans* to isothiocyanates in laboratory assays. **Phytopathology**, St Paul, v. 93, p. 747-750, 2003.

ZHANG, Y.S. Cancer-preventive isothiocyanates: measurement of human exposure and mechanism of action. **Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, Amsterdam, v. 555, p. 173-190, 2004.

4 CAPÍTULO 1 – MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS PRESENTES EM CRAMBE COM CAPACIDADE CONTROLADORA DE *Meloidogyne incognita* e *M. javanica*

RESUMO

Medidas alternativas de controle de nematoides, como o uso de metabólitos secundários produzidos pelas plantas, podem ser exploradas no contexto do manejo integrado em fitossanidade. O objetivo deste trabalho foi verificar quais os solventes mais adequados para obtenção de alil isotiocianato de folhas de *Crambe abyssinica*, e o efeito dos mesmos sobre *Meloidogyne incognita* e *Meloidogyne javanica*. Folhas secas de crambe na concentração de 200 mg L⁻¹ foram utilizadas para o preparo dos extratos com os solventes água para os extratos obtidos por infusão e trituração, acetona (cetônico), água + álcool etílico (hidroalcoólico), álcool metílico (metanólico), hexano (hexânico) e clorofórmio (clorofórmico). Após a rotoevaporação dos solventes o resíduo foi ressuspenso em água, originando os extratos aquosos, os quais foram utilizados para os ensaios. Água destilada e nematicida foram usados como tratamentos controles. Após a definição dos três melhores extratos, foram testadas as seguintes doses: 0, 200, 300, 400 e 500 mg L⁻¹ de folhas secas de crambe. Para quantificar alil isotiocianato presente nos extratos foi utilizado cromatografia líquida de alta pressão (HPLC). Para as variáveis analisadas foram utilizados 200 ovos para eclosão e 200 juvenis de segundo estágio (J2) para motilidade e mortalidade. A mortalidade de *M. incognita* e *M. javanica* para o extrato hidroalcoólico foi de 93% e 64%, respectivamente, seguido do extrato metanólico (18% e 34%) e trituração (9% e 28%), respectivamente. Para o extrato hidroalcoólico, a concentração com melhor efeito nematicida foi de 250 mg L⁻¹. Dos extratos analisados por HPLC, somente o metanólico e o hidroalcoólico apresentaram alil isotiocianato, indicando que os efeitos inibitórios da eclosão, motilidade e mortalidade não foram atribuídos apenas à presença desse composto.

Palavras-chave: *Crambe abyssinica*. Glicosinolato. *Meloidogyne incognita*. *Meloidogyne javanica*. Controle alternativo.

CAPÍTULO 1 - METHODS OF EXTRACTION OF CRAMBE COMPOUNDS THAT CONTROL *Meloidogyne incognita* AND *M. javanica*

ABSTRACT

Alternative methods for controlling nematodes, as the use of secondary metabolites produced by plants, can be explored into integrated pest management system. The objective of this work was to verify the most suitable solvent for obtaining allyl isothiocyanate from *Crambe abyssinica* leaves, and its effect on *Meloidogyne incognita* and *Meloidogyne javanica*. Dry leaves of *C. abyssinica* at 200 mg L⁻¹ were used to prepare the extracts using water to obtain infusion and grinding, acetone, water + ethanol (hydroalcoholic), methanol, hexane and chloroform as solvents. Distilled water and chemical nematicide was used as control treatments. Once defined the three best extracts, the following doses were used: 0, 200, 300, 400 and 500 mg L⁻¹ of the dried leaves of crambe. To quantify allyl isothiocyanate present in the extracts was used high performance liquid chromatography (HPLC). After solvents evaporation, the residues were eluted with water and used in the assays with 200 eggs for hatching test or 200 second stage juveniles (J2) for mobility and mortality tests. The mortality of *M. incognita* and *M. javanica* for hydroalcoholic extract was 93% and 64%, respectively, followed by methanol extract (18% and 34%) and grinding extract (9% and 28%), respectively. Hydroalcoholic extract at 250 mg L⁻¹ showed high nematicidal effect. To the extracts analyzed by HPLC, only methanol the hydroalcoholic extracts had allyl isothiocyanate, indicating that the inhibitory effects on the hatching, mobility and mortality were not attributed only to the presence of these compound.

Keywords: *Crambe abyssinica*. Glucosinolate. *Meloidogyne incognita*. *Meloidogyne javanica*. Alternative control.

4.1 INTRODUÇÃO

O controle de nematoides é muito complexo. Mesmo o uso racional dos produtos químicos pode trazer em longo prazo efeito indesejável, devido ao surgimento de fitopatógenos resistentes e à contaminação causada pelos resíduos, que fazem com que a sociedade e o meio ambiente sofram as consequências. No entanto, muitas pesquisas têm sido realizadas na busca por novos princípios ativos de origem natural, como os extratos vegetais, que apresentam metabólitos secundários com atividade antimicrobiana ou indutora de resistência (NEVES et al., 2009; STANGARLIN et al., 2011).

Algumas substâncias de origem vegetal têm sido purificadas e identificadas, como é o caso do alil isotiocianato que foi isolado de *Armoracia rusticana* (WU et al., 2009) e, glicosinolatos extraído de espécies de brássicas (*Brassica oleracea* L., *Sinapis nigra* e *Lepidium sativum* L.) (MOHN et al., 2007). Várias plantas tem ação sobre fitonematoides, e tal efeito é atribuído a presença de alguns compostos ativos, como flavonóides e ácido rosmarínico (CABONI et al., 2013), alil isotiocianato, acrilóil isotiocianato e bezil isotiocianato (AISSANI et al., 2013; NEVES et al., 2009; WU et al., 2011), azadiractina, desacetilnimbim, desacetilsalanim, nimbim e salanim (SILVA et al., 2008).

O efeito de extratos vegetais sobre os fitonematoides tem apresentado grande potencial como matéria prima para a produção de nematicidas naturais, como tem sido descrito por Franzener et al. (2005), Elbadri et al. (2008) e Silva et al. (2008). A atividade nematicida pode depender tanto da planta utilizada como da forma de preparação do extrato e do solvente de extração (AMARAL et al., 2002).

Compostos de origem vegetal podem agir na defesa das plantas por apresentarem efeito nematicida, como é o caso dos glicosinolatos presentes em espécies de brássicas. Estes compostos pertencem ao metabolismo secundário e podem agir também contra outros fitopatógenos. Substâncias como os isotiocianatos, nitrilas, tiocianatos e epinitrilas ocorrem quando o glicosinolato é hidrolisado pela mirosinase, uma enzima ligada à membrana (CLARKE, 2010; WU et al., 2009).

O crambe (*Crambe abyssinica* Hochst) contém glicosinolatos, e o pó produzido a partir desta brássica demonstrou toxidez à nematoides (LEONI et al., 1997). No entanto, a eficiência do uso de extratos aquosos dessa brássica para controle de nematoides ainda não foi estudada.

Sabendo-se do potencial das substâncias de origem vegetal para o controle de fitonematoides, e que estas podem ser isoladas, identificadas e sintetizadas quimicamente pela indústria, ou ainda, esses extratos podem ser aplicados diretamente pelos agricultores,

objetivou-se neste trabalho verificar quais os solventes mais eficazes para obtenção de extratos a partir de folhas de crambe e, a partir dos extratos mais eficientes, avaliar a dose ideal, com atividade nematicida/nematostática sobre *M. incognita* e *M. javanica*, além de quantificar a presença de alil isotiocianato por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) nesses extratos.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Obtenção e Identificação de *Meloidogyne incognita* e *Meloidogyne javanica*

A população de *M. incognita* e *M. javanica* foram adquiridas de cultivo comercial em Marechal Cândido Rondon-PR. As raízes foram coletadas de tomateiro de ambas as espécies de nematoides e encaminhadas ao Laboratório de Nematologia da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – Unioeste, *campus* de Marechal Cândido Rondon. Fêmeas individuais foram extraídas das raízes e identificadas com base na configuração da região perineal (HARTMAN; SASSER, 1985).

As populações identificadas foram cultivadas em vasos de tomateiro em casa de vegetação para utilizar nos experimentos com as devidas populações puras.

4.2.2 Extração e Quantificação de *Meloidogyne incognita* e *Meloidogyne javanica*

Para extração de ovos e nematoides das raízes foi utilizado a metodologia de Freitas et al. (2007). As raízes foram cortadas e trituradas em liquidificador por 20 segundos, vertido sobre peneira de 0,427 mm de abertura de malha (48 mesh) acoplada na peneira de 0,037 mm de abertura de malha (400 mesh), nesta os nematoides foram retidos e o conteúdo recolhido em tubos de centrífuga e submetidos ao método de flotação centrífuga em solução de sacarose. Os ovos e J2 retidos na peneira de 400 mesh foram transferidos para lâmina de Peters e quantificado.

Para obtenção somente de J2, foi seguido a metodologia descrita por Franzener (2005), por meio de câmara de eclosão. Após a extração de ovos e J2 segundo a metodologia de Freitas et al. (2007), estes foram colocados na câmara de eclosão, formada de uma peneira com tela de nylon de 1 mm de abertura e papel absorvente, fixados na abertura de um funil com água e vedada a parte inferior do funil, assim, os J2 eclodidos podiam migrar para o fundo do funil.

4.2.3 Ensaio 1 - Extratos de Crambe

Folhas de crambe FMS Brilhante foram amostradas aos 35 dias após a emergência, em cultivo comercial no município de Cascavel-PR, com coordenadas de latitude 24°57'21" sul e longitude 53°27'19" oeste, altitude de 781 metros, foram secas em estufa a 45 °C por 48 horas, trituradas em moinho de facas e passadas em peneiras de 48 Mesh, obtendo-se o pó desta planta, e armazenado em recipiente fechado no escuro a temperatura ambiente até o momento de preparo dos extratos.

Os extratos foram preparados na concentração de 200 mg do pó de crambe por litro de solvente, e obtidos da seguinte forma: 1) Extrato por infusão foi obtido através da adição de água (H₂O) destilada fervente sobre as partes do vegetal, utilizando após o resfriamento; 2) Extrato solução aquosa obtido por trituração em água (H₂O), o material vegetal permaneceu sob agitação por 1 h em água destilada; 3) Extrato cetônico, foi utilizado o solvente acetona (CH₃)₂CO em aparelho tipo Soxhlet por um período de 20 horas, à temperatura de 50 °C (NEVES et al., 2009); 4) Extrato por solução hidroalcoólica (70% v/v álcool etílico-C₂H₆O), foi estocada à temperatura ambiente, protegida da luz, por um período de 15 dias (LOGUERCIO et al., 2005); 5) Extrato metanólico, a solução foi composta de álcool metílico CH₃OH (ELBADRI et al., 2008); 6) Extrato hexânico, o solvente foi hexano C₆H₁₄ (ELBADRI et al., 2008); e 7) Extrato clorofórmico, utilizou-se o solvente clorofórmio CHCl₃ (COSTA et al., 2004). Os extratos metanólico, hexânico e clorofórmio permaneceram em repouso à temperatura ambiente, protegida de luz durante oito dias. Todos os extratos foram filtrados em papel filtro Whatman n° 1, em seguida, foram roto-evaporados em vácuo a 50 °C, exceto os aquosos obtidos por infusão e trituração. Após a retirada do solvente, foram ressuspensos em 1000 mL de água destilada. Foram utilizadas duas testemunhas: a negativa (água destilada) e a positiva (nematicida químico imidacloprido + tiodicarbe (9,12 mL i.a. L⁻¹)). Em todos os tratamentos, exceto para o nematicida químico, foi adicionado 0,6% de Tween 20 à água destilada (inclusive na testemunha negativa).

O ensaio foi composto de nove tratamentos com cinco repetições, contendo 5 mL do extrato e a suspensão de ovos ou de juvenis de segundo estágio (J2), conforme a variável a ser analisada. Cada repetição foi representada por um frasco de plástico com tampa com capacidade de 70 mL.

4.2.4 Ensaio 2 - Doses dos Extratos de Crambe

A partir dos resultados com os diferentes tipos de extratos foram escolhidos os três com maior efeito nematicida, e realizados ensaios com as doses 0, 200, 300, 400 e 500 mg L⁻¹ do pó de crambe, com cinco repetições, além do tratamento adicional nematicida químico (500 µL i.a. Carbofurano L⁻¹). Para comparação dos tratamentos com o nematicida, foram seis tratamentos (0; 200; 300; 400; 500 mg L⁻¹ do pó de crambe e o Carbofurano) com cinco repetições. Cada parcela foi composta por um frasco contendo 5 mL de solução com juvenis ou ovos de nematoides conforme descrito nas variáveis analisadas.

4.2.5 Atividade Nematicida e Nematostática

Nos ensaios para os diferentes extratos e doses, foram avaliados a eclosão, a motilidade e a mortalidade de *Meloidogyne incognita* e de *M. javanica*.

Para o ensaio de eclosão, 200 ovos foram colocados em 5 mL dos extratos e ficaram incubados por 15 dias a temperatura ambiente. Após esse período foi determinada a porcentagem de J2 eclodidos (COSTA et al., 2001).

Para motilidade e mortalidade, foram utilizados 200 J2 em 5 mL dos extratos, sendo ambos ensaios avaliados conforme metodologia de Franzener et al. (2007). A motilidade foi observada após 24 horas, avaliando o número de J2 aparentemente inativos. Os J2 foram transferidos para peneira de 400 mesh, substituindo-se o extrato por água, e após 24 horas os que permanecerem inativos foram considerados mortos. Foram considerados inativos e/ou mortos os J2 de aspecto retilíneo ou levemente retorcidos. A determinação do número de ovos e J2 presentes na amostra foram realizadas com auxílio de lâmina de Peters.

4.2.6 Ensaio 3 - Quantificação e Identificação de Isotiocianato nos Extratos de Crambe

Para quantificar alil isotiocianato presente nos extratos descritos anteriormente, foi necessário a filtração em membrana 0,22 µm, e utilizada a metodologia citada por Herzallah e Holley (2012) por meio de cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (HPLC) com coluna C18. O padrão utilizado foi alil isotiocianato (Sigma Aldrich) e a fase móvel acetonitrila: água ultrapura 60:40, com detector UV a 244 nm. O ensaio foi composto de sete tratamentos com três repetições.

4.2.7 Análise Estatística

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado. Foi realizada a análise de variância pelo teste F, e quando significativo, para o primeiro ensaio (extratos de crambe) a comparação de médias foi através do teste de Scott-Knott e as diferenças significativas foram consideradas em todas as análises a $p < 0,05$. Para o segundo ensaio (doses), os resultados foram submetidos a análise de variância e posteriormente foi utilizado regressão para doses e Dunnett para comparação dos extratos com o nematicida. Para o terceiro ensaio (quantificação de isotiocianato) foi utilizado o teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. Foi utilizado o software livre Genes (CRUZ, 2006).

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Ensaio 1 - Efeito dos Extratos de Crambe

Quanto à eclosão de ovos de *M. incognita* (Tabela 4.1) o extrato hidroalcoólico foi o mais efetivo, com 11,6% a menos de eclosão de ovos em comparação ao nematicida químico e menos 71,6% em relação à água. Os extratos obtidos por infusão e trituração apresentaram eclosão 11,2% e 12,4%, respectivamente, maior que o nematicida químico, mas aproximadamente 48% menor em relação à água. O efeito inibitório da eclosão de ovos pode ser devido aos compostos químicos presentes nos extratos que possuem propriedades ovicidas e larvicidas, tais como, alcalóides, flavonóides, saponinas, amidas, benzamidas e cetonas, que isoladamente ou em combinação, afetam o desenvolvimento embrionário ou matam o juvenil ali presente, conforme observado em extratos de *Chromolaena odorata*, *Azadirachta indica*, *Ricinus communis* e *Cymbopogon citratus* no controle de *M. incognita* (ADEGBITE; ADESIYAN, 2005). Ainda, de maneira complementar, o efeito do extrato hidroalcoólico pode estar relacionado ao consumo de lipídeos do nematoide, pois, quanto mais tempo o juvenil fica dentro do ovo, maior será o consumo de lipídeos do seu corpo, e conseqüentemente, menor a infectividade e desenvolvimento (DIAS-ARIEIRA et al., 2002).

Tabela 4.1 - Efeito de extratos de folhas de *Crambe abyssinica* sobre a eclosão de ovos, motilidade e mortalidade de *Meloidogyne incognita*. Marechal Cândido Rondon, PR, 2013.

Tratamentos	Eclosão de ovos (%)	J2 imóveis (%)	J2 mortos (%)
Infusão	26,00 e	26,20 d	6,80 c
Trituração	27,20 e	32,80 c	9,20 c
Metanólico	50,00 d	23,20 d	17,60 b
Cetônico	58,00 c	20,00 d	10,00 c
Hidroalcoólico	3,20 g	94,80 a	93,20 a
Hexânico	62,80 b	22,40 d	16,00 b
Clorofórmico	45,60 d	13,60 e	9,60 c
Água	74,80 a	11,20 e	10,00 c
Nematicida químico	14,80 f	58,40 b	20,00 b
CV (%)	11,01	10,32	15,21

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste Scott Knott à 5% de probabilidade.

Quanto à motilidade de J2, houve elevada inibição desta variável pelo extrato hidroalcoólico, maior inclusive que o tratamento com nematicida químico, com diferença de 36,40%. A maior mortalidade foi promovida pelo extrato hidroalcoólico, que foi superior 73,20%, 75,60% e 77,20% ao nematicida químico, extrato metanólico e extrato hexânico, respectivamente (Tabela 4.1).

Corroborando com o presente trabalho, Elbadri et al. (2008) verificaram que o solvente hexano não apresentou eficiência na extração de compostos nematicidas de diferentes plantas, pois a mortalidade média foi de 16% de *M. incognita* para o extrato na dose 50 mg L⁻¹, resultado de mortalidade semelhante ao presente trabalho, diferindo apenas na dose utilizada.

A menor eclosão de ovos de *M. javanica* ocorreu no extrato hidroalcoólico (Tabela 4.2), que foi 74,40% menor quando comparado à testemunha água, e aproximadamente 14% menor quando comparado aos tratamentos nematicida químico, infusão e trituração. O grupo composto pelo extrato hidroalcoólico e o nematicida químico apresentaram maior inibição da motilidade que os demais. A mortalidade de *M. javanica* observada no extrato hidroalcoólico apresentou-se 28% e 30,40% superior ao nematicida químico e ao extrato metanólico, respectivamente (Tabela 4.2). Fato semelhante foi observado por Neves et al. (2009), onde os extratos cetônico e clorofórmico, tanto de alho, mostarda quanto de pimenta, não apresentaram redução expressiva da população de nematoides e número de galhas de *M. incognita* em tomateiro, provavelmente em função das diferenças de polaridades dos solventes utilizados. Na mesma direção, o extrato hexânico de sementes de nim foram ineficientes na mortalidade de J2 de *Heterodera glycines* comparado aos extratos aquoso e metanólico, o que os autores explicam pelo fato do extrato hexânico apresentar composição essencialmente lipídica (SILVA et al.,

2008). O extrato clorofórmico de *Cinnamomum cassia* contra *Bursaphelenchus xylophilus*, nematoide do pinheiro, também não demonstrou efeito nematicida (NGUYEN et al., 2009).

Tabela 4.2 - Efeito de extratos de folhas de *Crambe abyssinica* sobre a eclosão de ovos, motilidade e mortalidade de *Meloidogyne javanica*. Marechal Cândido Rondon, PR, 2013.

Tratamentos	Eclosão de ovos (%)	J2 imóveis (%)	J2 mortos (%)
Infusão	14,80 d	40,40 b	30,00 c
Trituração	15,20 d	40,80 b	28,00 c
Metanólico	37,20 c	35,20 c	34,00 b
Cetônico	39,20 c	39,20 b	28,80 c
Hidroalcoólico	1,60 e	54,40 a	64,40 a
Hexânico	53,60 b	40,00 b	28,40 c
Clorofórmico	58,00 b	38,40 b	30,80 c
Água	76,00 a	16,80 d	22,40 d
Nematicida químico	16,40 d	56,80 a	36,40 b
CV(%)	10,14	7,34	9,47

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste Scott Knott à 5% de probabilidade.

Mesmo que espécies de brássicas sejam consideradas com potencial para controle de patógenos, o que é atribuído à produção de compostos sulfurosos, os glicosinolatos, os métodos de extração apresentam efeito importante na obtenção dos mesmos, influenciando na quantidade retirada dos vegetais para atuar sobre os patógenos (MOHN et al., 2007; NEVES et al., 2009; WU et al., 2011). Alguns solventes apresentam maior afinidade com a extração de isotiocianatos, fato atribuído às diferenças de polaridade existentes (WU et al., 2009).

No presente trabalho, o nematicida químico não demonstrou efeito promissor como nematostático e nematicida, apresentando baixa mortalidade aos nematoides avaliados. A mortalidade de *M. incognita* (20%) ficou próxima a testemunha água, e muito inferior ao hidroalcoólico (93,20%), assim como para *M. javanica*. Para ambos nematoides a mortalidade com o nematicida químico não chegou a 50%, sendo assim, deveria-se utilizar outro nematicida químico para os demais ensaios.

4.3.2 Ensaio 2 - Efeito das Doses dos Extratos de Crambe

Conforme a Figura 4.1, a eclosão de ovos de *M. incognita* foi reduzida pelo uso de extratos hidroalcoólico e trituração na concentração de aproximadamente 300 mg L⁻¹. Em comparação ao químico, a inibição da eclosão nas doses 200, 300 e 400 mg L⁻¹ do extrato obtido

por trituração foi superior 40%, 46% e 44%, respectivamente. O extrato hidroalcoólico inibiu a eclosão em 49%, 43% e 35% nas doses 200, 300 e 500 mg L⁻¹, respectivamente, em comparação ao nematicida. A inibição da eclosão pelo extrato metanólico quando comparado ao nematicida chegou a 18%, 41%, 40% e 37% nas doses de 200, 300, 400 e 500 mg L⁻¹, respectivamente. Esse resultado não apresentou proporção descendente, ou seja, quanto maior a dose, menor a taxa de eclosão. Isto pode ter acontecido pois, considerando que o extrato utilizado apresenta várias moléculas diferentes pertencentes ao grupo dos glicosinolatos (conforme Figura 3), é possível que tenha ocorrido uma interação antagonística entre as mesmas, resultando da competição por sítios alvos dessas moléculas no nematoide, ou inibição da captação celular da molécula nematotóxica ocasionada por molécula (s) não tóxica (s) a esse organismo (MANDALARI et al., 2010).

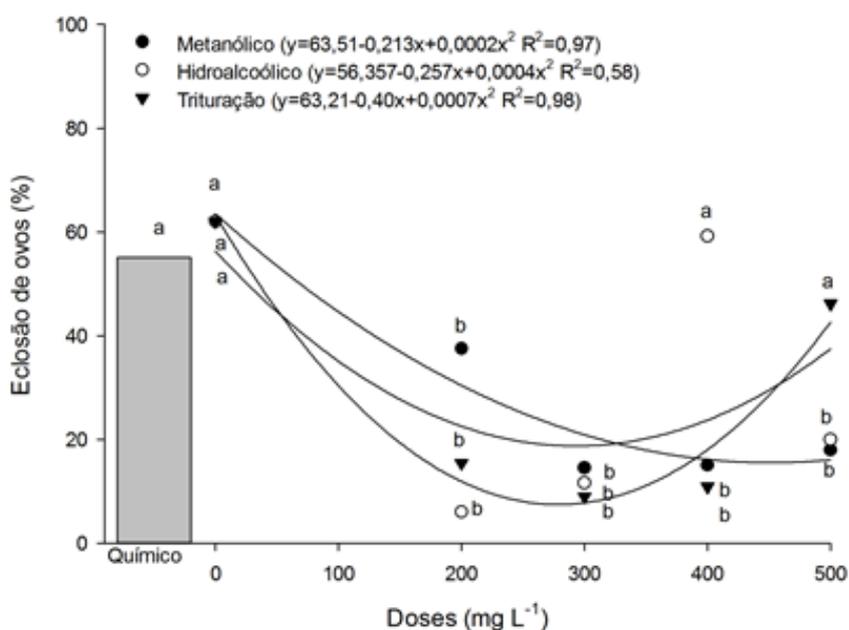


Figura 4.1 - Efeito das doses dos extratos metanólico, hidroalcoólico e triturado de folhas de *Crambe abyssinica* sobre a eclosão de ovos de *Meloidogyne incognita*. *Letras iguais entre o tratamento químico e cada dose dentro de cada extrato, não diferem entre si pelo teste Dunnett à 5% de probabilidade. Marechal Cândido Rondon, PR, 2013.

A maior inibição da motilidade foi encontrada no extrato hidroalcoólico na dose calculada de 250 mg L⁻¹, com 62% de imóveis, valor este superior 57% à dose zero (Figura 4.2). Quanto aos extratos metanólico e obtido pela trituração na dose calculada de 417 e 485 mg L⁻¹, apresentaram 40% e 51% de inibição da motilidade respectivamente, e superior 35% e 46% em relação à dose zero. Os extratos hidroalcoólico e metanólico diferiam do tratamento

nematicida em todas as doses testadas, sendo que a única dose a apresentar maior inibição da motilidade, quando comparado ao nematicida, foi a dose 200 mg L⁻¹ do extrato hidroalcoólico, com valor 34% superior. Quanto ao extrato obtido por trituração, apenas a dose de 400 mg L⁻¹ não diferiu do tratamento químico, as demais doses foram diferentes e inferiores.

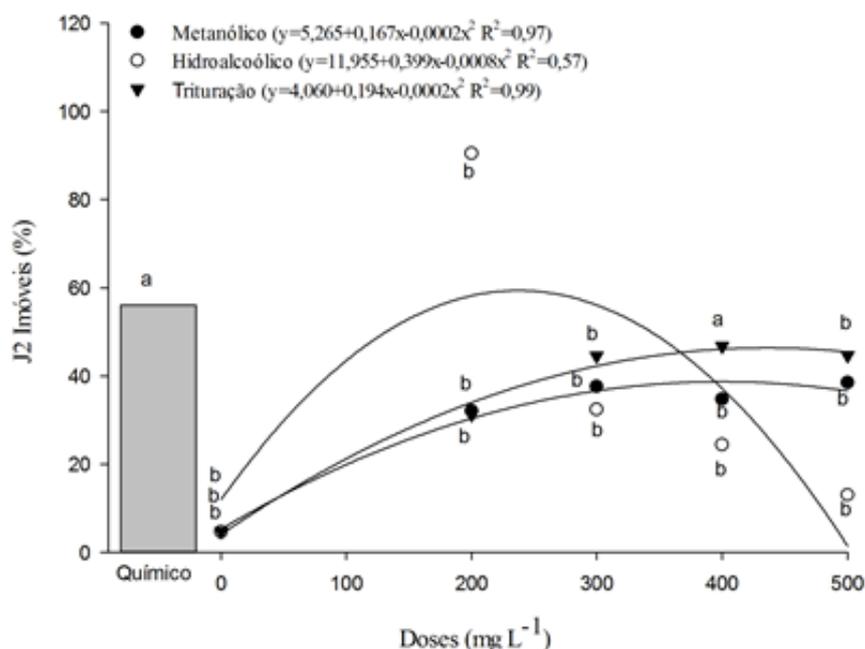


Figura 4.2 - Efeito das doses dos extratos metanólico, hidroalcoólico e triturado de folhas de *Crambe abyssinica* sobre a motilidade de juvenis de *Meloidogyne incognita*. *Letras iguais entre o tratamento químico e cada dose dentro de cada extrato, não diferem entre si pelo teste Dunnett à 5% de probabilidade. Marechal Cândido Rondon, PR, 2013.

O extrato hidroalcoólico na dose calculada de 252 mg L⁻¹ apresentou 52% de mortalidade, 45% superior a dose zero, e 15% e 13% superior aos extratos metanólico e ao obtido por trituração na dose calculada de 535 e 570 mg L⁻¹, respectivamente (Figura 4.3). O extrato hidroalcoólico apresentou maior mortalidade na dose de 200 mg L⁻¹, superior 48% ao químico, enquanto que a dose de 300 mg L⁻¹ não diferiu estatisticamente do químico. Para o extrato metanólico, a dose 400 mg L⁻¹ apresentou menor mortalidade comparado ao químico, porém a diferença foi mínima, de apenas 5%.

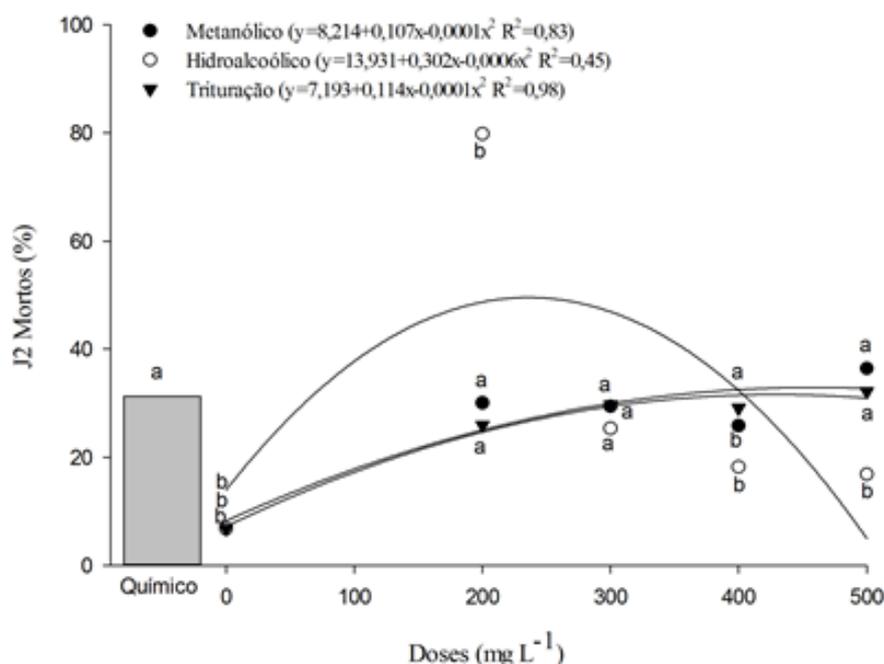


Figura 4.3- Efeito das doses dos extratos metanólico, hidroalcoólico e triturado de folhas de *Crambe abyssinica* sobre a mortalidade de juvenis de *Meloidogyne incognita*. *Letras iguais entre o tratamento químico e cada dose dentro de cada extrato, não diferem entre si pelo teste Dunnett à 5% de probabilidade. Marechal Cândido Rondon, PR, 2013.

O extrato hidroalcoólico de *Artemisia vulgaris* inibiu a eclosão de J2 de *Meloidogyne megadora* em 100% na concentração de 50 e 100 mg mL⁻¹ (50.000 e 100.000 mg L⁻¹) já a exposição a 0,5 mg mL⁻¹ (500 mg L⁻¹) do extrato causou menos inibição da eclosão de ovos, verificando-se o efeito dose-dependente. A mortalidade de 100% dos J2 foi verificada com 50 e 25 mg mL⁻¹ com tempos de exposição de 22 e 26 horas, respectivamente. A atividade nematotóxica foi atribuída a todos os componentes do extrato, e não apenas a alguns, pois, o etanol-água produz uma variabilidade de compostos (COSTA et al., 2003).

Extratos metanol-água de brássica *Armoracia rusticana* apresentaram efeito significativo na paralização e morte de J2 de *M. incognita*, principalmente após três dias de exposição *in vitro* com diferentes doses, variando de 10 a 5000 mg L⁻¹. O EC₅₀ foi observado na concentração 251 mg L⁻¹, e verificaram que o metabólito mais abundante da planta com efeito nematocida foi o alil isotiocianato (AISSANI et al., 2013). No presente trabalho, o extrato metanólico apresentou melhor efeito na motilidade de J2 de *M. incognita* com dose calculada de 450 mg L⁻¹, a maior mortalidade observada foi de 37% na dose de 500 mg L⁻¹, dose esta, acima à citado por aqueles autores. De maneira complementar, o extrato metanólico foi mais eficiente na mortalidade de *M. incognita in vitro* na maior dose, com 500 mg L⁻¹, onde a mortalidade variou de 72% na dose 500 mg L⁻¹ para 7,3% na dose de 50 mg L⁻¹ (ELBADRI et

al., 2008). Isto demonstra diferenças entre os compostos existentes nas plantas e na quantidade destes.

Em estudos com extratos vegetais de *Mentha piperita*, *M. spicata* e *M. pulegium*, Caboni et al. (2013) atribuíram o efeito da mortalidade aos danos na cutícula externa do nematoide pelos compostos presentes no extrato, além de promover inibição da enzima V-ATPase, fazendo com que o nematoide fique paralisado e acabe morrendo.

Para *M. javanica*, a eclosão nos extratos metanólico e obtido por trituração apresentaram comportamento semelhante, e na dose calculada de aproximadamente 350 mg L⁻¹ foram observadas as menores eclosões. O extrato hidroalcoólico apresentou maior eclosão em maiores doses, e sua menor eclosão foi observada na dose calculada de aproximadamente 250 mg L⁻¹, com valor de 22% (Figura 4.4). Em comparação ao nematicida, a inibição da eclosão nas doses 300, 400 e 500 mg L⁻¹ do extrato obtido por trituração foi superior 14,7%, 15,6% e 12%, respectivamente, e a dose de 200 mg L⁻¹ não diferiu estatisticamente. As doses do extrato metanólico e hidroalcoólico não diferiram do nematicida, exceto as dose zero e 400 mg L⁻¹ do extrato hidroalcoólico, com maior eclosão.

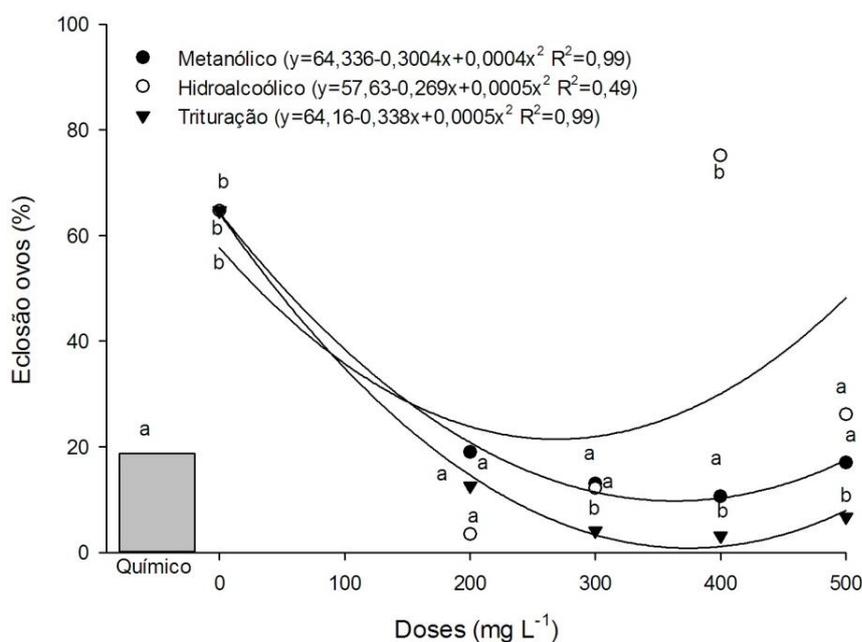


Figura 4.4 - Efeito das doses dos extratos metanólico, hidroalcoólico e triturado de folhas de *Crambe abyssinica* sobre a eclosão de ovos de *Meloidogyne javanica*. *Letras iguais entre o tratamento químico e cada dose dentro de cada extrato, não diferem entre si pelo teste Dunnett à 5% de probabilidade. Marechal Cândido Rondon, PR, 2013.

A maior inibição da motilidade foi do extrato hidroalcoólico na dose calculada de 255 mg L⁻¹, com 82% de J2 imóveis de *M. javanica*, 36% superior à dose zero (Figura 4.5). Quando comparado os extratos com o tratamento nematicida, pode-se observar que todas as doses dos extratos foram semelhantes e não diferiram estatisticamente, exceto a dose zero com menos J2 imóveis e a dose de 200 mg L⁻¹ do extrato hidroalcoólico, apresentando maior inibição da motilidade cerca de 28% superior ao nematicida.

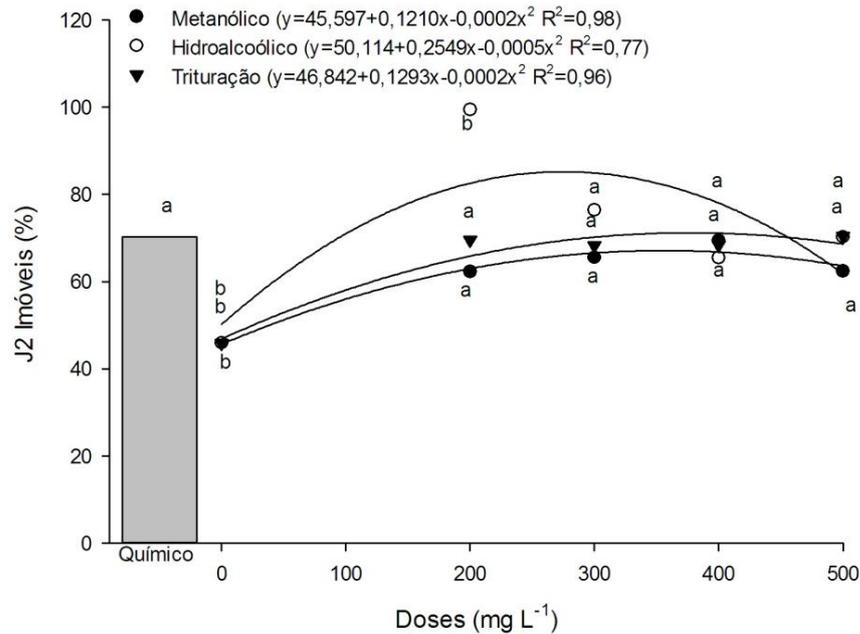


Figura 4.5 - Efeito das doses dos extratos metanólico, hidroalcoólico e triturado de folhas de *Crambe abyssinica* sobre a motilidade de juvenis de *Meloidogyne javanica*. *Letras iguais entre o tratamento químico e cada dose dentro de cada extrato, não diferem entre si pelo teste Dunnett à 5% de probabilidade. Marechal Cândido Rondon, PR, 2013.

Maior efeito na mortalidade de J2 de *M. javanica* foi promovido pelo extrato hidroalcoólico (Figura 4.6), atingindo 78% de mortalidade na dose calculada de 262 mg L⁻¹, valor 38% superior a dose zero e 6% superior a dose de 400 mg L⁻¹ do extrato metanólico. A mortalidade de J2 de *M. javanica* aumentou linearmente com o aumento das doses do extrato obtido por trituração, demonstrando efeito dose-dependente, chegando a 74% na dose 500 mg L⁻¹.

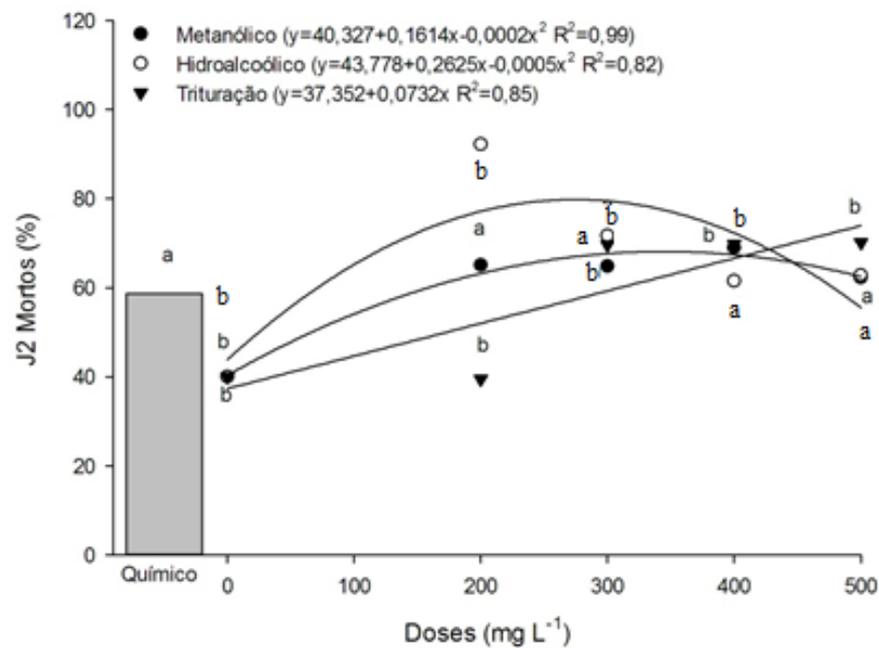


Figura 4.6 - Efeito das doses dos extratos metanólico, hidroalcoólico e triturado de folhas de *Crambe abyssinica* sobre a mortalidade de juvenis de *Meloidogyne javanica*. *Letras iguais entre o tratamento químico e cada dose dentro de cada extrato, não diferem entre si pelo teste Dunnett à 5% de probabilidade. Marechal Cândido Rondon, PR, 2013.

Quando comparado os extratos ao tratamento com nematicida, a dose de 200 mg L⁻¹ do extrato hidroalcoólico apresentou maior mortalidade de J2 com valor aproximadamente 33% superior ao químico, na dose de 300 mg L⁻¹ apresentou 13% a mais, e as demais doses não diferiram do químico. O extrato metanólico na dose de 400 mg L⁻¹ apresentou valor de mortalidade 10% superior ao nematicida, as demais não diferiram deste. Quanto ao extrato obtido por trituração, todas as doses diferiram do nematicida, sendo que apresentaram maior mortalidade doses a partir de 300 mg L⁻¹ comparado ao químico.

A atividade nematicida de extratos vegetais depende da planta utilizada, da concentração e do solvente de extração dos compostos nematotóxicos. O efeito nematicida do extrato metanólico da planta *Cinnamomum cassia* na concentração de 10 mg mL⁻¹, contra *Bursaphelenchus xylophilus*, nematoide do pinheiro, resultou em maior mortalidade na maior concentração (NGUYEN et al., 2009). Extratos aquosos e metanólico de sementes de nim a 1000 mg L⁻¹ causaram a morte de pelo menos 98% dos J2 (SILVA et al., 2008).

4.3.3 Ensaio 3 - Quantificação e Identificação de Isotiocianato nos Extratos de Crambe

O alil isotiocianato foi constatado em apenas dois dos extratos avaliados. Os extratores metanólico e hidroalcoólico foram os que apresentaram afinidade com as moléculas do alil isotiocianato, sendo o extrato metanólico o melhor solvente para a extração, com concentração de 133,88 mg L⁻¹ (Figura 4.7 B). Já o solvente hidroalcoólico, apesar da presença do alil isotiocianato na concentração de 13,57 mg L⁻¹ (Figura 4.7 A), não diferiu estatisticamente dos demais extratos que não apresentaram afinidade para extração do alil isotiocianato. No entanto, o alil isotiocianato, além de outros compostos com efeito sobre os nematoides, podem estar presentes em maior quantidade no extrato hidroalcoólico, pois este solvente pode estar possibilitando a extração de maior número de compostos nematicidas, devido sua alta polaridade. Os tipos de solventes e de suas polaridades podem afetar a interação de compostos, devido a influencia na transferência de elétrons e de átomos de hidrogênio (SANTOS et al., 2012).

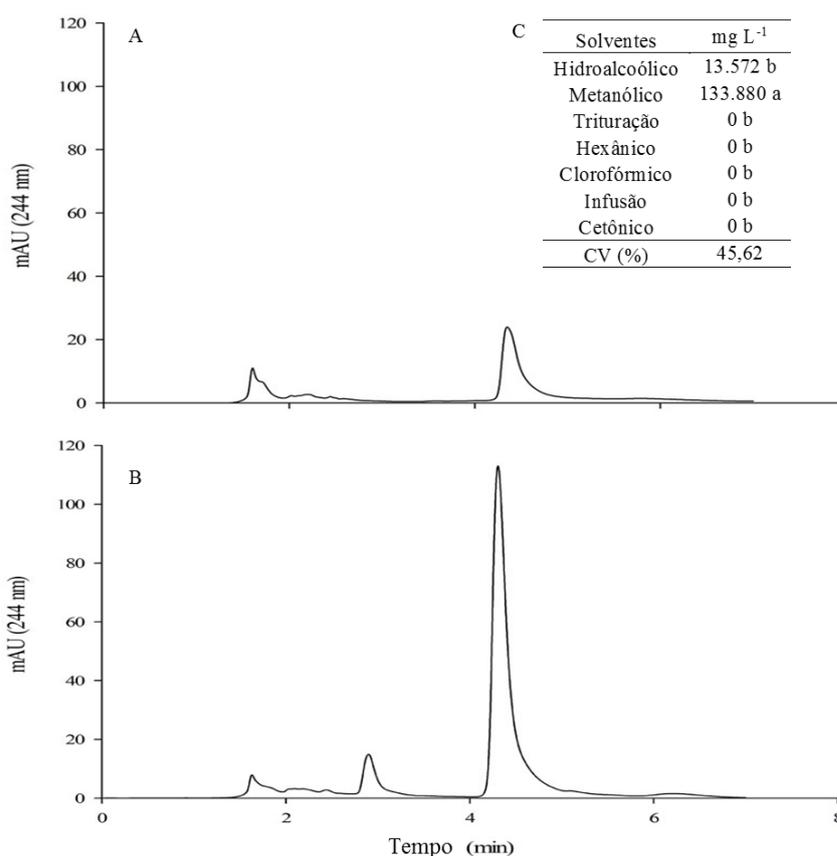


Figura 4.7 – Cromatograma do alil isotiocianato do extrato hidroalcoólico (A) e metanólico (B) em mAU (mili unidades de absorvância) de folhas de *Crambe abyssinica*. O anexo (C) compara a concentração de alil isotiocianato de cada solvente em mg L⁻¹. *Concentração seguida da mesma letra na coluna não difere entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Marechal Cândido Rondon, PR, 2013.

Alguns isotiocianatos como benzil isotiocianato, metil isotiocianato e fenil isotiocianato foram observados em brássicas e com efeito nematicida (AISSANI et al., 2013). Outros isotiocianatos também demonstraram algum efeito nematicida, como etil isotiocianato, benzil tiocianato, 1-feniletil isotiocianato e 2-feniletil isotiocianato, porém, foi acrilóil isotiocianato e alil isotiocianato que apresentaram maior efeito contra nematoides (WU et al., 2011).

Glicosinolatos diferem entre plantas, e os seus derivados como os isotiocianatos, quanto sua toxicidade contra nematoides. Espécies que contém benzil ou 2-feniletil e em menor grau alil isotiocianatos são mais eficazes contra *Tylenchulus semipenetrans* e *M. javanica* quando comparado a butil, etil, metil, fenil e 4-metilsulfínil isotiocianato (ZASADA; FERRIS, 2003). Pode-se sugerir então, que os nematoides do presente trabalho não apresentam alta sensibilidade ao alil isotiocianato, assim como, existe a presença de outros compostos com maior efeito nematotóxico.

C. abyssinica apresenta diferentes glicosinolatos, como glicosinato 2-propenil (sinigrina), 3-butenil (gliconapin), 4-pentenil (glicobrassicinapin), e em maior quantidade 2-hidroxi-3-butenil (epi-progoitrin e progoitrin), entre outros que também fazem parte (WARWICK; GUGEL, 2003). De maneira complementar, o principal glicosinato em *C. abyssinica* cv. Belenzian é o epi-progoitrin, cuja atividade é atribuída à reatividade química do grupo de isotiocianato, que pode facilmente reagir com proteínas (LEONI et al., 1997).

Extrato de *Brassica napus* foi analisado em HPLC para identificação dos glicosinolatos, e no tempo de 4 a 5 min foram observados os picos de progoitrin, epi-progoitrin e sinigrina (LAZZERI et al., 1993), confirmando assim, os glicosinolatos presentes em *C. abyssinica* (WARWICK; GUGEL, 2003), e condizendo com o tempo de retenção do pico de alil isotiocianato do presente trabalho, derivado de glicosinato.

Leoni et al. (1997) explicam que a atividade biológica de isotiocianatos é derivado da hidrólise enzimática de glicosinolatos através da enzima mirosinase. Porém, solventes apolares podem afetar o rendimento da reação enzimática, assim como, solventes hidrofílicos podem desnaturar as enzimas, modificando a estrutura natural das proteínas (JESUS et al., 1997).

Considerando que somente os extratos metanólico e hidroalcoólico apresentaram alil isotiocianato, os efeitos nematicida e nematostático desses e dos demais extratos não podem ser atribuídos somente à presença desse composto, sugerindo assim, que outras moléculas com efeito sobre os nematoides estejam presentes em folhas de *C. abyssinica*, instigando assim, estudos posteriores para identificação das mesmas.

4.4 CONCLUSÃO

- O extrato hidroalcoólico apresentou elevado efeito inibitório da eclosão, além de efeito nematostático e nematocida para *M. incognita* e *M. javanica*, seguido pelo extrato metanólico e por trituração.
- O extrato hidroalcoólico na dose calculada de 250 mg L⁻¹ apresentou maior efeito na mortalidade e na inibição da motilidade e eclosão para *M. incognita* e *M. javanica*.
- Somente os extratos metanólico e hidroalcoólico apresentaram alil isotiocianato.

4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEGBITE, A. A.; ADESIYAN, S. O. Root extracts of plants to control root-knot nematode on edible soybean. **World Journal of Agricultural Sciences**, Faisalabad, v. 1, n. 1, p. 18-21, 2005.

AISSANI, N.; TEDESCHI, P.; MAIETTI, A.; BRANDOLINI, V.; GARAU, V. L.; CABONI, P. Nematicidal activity of allyl isothiocyanate from horseradish (*Armoracia rusticana*) roots against *Meloidogyne incognita*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 61, p. 4723-4727, 2013.

AMARAL, D. R.; OLIVEIRA, D. F.; CAMPOS, V. P.; CARVALHO, D. A. Efeito de alguns extratos vegetais na eclosão, mobilidade, mortalidade e patogenicidade de *Meloidogyne exigua* do cafeeiro. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 26, p. 43-48, 2002.

CABONI, P.; SABA, M.; TOCCO, G.; CASU, L.; MURGIA, A.; MAXIA, A.; MENKISSOGLU-SPIROUDI, U. E.; NTALLI, N. Nematicidal activity of mint aqueous extracts against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 61, p. 9784-9788, 2013.

CLARKE, D. B. Glucosinolates, structures and analysis in food. **Analytical Methods: advancing methods and applications**, Cambridge, v. 2, p. 310-325, 2010.

COSTA, M.J.N.; CAMPOS, V.P.; PFENNING, L.H.; OLIVEIRA, D.F. Toxicidade de filtrados fúngicos a *Meloidogyne incognita*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, p. 749-755, 2001.

COSTA, S. S. R.; SANTOS, M. S. N. A.; RYAN, M. F. Effect of *Artemisia vulgaris* rhizome extracts on hatching, mortality, and plant infectivity of *Meloidogyne megadora*. **Journal of Nematology**, Hanover, v. 35, n. 4, p. 437-442, 2003.

COSTA, M. C. C. D.; AGUIAR, J. S.; NASCIMENTO, S. C. Atividade citotóxica de extratos brutos de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown (Verbenaceae). **Acta Farmaceutica Bonaerense**, Buenos Aires, v. 23, p. 349-52, 2004.

CRUZ, C.D. **Programa Genes: Biometria**. Viçosa: UFV, 2006. 382p.

DIAS-ARIEIRA, C.R.; FERRAZ, S.; FREITAS, L.G.; MIZOBUTSI, E.H. Penetração e desenvolvimento de *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* e *Heterodera glycines* em quatro gramíneas forrageiras. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 26, n. 1, p. 35-41, 2002.

ELBADRI, G. A.; LEE, D. W.; PARK, J. C.; YU, H. B.; CHOO, H. Y. Evaluation of various plant extracts for their nematocidal efficacies against juveniles of *Meloidogyne incognita*. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, Suwon, v. 11, p. 99-102, 2008.

FRANZENER, G.; UNFRIED, J. R.; STANGARLIN, J. R.; FURLANETTO, C. Nematoides formadores de galha e de cisto patogênicos à cultura da soja em municípios do oeste do Paraná. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 29, p. 261-265, 2005.

FRANZENER, G.; FRANZENER, A.S.M.; STANGARLIN, J.R.; FURLANETTO, C.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. Proteção de tomateiro a *Meloidogyne incognita* pelo extrato de *Tagetes patula*. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 31, n. 1, p. 27-36, 2007.

FREITAS, L. G.; NEVES, W. S.; OLIVEIRA, R. D. L. Métodos em nematologia vegetal. In: ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. **Métodos em fitopatologia**. 1. ed. Viçosa: UFV, 2007. p. 253-291.

HARTMAN, K.M.; SASSER, J. N. Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential host test and perineal pattern morphology. In: BARKER, K.R.; CARTER, C.C.; SASSER, J.N. **An advanced treatise on Meloidogyne**. Methodology, North Carolina: University Graphics, 1985. p. 69-77.

HERZALLAH, S.; HOLLEY, R. Determination of sinigrin, sinalbin, allyl- and benzyl isothiocyanates by RP-HPLC in mustard powder extracts. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 47, p. 193-299, 2012.

JESUS, P.C.; JOÃO, J.J.; SILVA, P.L.F.; BURLIN, G.; NASCIMENTO, M.G. Organo-gel: um ovo sistema para a imobilização de lipases e sua aplicação em síntese orgânica. **Química Nova**, São Paulo, v. 20, p. 664-672, 1997.

LAZZERI, L.; TACCONI, R.; PALMIERI, S. *In vitro* activity of some glucosinolates and their reaction products toward a population of the nematode *Heterodera schachtii*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 41, p. 825-629, 1993.

LEONI, O.; IORI, R.; PALMIERI, E. E.; MENEGATTI, E.; CORTESI, R.; NASTRUZZI, C. Myrosinase-generated isothiocyanate from glucosinolates: isolation, characterization and *in vitro* antiproliferative studies. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 5, p. 1799-1806, 1997.

LOGUERCIO, A.P.; BATTISTIN, A.; VARGAS, A.C.; HENZEL, A.; WITT, N.M. Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico de folhas de jabolão (*Syzygium cumini* (L.) Skells). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, p. 371-376, 2005.

MANDALARI, G.C.; BISIGNANO, C.; D'ARRIGO, M.; GINESTRA, G.; ARENA, A.; TOMAINO, A.; WICKHAM, M.S.J. Antimicrobial potential of polyphenols extracted from almond skins. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 51, p. 83-89, 2010.

MOHN, T.; CUTTING, B.; ERNEST, B.; HAMBURGER, M. Extraction and analysis of intact glucosinolates a validated pressurized liquid extraction/liquid chromatography–mass spectrometry protocol for *Isatis tinctoria*, and qualitative analysis of other cruciferous plants. **Journal of Chromatography**, Flórida, v. 1166, p. 142-151, 2007.

NEVES, W. S.; FREITAS, L. G.; COUTINHO, M. M.; DALLEMOLE-GIARETTA, R.; FABRY, C. F. S.; DHINGRA, O. D.; FERRAZ, S. Ação nematicida de extratos de alho, mostarda, pimenta malagueta, de óleo de mostarda e de dois produtos à base de capsainóides e alil isotiocianato sobre juvenis de *Meloidogyne javanica*, (Treub) Chitwood, 1949, em casa de vegetação. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 35, p. 255-261, 2009.

NGUYEN, D. M. C.; NGUYEN, V. N.; SEO, D. J.; PARK, R. D.; JUNG, W. J. Nematicidal activity of compounds extracted from medicinal plants against the pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus*. **Nematology**, Reino Unido, v. 11, p. 835-845, 2009.

SANTOS, M. S.; MIGUEL, O. G.; PETKOWICZ, C. L. O.; CÂNDIDO, L. M. B. Potencial antioxidante e perfil dos ácidos graxos de sementes de gabirola (*Campomanesisa xanthocarpa* Berg). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 32, p. 234-238, 2012.

SILVA, J. C. T.; OLIVEIRA, R. D. L.; JHAM, G. N.; AGUIAR, N. D. C. Effect of neem seed extracts on the development of the Soybean Cysts Nematode. **Tropical Plant Pathology**, Viçosa, v. 33, p. 171-179, 2008.

STANGARLIN, J.R.; KUHN, O.J.; ASSI, L.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. Control of plant diseases using extracts from medicinal plants and fungi. In: MÉNDEZ-VILAS, A. (Ed.). **Science Against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances**. Badajoz: Formatex, 2011. p. 1033-1042.

WARWICK, S. I.; GUGEL, R. K. Genetic variation in the *Crambe abyssinica* – *C. hispanica* – *C. glabrata* complex. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Witzzenhausen, v. 50, p. 291-305, 2003.

WU, H.; ZHANG, G. A.; ZENG, S.; KAI-CHUN, L. Extraction of allyl isothiocyanate from horseradish (*Armoracia rusticana*) and its fumigant insecticidal activity on four stored-product pests of paddy. **Pest Management Science**, Grã-Bretanha, v. 65, p. 1003–1008, 2009.

WU, H.; WANG, C. J.; BIAN, X. W.; ZENG, S. Y.; LIN, K. C.; WU, B.; ZHANG, G. A.; ZHANG, X.. Nematicidal efficacy of isothiocyanates against root-knot nematode *Meloidogyne javanica* in cucumber. **Crop Protection**, Amsterdam, v. 30, p. 33-37, 2011.

ZASADA, I. A.; FERRIS, H. Sensitivity of *Meloidogyne javanica* and *Tylenchulus semipenetrans* to isothiocyanates in laboratory assays. **Nematology**, Reino Unido, v. 93, p.747-750, 2003.

5 CAPÍTULO 2 - CONTROLE DE *Meloidogyne incognita* EM TOMATEIRO POR DIFERENTES FORMAS DE APLICAÇÃO DO EXTRATO DE *Crambe abyssinica*

RESUMO

O extrato vegetal de crambe é uma alternativa para controle de nematoides, seja por ação direta ou indutora de resistência. O objetivo do presente trabalho foi avaliar qual o melhor método de aplicação do extrato de *Crambe abyssinica* para controle de *M. incognita* em tomateiro, por meio da indução de resistência e/ou efeito nematicida. Foi utilizado o extrato hidroalcoólico de crambe, à 250 mg L⁻¹. Em um primeiro experimento em casa de vegetação foram estudadas diferentes vias de aplicação do extrato: foliar; solo; e foliar+solo, em quatro épocas: antes da inoculação; na inoculação; após a inoculação; e semanalmente até 45 dias, culminando com o término do experimento. Em um segundo experimento, foram estudadas três vias de aplicação como citado anteriormente, em duas épocas (após a inoculação e semanalmente). Os resultados indicaram que aplicações via foliar e via solo semanalmente reduziram em 23,50% e 30,77% a massa de ovos, respectivamente. A redução do número de galhas com aplicações semanais tanto via solo como via solo+folha foi de 49,27%. No segundo experimento, menos massa de ovos e galhas totais foram produzidas nas plantas tratadas com aplicações via solo semanalmente. As menores médias de número de juvenis de segundo estágio (J2) e ovos por grama de raiz foram observadas nas plantas tratadas via solo+folha na época após a inoculação, e semanalmente via solo e via solo+folha, com 55,24%, 61,57% e 60% inferior à testemunha (água), respectivamente. Aplicações via foliar semanalmente afetaram a viabilidade das massas de ovos, interferindo no número de J2 e ovos por 100 cm³ de solo. Os resultados demonstram que o extrato de crambe aplicado via solo semanalmente, pode ser utilizado no manejo integrado de *M. incognita* na cultura do tomateiro.

Palavras-chave: Nematóide. *Crambe abyssinica*. Brassicaceae. Nematicida. Indução de resistência.

CAPÍTULO 2 – *Meloidogyne incognita* CONTROL IN TOMATO PLANTS IN DIFFERENT FORMS OF APPLICATION OF *Crambe abyssinica* EXTRACT

ABSTRACT

The herbal extract of crambe is alternative to control nematodes, by either direct action or inducing resistance. The objective of this study was to evaluate the best application method of the *Crambe abyssinica* extract to control *M. incognita* in tomato plants, through the induction of resistance and/or nematicide effect. The hydroalcoholic extract of crambe was used at 250 mg L⁻¹. In a first experiment in a greenhouse different routes of the extract administration were studied: leaf; soil; and leaf+ soil, in four periods: before inoculation; on inoculation; after inoculation; and weekly up to 45 days, culminating with the end of the experiment. In a second experiment, three routes of administration were studied, as previously mentioned, in two seasons (after inoculation and weekly). The results indicated that applications via leaf and soil weekly decreased on 23.50% and 30.77% the egg mass, respectively. The reduction of the number of galls with weekly applications both via soil and via soil+leaf was 49.27%. In the second experiment, less mass of total eggs and galls were produced in the plants treated with weekly soil applications. The lowest rates of second stage juvenile (J2) number and eggs per gram of root were observed in the plants treated via soil+leaf after inoculation, and weekly via soil+leaf, 55.24%, 61.57% and 60% lower than the control (water), respectively. Weekly leaf applications affected the viability of egg masses, interfering in the number of J2 and eggs per 100 cm³ of soil. The results showed that crambe extract applied via soil weekly, can be used in the integrated management of *M. incognita* in tomato plants.

Keywords: Nematode. *Crambe abyssinica*. Brassicaceae. Nematicide. Induction of resistance.

5.1 INTRODUÇÃO

A cultura do tomate (*Solanum lycopersicum* L.) é hospedeira do gênero *Meloidogyne*. Dentre as espécies do gênero *Meloidogyne*, quatro são consideradas mais importantes, pela ampla distribuição geográfica e alto grau de polifagismo que apresentam: *M. arenaria*, *M. incognita*, *M. javanica* e *M. hapla* (FERRAZ; MONTEIRO, 2011). A espécie *M. incognita* é provavelmente o patógeno mais prejudicial às culturas no mundo (TRUDGIL; BLOK, 2001). O manejo de nematoides compreende várias práticas, incluindo o uso de químicos, porém, nem sempre são adequadas às necessidades do agricultor, ou economicamente viáveis, além, de efeitos secundários negativos provocados pelo uso indiscriminado de químicos (BALDIN et al., 2012; ZHANG et al., 2012). Portanto, a utilização de compostos de origem vegetal pode ser uma alternativa promissora no manejo de nematoides (CHITWOOD, 2002).

Várias espécies de plantas apresentam efeito nematicida contra *M. incognita*, como extrato de *Cinnamomum cassia* (DONG-JUN et al., 2014;), *Eucalyptus exserta* (LI; XU, 2012) e *Eucalyptus citriodora*, na qual o efeito nematicida pode estar relacionado ao ácido ferrúlico, cumárico, benzoico, clorogênico, gálico e hidroxibenzóico (EL-ROKIEK; EL-NAGDI, 2011). O efeito nematicida de *Euphorbia hirta* foi atribuído aos constituintes taninos, saponinas, flavonoides e alcaloides; *Andropogon gayanus* à presença de saponinas, flavonóides e alcalóides; *Cassia obtusifolia* a taninos, flavonoides e alcaloides; *Phyllanthus amarus* à presença de taninos, saponinas, flavonoides e alcaloides; e *Sida acuta* à presença de taninos, saponinas, flavonoides e esteróis (OLABIYI et al., 2008). Espécies de brássicas produzem glicosinolatos e seus derivados, após hidrólise enzimática, atuam sobre nematoides, fungos e patógenos de solo (OLIVEIRA et al., 2011; SARWAR et al., 1998). O crambe (*Crambe abyssinica* Hochst) é uma planta da família Brassicaceae, e esta planta contém glicosinolatos (FALASCA et al., 2010).

Extratos vegetais diferem quanto ao momento de aplicação, e controlam nematoides não exclusivamente pelo efeito nematicida e/ou nematostático, mas outros mecanismos de proteção às plantas também podem estar envolvidos (FRANZENER et al., 2007). A raiz é o local principal para abrigo e sustento de fitonematoides, local protegido muitas vezes do sítio de aplicação de produtos nematicidas. Assim sendo, indutores de resistência podem favorecer o manejo destes organismos, protegendo as plantas tratadas além de ser ambientalmente correto (SALGADO; SILVA, 2005). No entanto, os indutores de resistência podem variar sua ação de proteção da planta em função do produto fornecido, do método de aplicação, da idade, sanidade das plantas e condições ambientais (MOLINARI; BASER, 2010).

São vários os efeitos promovidos pela resistência aos nematoides. Inicialmente os exsudatos radiculares podem favorecer ou prejudicar o início da interação nematoide-planta. Além disso, pode haver o acúmulo de substâncias envolvidas no reforço da parede celular, dificultando a penetração e migração do nematoide na planta. Adicionalmente, substâncias inibitórias podem interferir no estabelecimento, alimentação, desenvolvimento e reprodução do nematoide (SALGADO; SILVA, 2005).

A maioria dos estudos envolvendo brássicas no controle de nematoides trabalha com a biofumigação, com incorporação do material vegetal fresco ou seco no solo para posterior liberação de compostos biocidas (OLIVEIRA et al., 2011).

Este trabalho objetivou utilizar extrato hidroalcoólico de *Crambe abyssinica*, em diferentes formas de aplicação, no controle de *M. incognita*, por meio da indução de resistência e/ou efeito nematicida em tomateiro.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Condução do Experimento

O experimento foi conduzido nos meses de abril à junho de 2014 (primeiro experimento) e a repetição do experimento (segundo experimento) foi conduzido nos meses de outubro à dezembro de 2014. Estes foram conduzidos em casa de vegetação climatizada localizado no Complexo de Controle Biológico e Cultivo Protegido Prof. Dr. Mário César Lopes, pertence a Universidade Estadual do Oeste do Paraná- UNIOESTE, *campus* Marechal Cândido Rondon, Paraná

Para ambos os experimentos o delineamento experimental foi em blocos casualizados com cinco repetições. O extrato utilizado foi o hidroalcoólico 250 mg L⁻¹ preparado segundo a metodologia proposta por Loguercio et al. (2005). As folhas de crambe foram coletadas aos 35 dias após emergência da cultura (DAE) no município de Cascavel-PR, coordenadas de latitude 24°57'21" sul e longitude 53°27'19" oeste, altitude de 781 metros, foram secas em estufa a 45 °C por 48 h, trituradas em moinho de facas e passadas em peneiras de 48 Mesh, obtendo-se o pó desta planta, e armazenado em recipiente fechado no escuro a temperatura ambiente até o momento de preparo dos extratos.

O extrato por solução hidroalcoólica (70% v/v álcool etílico-C₂H₆O), foi estocada à temperatura ambiente, protegida da luz, por um período de 15 dias, após foi filtrado em papel

filtro Whatman n° 1, em seguida, roto-evaporados à vácuo em temperatura de aproximadamente 50 °C, e ressuspenso em 1000 mL de água destilada com 0,6% de Tween 20.

Foram utilizadas mudas de tomateiro Santa Cruz Kada (Paulista) com 25 dias após a semeadura (DAS), em bandejas de polietileno com substrato comercial Plantmax, e transplantadas em vasos com capacidade de três litros preenchidos com solo autoclavado à 120 °C/1 atm durante 1 hora, na proporção de 3:2:1 (solo:areia:materia orgânica). Após foi enviado uma amostra de solo para análise química no Laboratório de Química Agrícola e Ambiental da Unioeste, para posterior correção conforme recomendação de Trani, Nagai e Passos (1997).

O inóculo de *M. incognita* foi obtido de tomates infectados cultivados em casa de vegetação e identificados com base na configuração da região perineal (HARTMAN; SASSER, 1985).

5.2.2 Variáveis Analisadas

As variáveis foram analisadas 45 dias após inoculação, com o término do experimento. Após a separação das raízes do solo, estas foram lavadas e secas em temperatura ambiente para determinação da massa fresca da raiz, posterior armazenamento em sacos plásticos tanto as raízes como o solo separados em temperatura próxima aos 4 °C.

5.2.2.1 Massa de Ovos e Galhas Totais nas Raízes

Para verificar a existência de massa de ovos nas raízes, estas foram coradas com Floxina B à 15 mg L⁻¹ durante 20 min, após lavadas para tirar o excesso de corante (TAYLOR; SASSER, 1978), secas com papel toalha e contadas galhas com massa de ovos e sem massa de ovos com auxílio de lupa de mesa. O número de galhas totais foi quantificado visualmente por contagem com auxílio de lupa de mesa.

5.2.2.2 Número de Ovos e Juvenis de Segundo Estádio (J2) por grama (g) de raiz

Para extração de ovos e nematoides das raízes foi utilizado a metodologia de Freitas et al. (2007). As raízes foram cortadas e trituradas em liquidificador por 20 seg, vertido sobre peneira de 0,427 mm de abertura de malha (48 Mesh) acoplada na peneira de 0,037 mm de abertura de malha (400 Mesh), nesta os nematoides foram retidos e o conteúdo recolhido em tubos de centrífuga e submetidos ao método de flotação centrífuga em solução de sacarose. Os

ovos e J2 retidos na peneira de 400 Mesh foram transferidos para lâmina de Peters e quantificado com auxílio de microscópio óptico.

5.2.2.3 Número de Ovos e J2 por 100 cm³ de Solo

O método flotação centrífuga em solução de sacarose foi empregado para extração de ovos e nematoides do solo (JENKIS, 1964). O procedimento correspondeu com a extração de 100 cm³ de solo, peneiramento à 0,427 mm de abertura de malha (48 Mesh) acoplada na peneira de 0,037 mm de abertura de malha (400 Mesh), nesta os nematoides foram retidos e o conteúdo recolhido em tubos de centrífuga e submetidos a centrifugação em solução de sacarose com densidade de 1,15 g cm³. Os ovos e J2 retidos na peneira de 400 Mesh foram transferidos para lâmina de Peters e quantificado.

5.2.3 Primeiro Experimento

O esquema fatorial (3x4+1) foi utilizado, sendo, três vias de aplicação na planta: via solo, via foliar e via solo+foliar, em quatro épocas de aplicação: 1) antes da inoculação (três dias após o transplante das mudas); 2) na inoculação (sete dias após o transplante); 3) após a inoculação (uma semana após a inoculação); e 4) semanalmente até aos 45 dias após a inoculação, totalizando nove aplicações (incluindo todas as épocas de aplicação citadas anteriormente) e um tratamento adicional, testemunha inoculada e não tratada.

As plantas foram tratadas com fungicida (Trifloxistrobina+ Tebuconazol (75 + 150 g i.a. ha⁻¹)) devido a presença da mancha-de-estenfílio, causada pelo fungo *Stemphyllium* sp., 15 dias após o transplante, com três dias de diferença para a aplicação do extrato, e a outra aplicação de fungicida foi 15 dias após a primeira aplicação.

A pulverização das folhas com o extrato foi com borifador na parte adaxial até ponto de escorrimento, para não entrar em contato com o solo, o vaso foi coberto com papel laminado e jornal, para que a aspersão não entrasse em contato com outras plantas estes vasos foram retirados e isolados, plantas tratadas via solo receberam 30 mL do extrato por vaso, correspondendo à 1% do v/v. Todos os tratamentos foram efetuados no período da manhã. Após sete dias do transplante foi efetuada a inoculação de 5.000 ovos e 589 J2 por vaso de *M. incognita*, por meio de perfurações ao redor das raízes, com profundidade de 5 cm.

Para análise dos dados foi realizado o teste de normalidade de Lilliefors à 5% de probabilidade, em todos os dados foi aplicado o teste Q, ficando com quatro repetições, e ainda na ausência de normalidade, como para massa de ovos, os dados foram transformados em

$\sqrt{x + 0,5}$. Posteriormente, realizou-se a análise de variância e as médias referentes aos tratamentos foram submetidas ao teste de média de Tukey, e quando o tratamento adicional mostrava-se significativo na análise de variância utilizou-se um teste adicional, o Dunnett. O software estatístico Genes (CRUZ, 2006) foi utilizado.

5.2.4 Segundo Experimento

Após análise dos dados do primeiro experimento, foi conduzido um segundo experimento para confirmação das melhores épocas de aplicação. Utilizou-se o esquema fatorial (3x2+1), três vias de aplicação na planta, como citado no primeiro experimento, e duas épocas de aplicação: 1) após inoculação (uma semana após a inoculação); e 2) semanalmente (inclui as aplicações: três dias após o transplante das mudas; sete dias após o transplante; uma semana após a inoculação e semanalmente até aos 45 dias após a inoculação, totalizando nove aplicações. Foram inoculados 5.074 ovos e 1000 J2 por vaso. As mudas foram tratadas com fungicida (Trifloxistrobina+ Tebuconazol (75 + 150 g i.a. ha⁻¹)) devido a ocorrência mancha-de-estenfílio, oito dias antes do transplante.

Após a contagem do número de massa de ovos e galhas totais, as massas de ovos foram coletadas para avaliar a viabilidade. Foram utilizadas três repetições por tratamento e em triplicata, em delineamento inteiramente casualizado. Placas de Elisa com água destilada foram utilizadas e em cada célula da placa Elisa foi colocado uma massa de ovos, após 15 dias foi avaliado a eclosão dos ovos.

Para análise dos dados foi realizado o teste de normalidade de Lilliefors à 5% de probabilidade, e em todos os dados foi aplicado o teste Q, ficando com quatro repetições. A normalidade somente foi encontrada para massa de ovos e galhas totais quando os dados foram transformados em $\log(x+1)$. Posteriormente, realizou-se a análise de variância e as médias referentes aos tratamentos foram submetidas ao teste de média de Tukey, e quando o tratamento adicional mostrava-se significativo na análise de variância utilizou-se um teste adicional, o Dunnett. O software estatístico Genes (CRUZ, 2006) foi utilizado.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Aplicações do extrato aquoso de crambe semanalmente pela via solo+folha apresentou 18,17% a menos de massa de ovos em tomateiro do que a mesma via de aplicação na época

após a inoculação, e inferiores 31% e 16,23% comparado à testemunha, respectivamente (Tabela 5.1).

Tabela 5.1 - Massa de ovos em raízes de tomateiro inoculados com *Meloidogyne incognita*, na qual as raízes das plantas de tomateiro foram tratadas com extrato de *Crambe abyssinica*, e as mesmas plantas receberam o extrato em diferentes vias e em épocas distintas de aplicação, sendo antes da inoculação (três dias após o transplante das mudas); na inoculação (sete dias após o transplante); após a inoculação (uma semana após a inoculação); e semanalmente até aos 45 dias após a inoculação (incluindo as demais aplicações), o tratamento adicional é representado pela testemunha inoculada e não tratada. Marechal Cândido Rondon, abril de 2014.*

Vias de aplicação do extrato	Épocas de aplicação			
	Antes da inoculação	Na inoculação	Após a inoculação	Semanalmente
Solo	1178,25 Aa α	1170,75 Aa α	1147,00 Aa α	551,00 Bb
Folha	1068,00 Aa α	1301,00 Aa α	666,50 Bb	1146,00 Aa α
Solo + Folha	990,75 Ba α	1291,00 Aa α	807,00 Bb	538,00 Cb
Testemunha	1137,50 α			
CV (%)	7,85	3,58	6,97	7,19

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

^aMédias não diferem da testemunha pelo teste de Dunnett ao nível de 5% de probabilidade.

*Neste primeiro experimento foram utilizados quatro épocas de aplicação.

Na época após a inoculação, o efeito principal foi da aplicação foliar, devido à ausência de diferença estatística com a via foliar+solo. No entanto, a via solo na época após a inoculação não demonstrou controle, talvez pelo fato de que os J2 já tivessem penetrado nas raízes, sem controle efetivo. Já via foliar, mesmo que o J2 já tivesse penetrado, a planta reagiria com mecanismos de defesa, prejudicando a reprodução e, conseqüentemente, formando menos massa de ovos. A reprodução poderia ser prejudicada por alguma interferência na formação das células nutridoras. O desenvolvimento e reprodução de nematoides dependem do estabelecimento e manutenção de locais de alimentação especializados dentro da raiz (CAILLAUD et al., 2008). Alguns autores tais como Chinnasri et al. (2003) e Molinari e Baser (2010) verificaram que a aplicação de um indutor de resistência acibenzolar-S-metil (ASM) não inibiu a penetração e sítios de alimentação, mas sim a reprodução dos nematoides.

Alguns critérios são necessários para confirmar se ocorreu resistência induzida, como a necessidade de um intervalo de tempo entre a exposição da planta ao indutor e a expressão da resistência (BONALDO et al., 2005). No entanto, Oka e Cohen (2001) verificaram que a aplicação de ácido DL- β -amino-*n*-butirico (BABA) em plantas de tomateiro até 16 dias após a inoculação do nematoide foi eficaz na redução de massa de ovos de *Meloidogyne* por

mecanismos de resistência induzidos. Isso corrobora com os resultados obtidos neste trabalho, já que aplicações foliares após a inoculação também resultaram em redução da massa de ovos de *M. incognita*.

As aplicações via solo exigem mais aplicações, desde o início do cultivo até o final, para que assim, o substrato sempre tenha presente os compostos nematicidas e/ou nematostático com maior contato do nematoide, fazendo que o J2 atrase ou não penetre na raiz. As condições ambientais, a estabilidade de compostos presentes nas soluções derivadas de plantas, podem afetar os mecanismos de ação, degradando-os rapidamente no solo, exigindo assim, várias aplicações (SILVA et al., 2005).

Corroborando com o presente trabalho, na qual aplicação via solo foi melhor que via foliar semanalmente, Oka e Cohen (2001), verificaram que aplicações via foliar de BABA contra *Meloidogyne* em trigo e cevada, reduziu o número de massa de ovos em até 72% à 8.000 mg L⁻¹, enquanto que o molhamento do solo à 500 mg L⁻¹ reduziu em 94% o número de massa de ovos, demonstrando maior inibição do desenvolvimento de *Meloidogyne* sp. nas plantas tratadas via solo com menor dose utilizada.

Espécies de brássicas possuem glicosinolatos, estes são hidrolisados em isotiocianatos, nitrilas, tiocianatos e epinitrilas. No entanto, a supressão de patógenos no solo está relacionado com a liberação de isotiocianatos, a partir da hidrólise enzimática de glicosinolatos na presença de água (MAYTON et al., 1996). Os isotiocianatos tem vida útil no solo geralmente curta, alií isotiocianato em seis tipos de solo variaram de 20 a 60 horas de vida útil, o que pode ser vantajoso se tratando de impactos ambientais e desvantajoso por não estar presente em tempo suficiente para produzir o efeito desejado sobre as pragas (OLIVEIRA; DHINGRA, 2008; AISSANI et al., 2013). Embora alguns isotiocianatos se degradam rapidamente em solo nativo, cerca de 96 h, quando fornecidos continuamente mesmo em concentrações baixas podem afetar os patógenos do solo, além disso, são persistentes em solo esterilizado, sendo assim, o principal mecanismo para o desaparecimento nos solos é a degradação microbiana (RUMBERGER; MARSCHNER, 2003). Estes resultados contribuem para explicar a exigência de aplicações sequenciais da via solo para controlar os nematoides. Uma vez que, o extrato hidroalcoólico do presente estudo é de *Crambe abyssinica*, e é uma espécie de brássica que possui glicosinolato e seus derivados, assim podem apresentar vida útil curta no solo.

Aplicações do extrato via solo foram efetivas na redução de galhas totais somente quando aplicados semanalmente (Tabela 5.2), já via foliar apresentou controle somente na época após a inoculação. O número de aplicações foliares depende do indutor, pois, Oka e Cohen (2001), observaram correlação negativa entre o número de aplicações foliares do BABA

(em intervalo de dez dias, iniciando dois dias antes da inoculação) e o número de cistos de *Heterodera avenae* em trigo.

Tabela 5.2 - Galhas totais em raízes de tomateiro inoculados com *Meloidogyne incognita*, na qual as raízes das plantas de tomateiro foram tratadas com extrato de *Crambe abyssinica*, e as mesmas plantas receberam o extrato em diferentes vias e em épocas distintas de aplicação, sendo antes da inoculação (três dias após o transplante das mudas); na inoculação (sete dias após o transplante); após a inoculação (uma semana após a inoculação); e semanalmente até aos 45 dias após a inoculação (incluindo as demais aplicações), o tratamento adicional é representado pela testemunha inoculada e não tratada. Marechal Cândido Rondon, abril de 2014.*

Vias de aplicação do extrato	Épocas de aplicação			
	Antes da inoculação	Na inoculação	Após a inoculação	Semanalmente
Solo	1561,75 Aa α	1665,25 Aa α	1581,75 Aa α	710,50 Bb
Folha	1543,25 Aa α	1724,00 Aa	899,75 Bb	1542,75 Aa α
Solo + Folha	1317,25 Ba α	1739,00 Aa	1018,00 BCb	710,50 Cb
Testemunha	1400,50 α			
CV (%)	17,75	3,83	14,66	14,52

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

α Médias não diferem da testemunha pelo teste de Dunnett ao nível de 5% de probabilidade.

*Neste primeiro experimento foram utilizados quatro épocas de aplicação.

Aplicações via solo+folha semanalmente foi mais efetivo em reduzir o número de galhas comparado com a época antes da inoculação em 46%, porém, antes da inoculação não diferiu da testemunha. A época após a inoculação é intermediário e não diferiu estatisticamente de ambas, porém 30,20% a mais de galhas totais comparado a época semanal. Assim como para massa de ovos (Tabela 5.1), galhas totais (Tabela 5.2) resultantes da época após a inoculação têm como efeito principal a aplicação foliar, e para a época semanal, a via solo.

Estudos realizado por Franzener et al. (2005) utilizando extrato de flores *Tagetes patula* no controle de *M. incognita* em tomateiro demonstrou que, houve diferença entre as épocas de aplicação, com melhor efeito para o extrato aplicado semanalmente tanto aplicado na folha como via solo ou ambos concomitantemente, resultando em redução de 62,2 % de galhas, em 61,5% o número de juvenis no solo e em 52,8% o número de ovos nas raízes de tomateiro, apenas uma aplicação não apresentou efeito na proteção do tomateiro.

A redução do número de galhas do presente estudo, pode também ser devido a interferência do extrato hidroalcoólico de crambe diretamente no nematoide, fazendo com que menos J2 infecte a raiz, e conseqüente, menos células nutridoras. Pois, alguns extratos vegetais

promoveram a morte de J2, tal fato foi atribuído, à danos ocasionados na cutícula externa do nematoide pelos compostos presentes no extrato, além de promover inibição da enzima V-ATPase, fazendo com que o mesmo fique paralisado e acabe morrendo (CABONI et al., 2013). Borges et al. (2013) observaram mortalidade de J2 de *M. incognita* em aplicações de extratos de nim, açafraão da terra e crotalária *in vitro*. De acordo com Babu et al. (2012), 16 fitoquímicos (β -cariofileno, miristicina, eugenol, capsaicina, α -terpineol, geraniol, curcumina, neral, ácido cinâmico, norvalinamida, piperina, linalol, isoeugenol, vanilina, α -pineno e citronelol) derivados de plantas, apresentam efeito nematicida, e este efeito na mortalidade de *M. incognita* está relacionado a inibição de glutathione-S-transferase, que são importantes no metabolismo do nematoide por atuarem no sistema de defesa. Andrade et al. (2010) observaram que uma proteína produzida por crotalária inibe a papaína, uma importante enzima alcaloide relacionada a digestão em *M. incognita*.

Conforme apresentado no primeiro experimento, as épocas após a inoculação e semanalmente foram mais eficientes na redução do número de massa de ovos e galhas totais, assim, somente estas seriam repetidas no segundo experimento.

A massa de ovos no segundo experimento (Tabela 5.3) não diferiu entre as vias de aplicação e épocas, assim como as galhas totais. Porém, aplicações semanais pela via solo diferiu da testemunha, 21,40% à menos de massa de ovos e 19,56% de galhas totais. Estes resultados confirmam os encontrados no primeiro experimento, na qual aplicações via solo tem efeito quando aplicados semanalmente.

Tabela 5.3 - Massa de ovos (MO) e galhas totais (GT) em raízes de tomateiro inoculados com *Meloidogyne incognita*, na qual a planta foi tratada com extrato de *Crambe abyssinica* em diferentes vias e em épocas distintas de aplicação, sendo após a inoculação (uma semana após a inoculação) e semanalmente até aos 45 dias após a inoculação, a testemunha é considerada como tratamento adicional e é representado por plantas inoculadas e não tratadas. Marechal Cândido Rondon, outubro de 2014.*

Vias de aplicação do extrato	MO ^{ns}		GT ^{ns}	
	Épocas de aplicação			
	Após a inoculação	Semanalmente	Após a inoculação	Semanalmente
Solo	291,25 α	147,00	315,00 α	183,75
Folha	453,50 α	317,75 α	525,75 α	353,50 α
Solo + Folha	336,75 α	247,25 α	389,25 α	296,75 α
Testemunha	557,25 α		630,50 α	
CV (%)	9,17	12,62	8,98	12,41

^{ns} Médias não diferem estatisticamente entre si pela análise de variância.

^aMédias não diferem da testemunha pelo teste de Dunnett ao nível de 5% de probabilidade.

*Neste segundo experimento foram utilizadas apenas duas épocas de aplicação.

O número de galhas e massa de ovos de *M. incognita* foi reduzido em tomateiros tratados com farinha de semente e de folhas da *Brassica juncea* incorporado ao solo, controle de 95% a 99% foi alcançado, estas diferenças entre os tratamentos testados foram devido ao conteúdo de alil isotiocianato liberado no solo, por meio da mortalidade de juvenis e repressão da eclosão de ovos (OLIVEIRA et al., 2011). Devido aos valores superiores de controle observados por outros autores em comparação com os do presente estudo, o maior controle de galhas totais chegou a 49,27% e 31% de massa de ovos. Pode-se sugerir que o extrato utilizado faça parte do manejo integrado de nematoides juntamente com outras práticas.

A variável J2 e ovos por grama de raiz do primeiro experimento está representando na Tabela 5.4, e diferiu entre as épocas de aplicação apenas para a aplicação via foliar, sendo a maior média (435,47) na época antes da inoculação, as demais foram inferiores e não diferiram estatisticamente entre si.

Tabela 5.4 - Ovos e juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita* por grama de raiz, na qual as raízes das plantas de tomateiro foram tratadas com extrato de *Crambe abyssinica*, e as mesmas plantas receberam o extrato em diferentes vias e em épocas distintas de aplicação, sendo antes da inoculação (três dias após o transplante das mudas); na inoculação (sete dias após o transplante); após a inoculação (uma semana após a inoculação); e semanalmente até aos 45 dias após a inoculação (incluindo as demais aplicações), o tratamento adicional é representado pela testemunha inoculada e não tratada. Marechal Cândido Rondon, abril de 2014.*

Vias de aplicação do extrato	Épocas de aplicação			
	Antes da inoculação	Na inoculação	Após a inoculação	Semanalmente
Solo	228,20 Ac	239,24 Ab	216,64 Aa	170,67 Ab
Folha	435,47 Aa α	206,25 Bc	216,09 Ba	266,73 Ba
Solo + Folha	283,11 Ab α	261,63 Aa	198,79 Ab	177,65 Ab
Testemunha	444,15 α			
CV (%)	28,91	33,88	7,39	24,53

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

α Médias não diferem da testemunha pelo teste de Dunnett ao nível de 5% de probabilidade.

*Neste primeiro experimento foram utilizados quatro épocas de aplicação.

O extrato demonstrou-se efetivo no controle, pois, na maioria dos tratamentos houve redução desta variável comparado à testemunha. Além disso, pode-se observar que existem diferenças entre as vias de aplicação para cada época, como por exemplo, na época antes da inoculação, a aplicação via solo foi a melhor, com menor média comparado as outras vias, e 48,62% inferior a testemunha, já na época na inoculação, a menor média observada foi no tratamento via foliar, com 53,56% inferior a testemunha, após a inoculação a via solo+folha apresentou 55,24% inferior a testemunha e semanalmente via solo e via solo+folha, não diferiram entre si, mas com 36% e 33,30% inferior a aplicação via foliar, respectivamente, e 61,57% e 60% inferior a testemunha.

De acordo com a Tabela 5.5, aplicações na época após a inoculação pela via foliar, apresentou 70,97% à menos de J2 e ovos por 100 cm³ de solo comparado a época antes da inoculação pela via foliar que apresentou a maior média (1149,60), as demais épocas foram intermediárias e não diferiram estatisticamente destes. Este efeito pode ser resultado da interferência na reprodução dos nematoides.

Tabela 5.5 - Ovos e juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita* por 100 cm³ de solo, na qual as raízes das plantas de tomateiro foram tratadas com extrato de *Crambe abyssinica*, e as mesmas plantas receberam o extrato em diferentes vias e em épocas distintas de aplicação, sendo antes da inoculação (três dias após o transplante das mudas); na inoculação (sete dias após o transplante); após a inoculação (uma semana após a inoculação); e semanalmente até aos 45 dias após a inoculação (incluindo as demais aplicações), o tratamento adicional é representado pela testemunha inoculada e não tratada. Marechal Cândido Rondon, abril de 2014.*

Vias de aplicação do extrato	Épocas de aplicação			
	Antes da inoculação	Na inoculação	Após a inoculação	Semanalmente
Solo	756,00 Aa α	1078,80 Aa α	1082,40 Aa α	974,40 Aa α
Folha	1149,60 Aa α	770,40 ABa α	334,80 Bb	417,85 ABa
Solo + Folha	1113,60 Aa α	718,80 Aa α	472,80 Aab	776,40 Aa α
Testemunha	1089,60 α			
CV (%)	60,71	29,46	35,57	46,03

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

^aMédias não diferem da testemunha pelo teste de Dunnett ao nível de 5% de probabilidade.

*Neste primeiro experimento foram utilizados quatro épocas de aplicação.

Após a inoculação foi a única época na qual as vias de aplicação diferiram estatisticamente entre si, e a aplicação via foliar apresentou efeito principal, e os J2 e ovos por 100 cm³ de solo foram 69% inferiores comparado a via solo, enquanto que a via solo+folha foi intermediária. As aplicações via foliar tanto das épocas após a inoculação e semanalmente reduziram J2 e ovos por 100 cm³ em 69,27% e 61,65% comparado com a testemunha.

No segundo experimento (Tabela 5.6), a época após a inoculação na via solo+folha reduziu J2 e ovos por grama de raiz em 56,12% comparado com a testemunha. Em aplicações semanais, as vias solo e solo+folha foram efetivas no controle, com redução de 49,10% e 79% em comparação à testemunha, respectivamente. Esse resultado confirma os resultados do primeiro experimento.

Tabela 5.6 - Ovos e juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita* por grama de raiz e por 100 cm³ de solo, na qual a planta foi tratada com extrato de *Crambe abyssinica* em diferentes vias e em épocas distintas de aplicação, sendo após a inoculação (uma semana após a inoculação) e semanalmente até aos 45 dias após a inoculação, a testemunha é considerada como tratamento adicional e é representado por plantas inoculadas e não tratadas. Marechal Cândido Rondon, outubro de 2014.*

Vias de aplicação do extrato	J2 e ovos por grama de raiz		J2 e ovos por 100 cm ³ de solo	
	Épocas de aplicação			
	Após a inoculação	Semanalmente	Após a inoculação	Semanalmente
Solo	1674,40 Aab α	1398,92 Aab	2388,00 Aa α	2234,40 Aa α
Folha	2636,79 Aa α	1883,35 Aa α	1488,00 Aab α	1191,60 Ab
Solo + Folha	1205,76 Ab	576,01 Ab	1098,35 Ab	1932,00 Aab α
Testemunha	2748,25 α		2400,00 α	
CV (%)	31,82	37,42	27,93	28,91

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

^aMédias não diferem da testemunha pelo teste de Dunnett ao nível de 5% de probabilidade.

*Neste segundo experimento foram utilizadas apenas duas épocas de aplicação.

A aplicação do extrato hidroalcoólico de crambe pela via foliar semanalmente, reduziu J2 e ovos por 100 cm³ de solo no segundo experimento (Tabela 5.6), em 50,35% em comparação a testemunha, e aplicações via solo+folha após a inoculação foram inferiores a testemunha em 54,23 %.

Os resultados para a aplicação via foliar semanalmente, pode ser confirmada pelo ensaio da viabilidade de massa de ovos (Tabela 5.7), na qual aplicações semanais do extrato via folha e via solo+folha foram inferiores que as mesmas vias só que na época após a inoculação. Na época de aplicação semanalmente, todas as vias diferiram da testemunha e não diferiram entre si. A aplicação via foliar apresentou 36% e via solo+folha 43,42% a menos de J2 e ovos por 100 cm³ de solo comparado com a testemunha.

Tabela 5.7 - Viabilidade de massa de ovos de *Meloidogyne incognita*, na qual a planta de tomateiro foi tratada com extrato de *Crambe abyssinica* em diferentes vias e em épocas distintas de aplicação, sendo após a inoculação (uma semana após a inoculação) e semanalmente até aos 45 dias após a inoculação, a testemunha é considerada como tratamento adicional e é representado por plantas inoculadas e não tratadas. Marechal Cândido Rondon, outubro de 2014.

Vias de aplicação do extrato	J2 eclodidos dos ovos	
	Épocas de aplicação	
	Após a inoculação	Semanalmente
Solo	255,67 Ab α	248,50 Aa
Folha	404,89 Aa α	228,78 Ba
Solo + Folha	358,55 Aab α	202,00 Ba
Testemunha	357,00 α	
CV (%)	28,82	12,04

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

α Médias não diferem da testemunha pelo teste de Dunnett ao nível de 5% de probabilidade.

5.4 CONCLUSÃO

Aplicações semanais via solo de extrato hidroalcoólico de crambe, e com menor eficiência uma aplicação foliar, reduzem massa de ovos, galhas totais, J2 e ovos por grama de raiz e por 100 cm³ de solo de *M. incognita* em tomateiro, o que pode ser tanto por efeito nematicida e/ou nematostático.

5.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AISSANI, N.; TEDESCHI, P.; MAIETTI, A.; BRANDOLINI, V.; GARAU, V. L.; CABONI, P. Nematicidal activity of allylthiocyanate from horseradish (*Armoracia rusticana*) roots against *Meloidogyne incognita*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 61, p. 4723-4727, 2013.

ANDRADE, L.B.; OLIVEIRA, A.S.; RIBEIRO, J.K.C.; KIYITA, S.; VASCONCELOS, I.M.; OLIVEIRA, J.T.A.; SALES, M.P. Effects of a Novel Pathogenesis-Related Class 10 (PR-10) Protein from *Crotalaria pallida* roots with papain inhibitory activity against root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 58, p. 4145-4152, 2010.

BABU, R.O.; MOORKOTH, D.; AZEEZ, S.; EAPEN, S.J. Virtual screening and *in vitro* assay of potential drug like inhibitors from spices against glutathione-S-transferase of *Meloidogyne incognita*. **Bioinformation**, Singapore, v. 8, n. 7, p. 319-325, 2012.

BALDIN, E.L.L.; WILCKEN, S.R.S.; PANNUTI, L.E.R.; SCHLICK-SOUZA, E.C.; VANZEI, F.P. Uso de extratos vegetais, manipueira e nematicida no controle do nematoide das galhas em cenoura. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 38, n. 1, p. 36-41, 2012.

BONALDO, M.S.; PASCHOLATI, S.F.; ROMEIRO, R.S. Indução de resistência: noções básicas e perspectivas. In: CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO, R.M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S.F.; RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R.S. **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005. cap. 1, p. 11-27.

BORGES, F.G.; KUHN, O.J.; BATTISTUS, A.G.; ESTEVEZ, R.L.; COLTRO, S. Toxidade de tratamentos alternativos e químicos *in vitro* sobre *Tubixaba tuxaua* e *Meloidogyne incognita*. **Scientia Agraria Paranaensis**, Cascavel, v. 12, p. 440-449, 2013.

CABONI, P.; SABA, M.; TOCCO, G.; CASU, L.; MURGIA, A.; MAXIA, A.; MENKISSOGLU-SPIROUDI, U.; NTALLI, N. Nematicidal activity of mint aqueous extracts against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 61, p. 9784-9788, 2013.

CAILLAUD, M.C.; DUBREUIL, G.; QUENTIN, M.; PERFUS-BARBEOCH, L.; LECOMTE, P.; ENGLER, J.A.; ABAD, P.; ROSSO, M.N.; FAVERY, B. Root-knot nematodes manipulate plant cell functions during a compatible interaction. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 165, p. 104-113, 2008.

CHINNASRI, B.; SIPES, B.S.; SCHMITT, D.P. Effects of acibenzolar-*S*-methyl application to *Rotylenchulus reniformis* and *Meloidogyne javanica*. **Journal of Nematology**, Hanover, v. 35, n. 1, p. 110-114, 2003.

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

CRUZ, C.D. **Programa Genes: Biometria**. Viçosa: UFV, 2006. 382 p.

DONG-JUN, S.; DANG-MINH-CHANH, N.; RO-DONG, P.; WOO-JIN, J. Chitosane cinnamon beads enhance suppressive activity against *Rhizoctonia solani* and *Meloidogyne incognita in vitro*. **Microbial Pathogenesis**, London, v. 66, p. 44-47, 2014.

EL-ROKIEK, K.G.; EL-NAGDI, W.M. Dual effects of leaf extracts of *Eucalyptus citriodora* on controlling purslane and root-knot nematode in sunflower. **Journal of plant protection research**, Poznań, v. 51, n. 2, p. 121-129, 2011.

FALASCA, S.L.; FLORES, N.; LAMAS, M.C.; CARBALLO, S.M.; ANSCHAU, A. *Crambe abyssinica*: An almost unknown crop with a promissory future to produce biodiesel in Argentina. **International journal of hydrogen energy**, Oxford, v. 35, p. 5808-5812, 2010.

FRANZENER, G.; UNGRIED, J.R.; STANGARLIN, J.R.; FURLANETTO, C. Nematoides formadores de galha e de cisto patogênicos à cultura da soja em municípios do oeste do Paraná. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 29, n. 2, p. 261-265, 2005.

FRANZENER, G.; FRANZENER, A.S.M.; STANGARLIN, J.R.; FURLANETTO, C.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. Proteção de tomateiro a *Meloidogyne incognita* pelo extrato de *Tagetes patula*. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 31, n. 1, p. 27-36, 2007.

FERRAZ, L.C.C.B.; MONTEIRO, A.R. Nematoides. In: AMORIM, Lilian; RESENDE, J.A.M.; BERGAMIM FILHO, A. **Manual de Fitopatologia – Princípios e Conceitos**. 4 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2011. cap. 13, p. 277-305.

FREITAS, L.G.; NEVES, W.S.; OLIVEIRA, R.D.L. Métodos em nematologia vegetal. In: ALFENAS, A.C.; MAFIA, R.G. **Métodos em fitopatologia**. 1. ed. Viçosa: UFV, 2007. p. 253-291.

HARTMAN, K.M.; SASSER, J. N. Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential host test and perineal pattern morphology. In: BARKER, K.R.; CARTER, C.C.; SASSER, J.N. **An advanced treatise on Meloidogyne**. Methodology, North Carolina: University Graphics, 1985. p. 69-77.

JENKINS, W.R. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. **Plant Disease Reporter**, St. Paul, v. 48, p. 692, 1964.

LI, J.; XU, H. Bioactive compounds from the bark of *Eucalyptus exserta* F. Muell. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 40, p. 302-306, 2012.

LOGUERCIO, A.P.; BATTISTIN, A.; VARGAS, A.C.; HENZEL, A.; WITT, N.M. Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico de folhas de jabolão (*Syzygium cumini* (L.) Skells). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 2, p. 371-376, 2005.

MAYTON, H.; OLIVIER. C.; VAUGHN. S.; AND LORIA. R. Correlation of fungicidal activity of *Brassica* species with allyl isothiocyanate production in macerated leaf tissue. **Phytopathology**, St. Paul, v. 86, p. 267-271, 1996.

MOLINARI, S.; LOFFREDO, E. The role of salicylic acid in defense response of tomato to root-knot nematodes. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, Malden, v. 68, p. 69-78, 2006.

MOLINARI, S.; BASER, N. Induction of resistance to root-knot nematodes by SAR elicitors in tomato. **Crop Protection**, Amsterdam, v. 29, p. 1354-1362, 2010.

OKA, Y.; COHEN, Y. Induced resistance to cyst and root-knot nematodes in cereals by DL- β -amino-*n*-butyric acid. **European Journal of Plant Pathology**, London, v. 107, p. 219-227, 2001.

OLABIYI, T.I.; OYEDUNIMADE, E.E.A.; JBIKUNLE, G.J.; OJO, O.A.; ADESINA, G.O.; ADELASOYE, K.A.; OGUNNIRAN, T.A. Chemical composition and bio-nematicidal potential of some weed extracts on *Meloidogyne incognita* under laboratory conditions. **Plant Sciences Research**, Cambridge, v. 1, n. 2, p. 30-35, 2008.

OLIVEIRA, R.D.L.; DHINGRA, O.D. Biofumigação com *Brassica* sp. para o controle de doenças de plantas. In: VENZON, M.; PAULA JÚNIOR, T.J.; PALLINI, A. **Avanços no controle alternativo de pragas e doenças**. Viçosa: EPAMIG-CTZM, 2008. p. 237-257.

OLIVEIRA, R.D.L.; DHINGRA, O.D.; LIMA, A.O.; JHAM, G.N.; BERHOW, M.A.; HOLLOWAY, R.K.; VAUGHN, S.F. Glucosinolate content and nematicidal activity of Brazilian wild mustard tissues against *Meloidogyne incognita* in tomato. **Plant and soil**, The Hague, v. 341, p. 155-164, 2011.

RUMBERGER, A.; MARSCHNER, P. 2-Phenylethylisothiocyanate concentration and microbial community composition in the rhizosphere of canola. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 35, p. 445-452, 2003.

SALGADO, S.M.L.; SILVA, L.H.C.P. Potencial da indução de resistência no controle de fitonematoides. In: CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO, R.M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S.F.; RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R.S. **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, v. 13, 2005. p. 155-165.

SARWAR, M.; KIRKEGAARD, J.A.; WONG, P.T.W.; DESMARCHELIER, J.M. Biofumigation potential of brássicas. **Plant and Soil**, The Hague, v. 201, p. 103-112, 1998.

SILVA, M.B.; ROSA, M.B.; BRASILEIRO, B.G.; ALMEIDA, V.; SILVA, C.A. Desenvolvimento de produtos à base de extratos de plantas para o controle de doenças de plantas. In: VENZON, M.; PAULA JÚNIOR, T.J.; PALLINI, A. **Controle alternativo de pragas e doenças**. Viçosa, MG: EPAMIG, 2005. p. 221-246.

TAYLOR, A.L.; SASSER, J.N. **Biology, identification and control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* sp.)**. Raleigh, North Carolina State University, 1978. 111 p.

TRANI, P.E.; NAGAI, H.; PASSOS, F.A. Tomate (estaqueado). In: RAI, J. B.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A.; FURLANI, A. M. C. **Recomendação de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**. Campinas: IAC, 1997. p. 183. (Boletim técnico, 100).

TRUDGIL, D.L.; BLOK, V.C. Apomictic, polyphagous root-knot nematodes: exceptionally successful and damaging biotrophic root pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 39, n. 1, p. 53-77, 2001.

ZHANG, W.; RUAN, W.; DENG, Y.; GAO, Y. Potential antagonistic effects of nine natural fatty acids against *Meloidogyne incognita*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 60, p. 11631-11637, 2012.

6 CAPÍTULO 3 - EXTRATO DE *Crambe abyssinica* NO CONTROLE DE *Meloidogyne incognita* POR IMERSÃO DAS RAÍZES DE TOMATEIRO ASSOCIADA A OUTRAS VIAS DE APLICAÇÃO

RESUMO

Extratos vegetais são uma alternativa promissora para o controle de nematoides. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de épocas e vias de aplicação associadas à imersão radicular do tomateiro com extrato de *Crambe abyssinica* para controle de *M. incognita*. Foi utilizado extrato hidroalcoólico de crambe à 250 mg L⁻¹. Em um primeiro experimento em casa de vegetação, as raízes das mudas de tomateiro foram imersas no extrato com posteriores aplicações: via foliar; solo e foliar+solo, em quatro épocas: antes da inoculação; na inoculação; após a inoculação; e semanalmente. Em um segundo experimento foram utilizadas três vias de aplicação como citado anteriormente, em duas épocas (após a inoculação e semanalmente). Após sete dias do transplante, no primeiro e segundo experimento foram inoculados 5000 ovos de *M. incognita* por vaso. Aos 45 dias após a inoculação foram avaliados: número de ovos e de J2 por 100 cm³ de solo e por grama de raiz, número de galhas e massa de ovos. Houve redução de massa de ovos nas plantas tratadas via raiz+solo semanalmente e raiz+folha na época após a inoculação, com valores de 35,73% e 31,69%, respectivamente. Aplicações na época após a inoculação e semanalmente via raiz+solo+folha ocasionaram redução de 49,62% e 42,50% no número de juvenis de segundo estágio (J2) e ovos por grama de raiz, respectivamente. Para o número de J2 e ovos por 100 cm³ de solo, aplicações semanais, sem diferença entre as vias de aplicação, reduziram essas variáveis, confirmando o resultado no segundo experimento para aplicações via raiz+folha e raiz+solo+folha semanalmente. O uso de extrato de crambe para controle de *M. incognita* além da imersão de raízes, necessita de aplicações via solo sequenciais, com aplicações foliares, para maximizar o efeito de proteção.

Palavras-chave: *Brassica*. Nematóide de galhas. Controle alternativo. Glicosinolato. Indução de resistência.

CAPÍTULO 3 – *Crambe abyssinica* EXTRACT IN *Meloidogyne incognita* CONTROL BY IMMERSION OF THE TOMATO ROOTS ASSOCIATED WITH OTHER APPLICATION PROCEDURES

ABSTRACT

Plant extracts are a promising alternative for the control of nematodes. The objective of this study was to evaluate the effect of times and routes of administration associated with the tomato root dipping with *Crambe abyssinica* extract to control *M. incognita*. It was used hydroalcoholic crambe extract to 250 mg L⁻¹. In a first experiment in greenhouse, the roots of tomato seedlings were immersed in the extract with later applications: leaf; soil and leaf+soil, in four periods: before inoculation; on inoculation; after inoculation; and weekly. In a second experiment three routes of administration were used as previously mentioned, in two periods (after inoculation and weekly). Seven days after the transplant, in the first and second experiment were inoculated 5000 eggs of *M. incognita* per pot. At 45 days after inoculation the number of eggs and J2 per 100 cm³ of soil and gram of root, galls number and mass of eggs were evaluated. There was a reduction of the mass of eggs in the plants treated via root+soil weekly and root+leaf in the time after inoculation, with values of 35.73% and 31.69%, respectively. Applications after the inoculation and weekly in root+soil+leaf led to 49.62% and 42.50% of reduction in the number of second-stage juveniles (J2) and eggs per gram of root, respectively. For the number of eggs and J2 per 100 cm³ of soil, weekly applications, with no difference between the routes of administration, these variables were reduced, confirming the result in the second experiment for the applications via leaf+root and root+soil+leaf weekly. The use of crambe extract to *M. incognita* control besides the root immersion, require sequential applications via soil, with leaf applications, to maximize the protection effect.

Keywords: *Brassica*. Root-knot nematodes. Alternative control. Glucosinolate. Induction of resistance.

6.1 INTRODUÇÃO

O crambe (*Crambe abyssinica* Hochst) é nativo da região mediterrânea, originária da Etiópia, pertence à família Brassicaceae e o gênero contém cerca de 30 espécies. É uma planta oleaginosa anual e uma cultura que vem ganhando espaço em muitos países, como nova fonte de óleo (teor de óleo de 35%), contendo alto teor de ácido erúico (56%), cujo óleo não é comestível e é usado para fins industriais (lubrificantes, plásticos, nylon, cosméticos entre outros) e para produção de biodiesel. A cultura apresenta em seu metabolismo secundário os glicosinolatos que atuam na defesa vegetal (LAZZERI et al., 1994; LEONI et al., 1997;).

O glicosinolato predominante em *Crambe abyssinica* é o *epi* progoitrin (LAZZERI et al., 1994; ONYILAGHA et al., 2003). Os glicosinolatos fazem parte do metabolismo secundário das plantas e liberam substâncias de defesa, sendo encontrados principalmente em brássicas. A liberação de compostos a partir de glicosinolatos é catalisada pela enzima mirosinase, que disponibiliza isotiocianatos, nitrilas, tiocianatos e epinitrilas. Essa liberação ocorre quando a planta sofre estresse, pois, a enzima e os glicosinolatos são armazenados separadamente na planta (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Pal Vig et al. (2009) destacam os efeitos benéficos dos glicosinolatos e seus produtos hidrolíticos, que tem ação antifúngica, antibacteriana e herbicida. Aissani et al. (2013) verificaram o efeito nematicida do extrato de *Brassica (Armoracia rusticana)* contra *Meloidogyne incognita* e atribuíram o efeito aos isotiocianatos. Walker (1996) identificou redução nas galhas em tomateiros quando farelo das brássicas crambe e colza foram adicionados ao solo infestado por *Meloidogyne arenaria*. Vários compostos nematicidas foram encontrados em brássicas, tais como, alil, fenil, benzil e acrilóil isotiocianato (AISSANI et al., 2013; NEVES et al., 2009; WU et al., 2011).

Os glicosinolatos e seus produtos de degradação estão recebendo cada vez mais atenção como biocidas para controle de nematoides, fungos e insetos (TRONCOSO et al., 2005). No entanto, a maioria das pesquisas com glicosinolatos na defesa vegetal contra fitonematoides tem sido encontrada em *Brassica nigra*, *B. napus*, *B. hirta*, *B. oleracea*, *B. juncea* e *Armoracia rusticana*, (AISSANI et al., 2013; TAIZ; ZEIGER, 2004; ZASADA; FERRIS, 2004; WALKER, 1996). Geralmente são utilizados como biofumigantes, com aplicações do extrato diretamente ao solo ou utilizados para testes *in vitro*, no entanto, incorporação de brássicas para biofumigação dependem das condições que o solo oferece, pois nem sempre a quantidade de produtos derivados de glicosinolatos é suficiente para controlar patógenos de solo (AISSANI et al., 2013; MORRA; KIRKEGAARD, 2002; ZASADA; FERRIS, 2004). Pouco se sabe sobre

aplicações foliares de extratos de brássicas, especialmente de crambe, como indutores de resistência. Lopes et al. (2005) verificaram redução no número de galhas de *M. incognita* com pulverizações foliares de extratos de mucuna preta e manjerição, cujo efeito foi atribuído à indução de resistência.

As respostas de defesa a nematoides podem ser constitutivas ou induzidas, como os compostos fenólicos e/ou respostas de hipersensibilidade, que estão relacionados com a inibição do sítio de alimentação, retardando ou inibindo o desenvolvimento e reprodução do parasita. Assim sendo, o gênero *Meloidogyne* pode formar galhas mas não se reproduzir, assim como um conjunto de respostas de defesa pode impedir a penetração, desenvolvimento dos juvenis de segundo estágio (J2), formação de galhas e produção de ovos, além de provocar emigração de J2 (SILVA et al., 2013). A ativação de mecanismos de resistência pode promover o aumento da atividade de peroxidase, polifenoloxidasas e fenilalanina amônia-liase, bem como maior concentração de lignina e compostos fenólicos nas raízes, diminuindo a capacidade reprodutiva do nematoide (SILVA et al., 2010).

Muitos estudos têm relatado potencialidades no uso de nematicidas naturais, com metabólitos secundários de plantas contra nematoides (COLTRO-RONCATO et al., 2015). Pulverizações foliares tem mostrado resultados promissores como indutores de resistência (MELO et al., 2012), aplicações via solo tem apresentado ação nematicida e/ou indutora de resistência (OKA; COHEN, 2001; SILVA et al., 2011), e tratamento de raízes tem indicado efeito indutor de resistência (MOLINARI; LOFFREDO, 2006).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de épocas e vias de aplicação de extrato de *Crambe abyssinica*, associadas à imersão radicular do tomateiro nesse extrato, sobre a formação de galhas, massa de ovos, J2 e ovos na raiz e no solo produzidos por *M. incognita*.

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

6.2.1 Condução do Experimento

O experimento foi conduzido no período de abril à junho de 2014 (primeiro experimento) e a repetição do experimento (segundo experimento) foi conduzido no período de outubro à dezembro de 2014. Estes foram conduzidos em casa de vegetação climatizada localizado no Complexo de Controle Biológico e Cultivo Protegido Prof. Dr. Mário César Lopes, pertence a Universidade Estadual do Oeste do Paraná- UNIOESTE, *campus* Marechal Cândido Rondon, Paraná

Para ambos os experimentos o delineamento experimental foi em blocos casualizados com cinco repetições. O extrato utilizado foi o hidroalcoólico 250 mg L^{-1} preparado segundo a metodologia proposta por Loguercio et al. (2005). As folhas de crambe foram coletadas em estágio vegetativo, 35 dias após emergência da cultura (DAE) no município de Cascavel-PR, com coordenadas de latitude $24^{\circ}57'21''$ sul e longitude $53^{\circ}27'19''$ oeste, altitude de 781 metros, e foram secas em estufa a 45°C por 48 h, trituradas em moinho de facas e passadas em peneiras de 48 Mesh, obtendo-se o pó desta planta, e armazenado em recipiente fechado no escuro a temperatura ambiente até o momento de preparo dos extratos.

O extrato por solução hidroalcoólica (70% v/v álcool etílico- $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$), foi estocada à temperatura ambiente, protegida da luz, por um período de 15 dias, após foi filtrado em papel filtro Whatman n° 1, em seguida, evaporador rotativo à vácuo em temperatura de aproximadamente 50°C , e ressuspensão em 1000 mL de água destilada com 0,6% de Tween 20.

Foram utilizadas mudas de tomateiro Santa Cruz Kada (Paulista) com 25 dias após a semeadura (DAS), em bandeja de polietileno e substrato comercial Plantmax, e transplantadas em vasos com capacidade de três litros preenchidos com solo esterilizado por autoclavagem à $120^{\circ}\text{C}/1 \text{ atm}$ durante 1 hora, na mistura 3:2:1 (solo:areia:materia orgânica). Após foi enviado uma amostra de solo para análise química no Laboratório de Química Agrícola e Ambiental da Unioeste, para posterior correção conforme recomendação de Trani, Nagai e Passos (1997).

O inóculo foi obtido de tomates infectados cultivados em casa de vegetação e identificados com base na configuração da região perineal (HARTMAN; SASSER, 1985).

6.2.2 Variáveis Analisadas

As variáveis foram analisadas 45 dias após inoculação, com o término do experimento. Após a separação das raízes do solo, estas foram lavadas e secas em temperatura ambiente para determinação da massa fresca da raiz, posterior armazenamento em sacos plásticos tanto as raízes como o solo separados em temperatura próxima aos 4°C .

6.2.2.1 Massa de Ovos e Galhas Totais nas Raízes

Para verificar a existência de massa de ovos nas raízes, estas foram coradas com Floxina B à 15 mg L^{-1} durante 20 min, após lavadas para tirar o excesso de corante (TAYLOR; SASSER, 1978), secas com papel toalha e contados galhas com massa de ovos e sem massa de

ovos com auxílio de lupa de mesa. O número de galhas totais foi quantificado visualmente por contagem com auxílio de lupa de mesa.

6.2.2.2 Número de Ovos e Juvenis de Segundo Estádio (J2) por grama de raiz

Para extração de ovos e nematoides das raízes foi utilizado a metodologia de Freitas et al. (2007). As raízes foram cortadas e trituradas em liquidificador por 20 seg, vertido sobre peneira de 0,427 mm de abertura de malha (48 Mesh) acoplada na peneira de 0,037 mm de abertura de malha (400 Mesh), nesta os nematoides foram retidos e o conteúdo recolhido em tubos de centrífuga e submetidos ao método de flotação centrífuga em solução de sacarose. Os ovos e J2 retidos na peneira de 400 Mesh foram transferidos para lâmina de Peters e quantificado.

6.2.2.3 Número de Ovos e J2 por 100 cm³ de Solo

O método flotação centrífuga em solução de sacarose foi empregado para extração de ovos e nematoides do solo (JENKIS, 1964). O procedimento correspondeu com a extração de 100 cm³ de solo, peneiramento à 0,427 mm de abertura de malha (48 Mesh) acoplada na peneira de 0,037 mm de abertura de malha (400 Mesh), nesta os nematoides foram retidos e o conteúdo recolhido em tubos de centrífuga e submetidos a centrifugação em solução de sacarose com densidade de 1,15 g cm³. Os ovos e J2 retidos na peneira de 400 Mesh foram transferidos para lâmina de Peters e quantificado.

6.2.3 Primeiro Experimento

O esquema fatorial (3x4+1) foi utilizado, sendo o extrato primeiramente aplicado via sistema radicular e posteriormente em três diferentes vias na planta: via solo; via foliar e solo+foliar, em quatro épocas de aplicação: 1) antes da inoculação (três dias após o transplante das mudas); 2) na inoculação (sete dias após o transplante); 3) após a inoculação (uma semana após a inoculação); e 4) semanalmente até aos 45 dias após a inoculação, totalizando nove aplicações (incluindo todas as épocas de aplicação citadas anteriormente) e um tratamento adicional, testemunha inoculada e não tratada.

As plantas foram tratadas com fungicida (Trifloxistrobina+ Tebuconazol (75 + 150 g i.a. ha⁻¹)) devido a presença da mancha-de-estenfílio, causada pelo fungo *Stemphyllium* sp., 15

dias após o transplante, com três dias de diferença entre a aplicação do fungicida com o extrato, e a outra aplicação de fungicida foi 15 dias após a primeira aplicação.

O extrato primeiramente foi aplicado via sistema radicular em todas as plantas exceto para a testemunha, no momento do transplante mudas tiveram suas raízes mergulhadas por um período aproximado de 3 seg e transplantadas nos vasos; posteriormente as plantas com tratamento via foliar, tiveram suas folhas pulverizadas com borifador na parte adaxial até ponto de escorrimento, para não entrar em contato com o solo, o vaso foi coberto com papel laminado e jornal, para que a aspersão não entrasse em contato com outras plantas estes vasos foram retirados e isolados; plantas tratadas via solo receberam 30 mL do extrato por vaso, correspondendo à 1% do v/v. Todos os tratamentos foram efetuados no período da manhã. Após sete dias do transplante foi efetuada a inoculação de 5.000 ovos e 589 J2 por vaso de *M. incognita*, por meio de perfurações ao redor das raízes com profundidade de 5 cm.

Para análise dos dados foi realizado o teste de normalidade de Lilliefors à 5% de probabilidade, e em todos os dados foi aplicado o teste Q, ficando com quatro repetições, e ainda na ausência de normalidade para massa de ovos e J2 e ovos por grama de raiz os dados foram transformados em $\sqrt{x + 0,5}$. Posteriormente, realizou-se a análise de variância e as médias referentes aos tratamentos foram submetidas ao teste de médias Tukey, e quando o tratamento adicional mostrava-se significativo na análise de variância utilizou-se um teste adicional, o Dunnett. O software estatístico Genes (CRUZ, 2006) foi utilizado.

6.2.4 Segundo Experimento

Após análise dos dados do primeiro experimento, foi conduzido um segundo experimento para confirmação das duas melhores épocas de aplicação. Utilizou-se o esquema fatorial (3x2+1), sendo o extrato aplicado via sistema radicular e nas três diferentes partes da planta, assim como no primeiro experimento, quanto as épocas de aplicação foram as seguintes: 1) após inoculação (uma semana após a inoculação); e 2) semanalmente (inclui as aplicações: três dias após o transplante das mudas; sete dias após o transplante; uma semana após a inoculação e semanalmente até aos 45 dias após a inoculação, totalizando 9 aplicações). Foram inoculados aproximadamente 5.074 ovos e 1000 J2 por vaso. As mudas foram tratadas com fungicida (Trifloxistrobina+ Tebuconazol (75 + 150 g i.a. ha⁻¹)) devido a ocorrência mancha-de-estenfílio, oito dias antes do transplante.

Após a contagem do número de massa de ovos e galhas totais, as massas de ovos foram coletadas para avaliar a viabilidade. Foram utilizadas três repetições por tratamento e em

triplicata, em delineamento inteiramente casualizado. Placas de Elisa com água destilada foram utilizadas e em cada célula da placa Elisa foi colocado uma massa de ovos e após 15 dias foi avaliado a eclosão dos ovos.

Para análise dos dados foi realizado o teste de normalidade de Lilliefors à 5% de probabilidade, em todos os dados foi aplicado o teste Q, ficando com quatro repetições. A normalidade foi encontrada quando os dados foram transformados em $\log(x+1)$. Posteriormente, realizou-se a análise de variância e as médias referentes aos tratamentos foram submetidas ao teste de médias Tukey, e quando o tratamento adicional mostrava-se significativo na análise de variância utilizou-se um teste adicional, o Dunnett. O software estatístico Genes (CRUZ, 2006) foi utilizado.

6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Aplicações via raiz+solo semanalmente promoveram redução na massa de ovos, 18,94% e 23,57% comparado com a mesma via nas épocas na inoculação e após a inoculação, respectivamente. Quanto a via de aplicação raiz+folha, apenas na época após a inoculação houve redução de massa de ovos, já para a via raiz+solo+folha, tanto após a inoculação quanto semanalmente apresentaram menos massa de ovos e não diferiram entre si (Tabela 6.1).

Tabela 6.1 - Massa de ovos em raízes de tomateiro inoculados com *Meloidogyne incognita*, na qual as raízes das plantas de tomateiro foram tratadas com extrato de *Crambe abyssinica*, e as mesmas plantas receberam o extrato em diferentes vias e em épocas distintas de aplicação, sendo antes da inoculação (três dias após o transplante das mudas); na inoculação (sete dias após o transplante); após a inoculação (uma semana após a inoculação); e semanalmente até aos 45 dias após a inoculação (incluindo as demais aplicações), o tratamento adicional é representado pela testemunha inoculada e não tratada. Marechal Cândido Rondon, abril de 2014.*

Vias de aplicação do extrato	Épocas de aplicação			
	Antes da inoculação	Na inoculação	Após a inoculação	Semanalmente
Raiz + Solo	1030,00 Aa α	715,25 Bb	533,00 ABa	475,00 Cb
Raiz + Folha	888,50 Aa α	1017,50 Aa α	807,25 Bb	948,00 Aa α
Raiz + Solo + Folha	975,25 Aa α	980,25 Aa α	530,50 Bb	757,50 Bb
Testemunha	1137,50 α			
CV (%)	7,79	4,13	9,91	14,31

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

^aMédias não diferem da testemunha pelo teste de Dunnett ao nível de 5% de probabilidade.

*Neste primeiro experimento foram utilizados quatro épocas de aplicação.

As brássicas contém vários compostos com ação nematicida, porém estes compostos podem apresentar curto período quando as brássicas são adicionados ao solo (AISSANI et al., 2013; NEVES et al., 2009; WU et al., 2011). Sendo assim, é possível justificar a necessidade das várias aplicações necessárias via solo no presente estudo. A incorporação de brássicas ao solo, demonstraram que o isotiocianato esteve presente até quatro dias (MORRA; KIRKEGAARD, 2002). Quando os extratos vegetais entram em contato com o solo, pode haver degradação das substâncias (LOPES et al., 2005).

Na época de aplicação na inoculação, apenas a via raiz+solo diferiu da testemunha com 21,71% a menos de massa de ovos. Após a inoculação todas as vias diferiram da testemunha com menos massa de ovos, sendo que as vias raiz+folha e raiz+solo+folha não diferiram entre si e apresentaram menos massa de ovos, aproximadamente 32% comparado com a testemunha. Corroborando com o presente trabalho, em que aplicações em tomateiro tanto via solo como via foliar até uma semana após a inoculação pode promover controle, Silva et al. (2004) observaram que aplicações de acibenzolar-S-metil (ASM) antes da inoculação/transplante e até sete dias após, tanto irrigado ao solo quanto pulverizado via foliar reduziu a massa de ovos e número de ovos por grama de raiz de *M. incognita* em tomateiro. Estes autores concluíram que, o estabelecimento de sítio de alimentação do J2 e alteração da resistência da planta, ocorrem nesse período aproximado de 7 dias após a inoculação, pois, quando aplicados aos 14 dias após o transplante/inoculação não houve controle.

Semanalmente as vias raiz+solo e raiz+solo+folha não diferiram estatisticamente entre si, mas diferiram em 35,73% e 38,43% da testemunha, respectivamente com menos massa de ovos (Tabela 6.1). Nesse sentido, o principal efeito para aplicações semanais é raiz+solo, enquanto que para a época após a inoculação é a via raiz+folha porque estas não diferiram da via raiz+solo+folha, porém, o efeito das aplicações via raiz+solo semanalmente se destacou com maior porcentagem de controle, aproximadamente 4% comparado com a via raiz+folha na época após a inoculação.

A imersão de raízes de tomateiro a 1 mM de ácido salicílico (AS) por 12 horas promoveu a absorção de aproximadamente 50%, a maior parte do AS livre foi detectado nas folhas, sendo pouco retido nas raízes, portanto, torna-se improvável a sua atuação como eliciador de indução de resistência para proteção contra *Meloidogyne* spp., considerando assim, que a concentração de AS pode aumentar localmente e temporariamente no local de infecção do nematoide (MOLINARI; LOFFREDO, 2006). Estes autores corroboram com o presente trabalho, justificando assim, o fato de que aplicações via raiz+folha foram menos efetivas que aplicações

via raiz+solo, pois, pode ter ocorrido maior concentração de mecanismos de defesa localmente, assim como para a via raiz+solo semanal, pode ter ocorrido elevação da concentração de metabólitos de defesa localmente e temporariamente nas raízes.

O número de massas de ovos por sistema radicular, indica a proporção de J2 inoculado que penetraram e foram capazes de se reproduzir (MOLINARI; BASER, 2010). Sendo assim, no presente trabalho a aplicação via raiz+folha após a inoculação além de poder estar limitando o estabelecimento de sítio de alimentação, pode estar atuado na reprodução do nematoide, pois, o indutor foi aplicado uma semana após a inoculação e a maioria dos J2 talvez já teriam penetrado a raiz. Segundo Pedrosa et al. (2000), a penetração de juvenis de *M. incognita* como de *M. javanica* ocorreu 24 h após a inoculação em todos os genótipos testados de feijoeiro, diferença foi verificada entre os genótipos aos 10 e 20 dias após a inoculação, com menos número de nematoides nas raízes, devido a evasão destes.

O número de galhas totais foram inferiores nas aplicações semanais para a via raiz+solo (Tabela 6.2), e embora tenha apresentado 24,70% a menos de galhas totais comparado com a mesma via só que na época após a inoculação, não apresentaram diferenças estatísticas entre si. A via raiz+folha não diferiu entre as épocas de aplicação, e para a via raiz+solo+folha as épocas após a inoculação e semanalmente não diferiram entre si e apresentaram menos galhas totais.

Tabela 6.2.- Galhas totais em raízes de tomateiro inoculados com *Meloidogyne incognita*, na qual as raízes das plantas de tomateiro foram tratadas com extrato de *Crambe abyssinica*, e as mesmas plantas receberam o extrato em diferentes vias e em épocas distintas de aplicação, sendo antes da inoculação (três dias após o transplante das mudas); na inoculação (sete dias após o transplante); após a inoculação (uma semana após a inoculação); e semanalmente até aos 45 dias após a inoculação (incluindo as demais aplicações), o tratamento adicional é representado pela testemunha inoculada e não tratada. Marechal Cândido Rondon, abril de 2014.*

Vias de aplicação do extrato	Épocas de aplicação			
	Antes da inoculação	Na inoculação	Após a inoculação	Semanalmente
Raiz +Solo	1568,50 Aa α	1223,00 ABa α	869,50 BCab	654,75 Cb
Raiz + Folha	1226,00 Aa α	1360,00 Aa α	1161,75 Aa α	1355,25 Aa α
Raiz + Solo + Folha	1352,00 Aa α	1201,75 Aa α	783,50 Bb	689,50 Bb
Testemunha	1400,50 α			
CV (%)	15,56	18,15	18,05	26,20

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

^aMédias não diferem da testemunha pelo teste de Dunnett ao nível de 5% de probabilidade.

*Neste primeiro experimento foram utilizados quatro épocas de aplicação.

As épocas após a inoculação e semanalmente, não diferiram entre as vias na redução do número de galhas totais que foram, raiz+solo e raiz+solo+folha. Na época após a inoculação, raiz+solo foi intermediário, apenas 9,90% superior a via raiz+solo+folha, e estes foram 37,91% e 44,05% inferiores a testemunha, respectivamente. Aplicação via raiz+folha, apesar de apresentar menos massa de ovos após a inoculação como demonstrado na Tabela 6.1, não apresentou-se efetivo na redução de galhas totais, não diferindo da testemunha, esse fato pode ser devido a mecanismos de resistência envolvidos na reprodução, como reportado por Silva et al. (2013) em seus estudos com mecanismos de resistência em plantas, pode haver a formação de galhas, sem no entanto, reprodução das fêmeas.

O desenvolvimento e reprodução de *Meloidogyne* só é possível quando ocorre uma relação bem sucedida com as células de alimentação, estas células gigantes são permanentes e fonte exclusiva de nutrientes para o desenvolvimento do nematoide até a reprodução, pois, este gênero, possui estratégias evoluídas para a formação de células de alimentação de muitas espécies de plantas, das quais se originam as galhas (CAILLAUD et al., 2008). Portanto, no presente estudo a interferência na nutrição pode ter ocorrido, e afetado a reprodução. Inibidores químicos podem ser utilizados para interferir a nutrição dos nematoides das galhas, conferindo citoplasma menos denso às células, devido a interferência em um processo específico, como o bloqueio do ciclo celular, DNA e mitose, além da interferência na estrutura da parede celular, células gigantes podem se desenvolver, mas menores (ENGLER et al., 1999).

Ao contrário do que foi observado para raiz+folha no presente trabalho (Tabela 6.2), Lopes et al. (2005) verificaram ação nematicida sistêmica, na qual a pulverização foliar de extratos de manjeriço e mucuna-preta aos zero, sete e 14 dias após o transplante/inoculação das mudas, promoveram redução do número de galhas de *M. incognita* em tomateiro cerca de 32,5% e 26,5%, respectivamente, já tratamento de sementes não demonstrou controle e a adição ao solo reduziu a reprodução. Desta maneira, pode-se inferir que há diferença de substâncias presentes nos extratos vegetais e seus mecanismos de ação.

Semanalmente raiz+solo e raiz+solo+folha, não diferiram entre si e reduziram o número de galhas cerca de 53,25% e 50,75% comparado com a testemunha, respectivamente. Assim, o extrato hidroalcoólico de crambe pode estar atuando diretamente sobre os nematoides.

Silva et al. (2004) observaram que efeito tóxico direto ao J2 de *M. incognita* em tomateiro foi observado pela aplicação de abamectina ao solo, com redução de 87,30% do número de galhas, e sugerindo o efeito à danos aos órgãos sensoriais e impossibilidade do J2 reconhecer o local de penetração. Os mesmos autores também relataram que, a aplicação de acibenzolar-*S*-metil (ASM) via foliar ou solo, três dias antes do transplante/inoculação e sete

dias após o transplante/inoculação, independente da época ou modo de aplicação, chegou a 54,6% de redução de galhas em relação à testemunha, visto que o ASM não é tóxico ao J2, então a essa redução pode-se inferir no efeito indutor de resistência, que afetou a nutrição do J2 e reduzindo assim, a reprodução.

Extrato obtido de casca e folha de jatobá reduziram em 97% e 65% o número de galhas de *M. incognita* por sistema radicular do algodoeiro, respectivamente, o extrato de tamboril reduziu em 65% e 69%, já extratos de jurema e gonçalo-alves não diferiram da testemunha, os extratos foram aplicados no solo na proporção de 50 mL por muda à cada oito dias, iniciando dois dias antes da inoculação até aos 45 dias após a inoculação. Os autores concluíram que, o efeito na redução do número de galhas pode ser explicado pela menor infecção do J2, provavelmente devido a presença de substâncias alcalóides com propriedades nematicidas (SILVA et al., 2011).

Conforme os resultados do primeiro experimento, as melhores épocas de aplicação para redução de massa de ovos e galhas totais foi após a inoculação e semanalmente. Portanto, para o segundo experimento estas épocas de aplicação foram avaliadas para confirmação do efeito redutor de massa de ovos e galhas totais.

O segundo experimento mostrou que massa de ovos para aplicações do extrato hidroalcoólico de crambe via raiz+solo foi inferior semanalmente, a via de aplicação raiz+folha foi inferior na época após a inoculação. Em aplicações do extrato via raiz+solo+folha, as épocas de aplicação após a inoculação e semanalmente não diferiram entre si (Tabela 6.3). Após a inoculação o principal efeito foi raiz+folha, pois, esta não diferiu da via de aplicação raiz+solo+folha, e apresentaram 12,18% e 13,65% menos massa de ovos comparado ao controle, respectivamente. Já, semanalmente a via de aplicação raiz+solo+folha foi intermediária e não diferiu estatisticamente da raiz+solo que apresentou 6,91% menos massa de ovos, estas vias de aplicação reduziram massa de ovos em 9,22% e 15,50% em relação a testemunha, respectivamente. Estes resultados suportam os encontrados no primeiro experimento.

Tabela 6.3 - Massa de ovos (MO) e galhas totais (GT) em raízes de tomateiro inoculados com *Meloidogyne incognita*, na qual as raízes das plantas de tomateiro foram tratadas com extrato de *Crambe abyssinica*, e as mesmas plantas receberam o extrato em diferentes vias e em épocas distintas de aplicação, sendo após a inoculação (uma semana após a inoculação); e semanalmente até aos 45 dias após a inoculação, o tratamento adicional é representado pela testemunha inoculada e não tratada. Marechal Cândido Rondon, outubro de 2014.*

Vias de aplicação do extrato	MO		GT	
	Épocas de aplicação			
	Após a inoculação	Semanalmente	Após a inoculação	Semanalmente
Raiz +Solo	442,75 Aa α	197,50 Bb	337,23 Aab α	306,36 Aab α
Raiz + Folha	246,50 Bb	375,00 Aa α	551,66 Aa α	524,65 Aa α
Raiz + Solo + Folha	223,75 Ab	301,50 Aab	249,42 Ab	263,95 Ab
Testemunha	557,25 α		561,58 α	
CV (%)	6,28	3,17	5,71	4,06

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

α Médias não diferem da testemunha pelo teste de Dunnett ao nível de 5% de probabilidade.

*Neste segundo experimento foram utilizadas apenas duas épocas de aplicação.

As galhas totais de *M. incognita* não diferiram entre as épocas de aplicação no segundo experimento (Tabela 6.3), mas diferiram entre as vias de aplicação dentro de cada época. Apenas a via de aplicação raiz+solo+folha diferiu da testemunha com menor número de galhas totais, em 11,50% para a época após a inoculação e 10,74% para a época semanal. Estes resultados estão de acordo com o primeiro experimento, com efetivo controle de galhas totais para a via de aplicação raiz+solo+folha tanto após a inoculação, como semanalmente. Nesse sentido, aplicações via sistema radicular necessitam de aplicações complementares, somente no solo não foi efetivo, sendo necessário pulverizações foliares, assim como reportado por Molinari e Loffredo (2006), cujas aplicações de indutor de resistência via sistema radicular não se mostrou eficiente no controle de *Meloidogyne* spp.

A via de aplicação raiz+solo após a inoculação e semanalmente, não foram efetivos na redução de galhas no segundo experimento como no primeiro. Essa diferença pode estar relacionada as diferenças de temperatura do ambiente entre os experimentos. Cabe ressaltar que, no segundo experimento a temperatura estava mais alta, com média de 24,8 °C, enquanto que no primeiro experimento, a média da temperatura foi de 19,3 °C. Os dados da temperatura foram coletados na Estação Meteorológica de Observação de Superfície Automática (A820) da Estação Experimental Prof. Dr. Antônio Carlos dos Santos Pessoa, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná de Marechal Cândido Rondon. O ciclo do gênero *Meloidogyne* é influenciado por condições ambientais, tais como temperatura, umidade, hospedeiro, entre

outros, e completa-se em 3 a 4 semanas, e para as espécies *M. incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria* a faixa de temperatura ideal é de 25 a 30 °C (TAYLOR; SASSER, 1978). Sob condições ótimas, o ciclo do nematoide pode encurtar as fases de desenvolvimento, e mais gerações surgirem (RITZINGER et al., 2010).

Outra explicação, é que o alil isotiocianato derivado de glicosinolatos apresentam correlação negativa com o aumento da temperatura, e também pode ocorrer adsorção desse composto com argilas no solo (BOREK et al., 1995). Assim, como houve temperaturas mais altas no período do segundo experimento, provavelmente isto explique a menor eficiência dos tratamentos.

A Tabela 6.4, apresenta os resultados de J2 e ovos por grama de raiz, na qual as épocas de aplicação só diferiram entre si na via de aplicação raiz+solo+folha, sendo a época após a inoculação, a via com menos J2 e ovos por grama de raiz, porém semanalmente não diferiu estatisticamente. Provavelmente, mecanismos de indução de resistência e efeito nematocida e/ou nematostático estejam envolvidos em aplicações raiz+solo+folha.

Tabela 6.4 - Ovos e juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita* por grama de raiz, na qual as raízes das plantas de tomateiro foram tratadas com extrato de *Crambe abyssinica*, e as mesmas plantas receberam o extrato em diferentes vias e em épocas distintas de aplicação, sendo antes da inoculação (três dias após o transplante das mudas); na inoculação (sete dias após o transplante); após a inoculação (uma semana após a inoculação); e semanalmente até aos 45 dias após a inoculação (incluindo as demais aplicações), o tratamento adicional é representado pela testemunha inoculada e não tratada. Marechal Cândido Rondon, abril de 2014.*

Vias de aplicação do extrato	Épocas de aplicação			
	Antes da inoculação	Na inoculação	Após a inoculação	Semanalmente
Raiz +Solo	237,68 Aa	156,65 Ab	163,69 Aab	133,03 Ab
Raiz + Folha	351,88 Aa α	304,62 Aa α	260,65 Aa	300,94 Aa α
Raiz + Solo + Folha	334,10 Aa α	268,67 ABab	117,11 Cb	148,02 BCb
Testemunha	444,15 α			
CV (%)	17,86	11,93	17,20	21,63

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

α Médias não diferem da testemunha pelo teste de Dunnett ao nível de 5% de probabilidade.

*Neste primeiro experimento foram utilizados quatro épocas de aplicação.

As vias de aplicação diferiram entre si dentro de cada época, exceto antes da inoculação. Aplicações na inoculação, a via raiz+solo foi inferior 23,12% comparado a raiz+solo+folha que foi intermediário. Na época após a inoculação, raiz+solo+folha reduziu em 34,60% os J2 e ovos

por grama de raiz comparado a via raiz+folha, e raiz +solo não diferiu estatisticamente com média intermediária. A aplicação do extrato via raiz+solo+folha na época após a inoculação reduziu em 49,62% em relação à testemunha. Sendo assim, a via raiz+folha em aplicação na época após a inoculação, não foi eficiente na redução de J2 e ovos por grama de raiz, talvez porque o efeito indutor de resistência não atue inibindo a penetração, mas sim atraindo o nematoide, como citado por Salgado e Silva (2005), que modificações bioquímicas ocorridas em plantas após serem induzidas a resistência, podem acarretar em modificações na natureza dos exsudatos radiculares e podem atrair ou repelir o nematoide.

Quando o extrato foi aplicado semanalmente, as aplicações via raiz+solo e raiz+solo+folha foram inferiores 33,80% e 26,14%, respectivamente comparado a via raiz+folha, e inferiores 46,50% e 42,50% em comparação com a testemunha, respectivamente, e não diferiram entre si. Aplicações do extrato que contemplem o solo como via, podem estar atuando na atividade nematicida e/ou indutora de resistência, assim como foi observado por Cavoski et al. (2012), plantas de pepino quando tratadas por incorporação ao solo e aplicação de extratos no solo no momento do transplante com extrato de cinamomo (*Melia azedarach*), apresentaram redução de galhas e J2 e ovos de *M. incognita* no solo e nas raízes. Os autores atribuem o resultado, a atividade nematicida e a indução de mecanismos de defesa na planta.

A redução do número de ovos por sistema radicular com aplicações de extratos vegetais via solo em algodoeiro, pode ser devido a presença de alguma substância contida no extrato que interferiu o ciclo do nematoide, causando menor infecção deste e reduzindo assim, o número de fêmeas e conseqüentemente o número de ovos por sistema radicular (SILVA et al., 2011).

Os valores de J2 e ovos por 100 cm³ de solo estão representados na Tabela 6.5. Para as aplicações do extrato via raiz+solo e raiz+solo+folha, os resultados foram semelhantes quanto as melhores épocas, e a época semanal foi inferior comparado à antes da inoculação, as épocas na inoculação e após a inoculação foram intermediárias, não diferindo estatisticamente. Aplicação via raiz+folha não apresentou diferença estatística entre as épocas de aplicação no controle de J2 e ovos por 100 cm³ de solo (Tabela 6.5). O mesmo foi observado para J2 e ovos por grama de raiz (Tabela 6.4). No entanto houve redução de massa de ovos para a época após a inoculação (Tabelas 6.1 e 6.3). Assim, o efeito deste pode realmente ser na reprodução do nematoide por meio de mecanismos de indução de resistência.

Tabela 6.5 - Ovos e juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita* por 100 cm³ de solo, na qual as raízes das plantas de tomateiro foram tratadas com extrato de *Crambe abyssinica*, e as mesmas plantas receberam o extrato em diferentes vias e em épocas distintas de aplicação, sendo antes da inoculação (três dias após o transplante das mudas); na inoculação (sete dias após o transplante); após a inoculação (uma semana após a inoculação); e semanalmente até aos 45 dias após a inoculação (incluindo as demais aplicações), o tratamento adicional é representado pela testemunha inoculada e não tratada. Marechal Cândido Rondon, abril de 2014.*

Vias de aplicação do extrato	Épocas de aplicação			
	Antes da inoculação	Na inoculação	Após a inoculação	Semanalmente
Raiz +Solo	1224,00 Aa α	928,80 ABa α	678,00 ABa α	266,40 Ba
Raiz + Folha	757,20 Aa α	751,20 Aa α	748,80 Aa α	367,20 Aa
Raiz+Solo+Folha	1111,20 Aa α	852,00 ABa α	634,80 ABa α	305,65 Ba
Testemunha	1089,60 α			
CV (%)	45,83	27,88	32,73	19,73

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

^aMédias não diferem da testemunha pelo teste de Dunnett ao nível de 5% de probabilidade.

*Neste primeiro experimento foram utilizados quatro épocas de aplicação.

Como observado na Tabela 6.5, a única época de aplicação na qual nenhuma via de aplicação foi semelhante à testemunha foi semanalmente, e as vias de aplicação não diferiram entre si, sendo que raiz+solo, raiz+folha e raiz+solo+folha reduziram J2 e ovos por 100 cm³ de solo em 75,55%, 66,30% e 71,95% em comparação com a testemunha, respectivamente.

As épocas que apresentaram maior redução de J2 e ovos por grama de raiz e por 100 cm³ de solo observadas no primeiro experimento foram, após a inoculação e semanalmente, sendo assim, estes foram testados novamente em um segundo experimento para confirmação dos resultados.

O segundo experimento (Tabela 6.6), mostrou que aplicações via raiz+solo+folha semanalmente foi a única a diferir da testemunha, com redução de J2 e ovos por grama de raiz em 19,38% e 16,02% a menos quando comparado com a mesma via de aplicação só que na época após a inoculação. Apesar da raiz+solo semanalmente não diferir estatisticamente de raiz+solo+folha, foi semelhante a testemunha. Estes resultados confirmam que a via de aplicação raiz+solo+folha semanalmente reduziu J2 e ovos por grama de raiz. No entanto, os resultados da época de aplicação após a inoculação não conferem com o primeiro experimento, pois, no primeiro experimento houve controle, já no segundo experimento nenhuma via desta época diferiu da testemunha. Talvez, esse fato possa ter ocorrido por condições ambientais diferentes, pois no segundo experimento as temperaturas estavam mais elevadas, conforme

citado anteriormente para massa de ovos e galhas totais do segundo experimento (Tabela 6.3). Segundo Guimarães et al. (2001), temperatura média em casa de vegetação de 36 °C, com amplitude de 23 °C e 39 °C, inibiu o caráter resistente de cultivares de tomateiro contra *M. incognita*, e de modo discreto para *M. javanica*.

Tabela 6.6 - Ovos e juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita* por grama de raiz e por 100 cm³ de solo, na qual as raízes das plantas de tomateiro foram tratadas com extrato de *Crambe abyssinica*, e as mesmas plantas receberam o extrato em diferentes vias e em épocas distintas de aplicação, sendo após a inoculação (uma semana após a inoculação); e semanalmente até aos 45 dias após a inoculação, o tratamento adicional é representado pela testemunha inoculada e não tratada. Marechal Cândido Rondon, outubro de 2014.*

Vias de aplicação do extrato	J2 e ovos por grama de raiz		J2 e ovos por 100 cm ³ de solo	
	Épocas de aplicação			
	Após a inoculação	Semanalmente	Após a inoculação	Semanalmente
Raiz + Solo	1747,61 Aa α	980,89 Ab α	1772,40 Aa α	2512,00 Aa α
Raiz + Folha	2772,16 Aa α	2581,17 Aa α	1551,60 Aa α	1263,70 Ab
Raiz + Solo + Folha	1430,39 Aa α	421,50 Bb	2082,00 Aa α	1022,40 Bb
Testemunha	1797,98 α		2400,00 α	
CV (%)	7,70	5,43	4,34	4,24

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

^aMédias não diferem da testemunha pelo teste de Dunnett ao nível de 5% de probabilidade.

*Neste segundo experimento foram utilizadas apenas duas épocas de aplicação.

Aplicações semanais via raiz+folha e raiz+solo+folha foram eficientes na redução de J2 e ovos por 100 cm³ de solo (Tabela 6.6), inferiores 8,33% e 10,71% em relação a testemunha. Raiz+solo+folha semanalmente foi inferior 9,09% do que a mesma via de aplicação na época após a inoculação. Os demais tratamentos não diferiram da testemunha. Confirmando assim, os resultados do primeiro experimento para as vias raiz+folha e raiz+solo+folha aplicados semanalmente. Sendo assim, quando as temperaturas são mais elevadas, aplicações somente no solo não são efetivas, condizendo com o trabalho de Borek et al. (1995), no qual alil isotiocianato, um derivado de glicosinolato, apresentou correlação negativa com o aumento da temperatura no solo.

Menor viabilidade dos ovos (Tabela 6.7) foi observada na época de aplicação semanal, na via raiz+solo e raiz+solo+folha na época após a inoculação, com 61,22 e 52,35% quando comparado com a testemunha, respectivamente. Sendo assim, menor a viabilidade dos ovos menor eclosão e população liberado ao solo.

Tabela 6.7 - Viabilidade de massa de ovos de *Meloidogyne incognita*, na qual as raízes das plantas de tomateiro foram tratadas com extrato de *Crambe abyssinica*, e as mesmas plantas receberam o extrato em diferentes vias e em épocas distintas de aplicação, sendo após a inoculação (uma semana após a inoculação); e semanalmente até aos 45 dias após a inoculação, o tratamento adicional é representado pela testemunha inoculada e não tratada. Marechal Cândido Rondon, outubro de 2014.

Vias de aplicação	J2 eclodidos da massa de ovos	
	Épocas de aplicação	
	Após a inoculação	Semanalmente
Raiz+solo	311,00 α	138,44
Raiz+folha	369,78 α	207,22 α
Raiz+solo+folha	170,11	200,33 α
Testemunha	357,00 α	
CV (%)	14,76	44,01

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

^aMédias não diferem da testemunha pelo teste de Dunnett ao nível de 5% de probabilidade.

*Neste segundo experimento foram utilizadas apenas duas épocas de aplicação.

6.4 CONCLUSÃO

Aplicações via raiz+solo+folha semanalmente de extrato hidroalcoólico de crambe reduziram massa de ovos, galhas totais, J2 e ovos por grama de raiz e por 100 cm³ de solo, e com menor viabilidade de ovos de *M. incognita* em tomateiro.

6.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AISSANI, N.; TEDESCHI, P.; MAIETTI, A.; BRANDOLINI, V.; GARAU, V. L.; CABONI, P. Nematicidal activity of allylisothiocyanate from horseradish (*Armoracia rusticana*) roots against *Meloidogyne incognita*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 61, p. 4723-4727, 2013.

BOREK, V.; MORRA, M.J.; BROWN, P.D.; MC CAFFREY, J.P. Transformation of the glicosinolate-derived allelochemicals allyl isothiocyanate and allylnitrile in soil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 43, p. 1935–1940, 1995.

CAILLAUD, M.C.; DUBREUIL, G.; QUENTIN, M.; PERFUS-BARBEOCH, L.; LECOMTE, P.; ENGLER, J.A.; ABAD, P.; ROSSO, M.N.; FAVERY, B. Root-knot nematodes manipulate plant cell functions during a compatible interaction. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 165, p. 104-113, 2008.

CAVOSKI, I.; CHAMI, A.A.; BOUZEBBOUDJA, F.; SASANELLI, N.; SIMEONE, V.; MONDELLI, D.; MIANO, T.; SARAI, G.; NTALLI, N.G.; CABONI, P. *Melia azedarach*

controls *Meloidogyne incognita* and triggers plant defense mechanisms on cucumber. **Crop Protection**, Amsterdam, v. 35, p. 85-90, 2012.

COLTRO-RONCATO, S.; GONÇALVES, E.D.V.; DILDEY, O.D.F.; KUHN, O.J.; STANGARLIN, J.R. Fitoquímicos como controle alternativo de nematoides. In: KUHN, O.J.; NUNES, R.V.; STANGARLIN, J.R.; RAMPIM, L.; FEY, R.; COSTA, N.V.; COSTA, P.B.; GUIMARÃES, V.F.; ZAMBOM, M.A. **Ciências agrárias: tecnologias e perspectivas**. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, 1 ed., 2015. p. 188-206.

CRUZ, C.D. **Programa Genes: Biometria**. Viçosa: UFV, 2006. 382 p.

ENGLER, J.A.; VLEESSCHAUWER, V.; BURSSSENS, S.; CELENZA, J.L.; INZE, D.; MONTAGU, M.V.; ENGLER, G.; GHEYSEN, G. Molecular Markers and cell cycle inhibitors show the importance of cell cycle progression in nematode-induced galls and syncytia. **The Plant Cell**, Waterbury, v. 11, p. 793–807, 1999.

GUIMARÃES, L.M.P.; MOURA, R.M.; PEDROSA, E.M.R.; Efeito da alta temperatura do solo na interação nematoide-planta em cultivares de tomateiro resistentes à *Meloidoginose*. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 25, n. 2, p. 185-189, 2001.

HARTMAN, K.M.; SASSER, J. N. Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential host test and perineal pattern morphology. In: BARKER, K.R.; CARTER, C.C.; SASSER, J.N. **An Advanced Treatise On Meloidogyne**. Methodology, North Carolina: University Graphics, 1985. p. 69-77.

JENKINS, W.R. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. **Plant Disease Reporter**, St. Paul, v. 48, p. 692, 1964.

LAZZERI, L.; LEONI, O.; CONTE, L.S.; PALMIERI, S. Some technological characteristics and potential uses of *Crambe abyssinica* products. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 3, p. 103-112, 1994.

LEONI, O.; IORI, R.; PALMIERI, S.; ESPOSITO, E.; MENEGATTI, E.; CORTESI, R.; NASTRUZZI, C. Myrosinase-generated isothiocyanate from glucosinolates: isolation, characterization and *in vitro* antiproliferative studies. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 5, n. 9, p. 1799-1806, 1997.

LOGUERCIO, A.P.; BATTISTIN, A.; VARGAS, A.C.; HENZEL, A.; WITT, N.M. Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico de folhas de jabolão (*Syzygium cumini* (L.) Skells). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 2, p. 371-376, 2005.

LOPES, E.A.; FERRAZ, S.; FREITAS, L.G.; FERREIRA, P.F.; AMORA, D.X. Efeito dos extratos aquosos de *Mucuna Preta* e de *Manjeriçã* sobre *Meloidogyne incognita* e *M. javanica*. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 29, p. 67-74, 2005.

MELO, T.A.; SERRA, I.M.R.S.; SILVA, G.S.; SOUSA, R.M.S. Produtos naturais aplicados para manejo de *Meloidogyne incognita* em tomateiros. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 38, n. 3, p. 223-227, 2012.

MOLINARI, S.; LOFFREDO, E. The role of salicylic acid in defense response of tomato to root-knot nematodes. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, Malden, v. 68, p. 69-78, 2006.

MOLINARI, S.; BASER, N. Induction of resistance to root-knot nematodes by SAR elicitors in tomato. **Crop Protection**, Amsterdam, v. 29, p. 1354-1362, 2010.

MORRA, M.J.; KIRKEGAARD, J.A. Isothiocyanate release from soil-incorporated *Brassica tissues*. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 34, p. 1683-1693, 2002.

NEVES, W.S.; FREITAS, L.G.; COUTINHO, M.M.; DALLEMOLE-GIARETTA, R.; FABRY, C.F.S.; DHINGRA, O.D.; FERRAZ, S. Ação nematicida de extratos de alho, mostarda, pimenta malagueta, de óleo de mostarda e de dois produtos à base de capsainóides e alil isotiocianato sobre juvenis de *Meloidogyne javanica*, (treub) Chitwood, 1949, em casa de vegetação. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 35, n. 4, p. 255-261, 2009.

OKA, Y.; COHEN, Y. Induced resistance to cyst and root-knot nematodes in cereals by DL- β -amino-*n*-butyric acid. **European Journal of Plant Pathology**, London, v. 107, p. 219-227, 2001.

ONYILAGHA, J.; BALA, A.; HALLETT, R.; GRUBER, M.; SOROKA, J. WESTCOTT, N. Leaf flavonoids of the cruciferous species, *Camelina sativa*, *Crambe* spp., *Thlaspi arvense* and several other genera of the family Brassicaceae. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 31, p. 1309-1322, 2003.

PAL VIG, A.; RAMPAL, G.; THIND, T.S.; ARORA, S. Bio-protective effects of glucosinolates. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 42, p. 1561-1572, 2009.

PEDROSA, E.M.R.; MOURA, R.M.; SILVA, E.G. Respostas de genótipos de *Phaseolus vulgaris* à Meloidoginose e alguns mecanismos envolvidos na reação. **Fitopatologia brasileira**, Brasília, v. 25, n. 2, p. 190-196, 2000.

RITZINGER, C.H.S.P.; FANCELLI, M.; RITZINGER, R. Nematoides: bioindicadores de sustentabilidade e mudanças edafoclimáticas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 32, n. 4, p. 1289-1296, 2010.

SALGADO, S.M.L.; SILVA, L.H.C.P. Potencial da indução de resistência no controle de fitonematóides. In: CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO, R.M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S.F.; RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R.S. **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, v. 13, 2005. p. 155-165.

SILVA, L.H.C.P.; CAMPOS, J.R.; DUTRA, M.R.; CAMPOS, V.P. Aumento da resistência de cultivares de tomate a *Meloidogyne incognita* com aplicações do acibenzolar-*S*-metil. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 28, n. 2, p. 199-206, 2004.

SILVA, R.V.; OLIVEIRA, R.D.L.; NASCIMENTO, K.J.T.; RODRIGUES, F.A. Biochemical responses of coffee resistance against *Meloidogyne exigua* mediated by silicone. **Plant Pathology**, Oxford, v. 59, p. 586-593, 2010.

SILVA, G.S. Métodos alternativos de controle de fitonematoides. **Revista Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 19, p. 81-152, 2011.

SILVA, R.V.; OLIVEIRA, R.D.L.; FERREIRA, P.S.; FERREIRA, A.O.; RODRIGUES, F.A. Defense responses to *Meloidogyne exigua* in resistant coffee cultivar and non-host plant. **Tropical Plant Pathology**, Viçosa, v. 38, n. 2, p. 114-121, 2013.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. Ed. Porto Alegre: Artmed. p. 317-327, 2004.

TAYLOR, A.L.; SASSER, J.N. **Biology, identification and control of the root-knot nematodes**. Raleigh, North Carolina State University Graphics, 1978.

TRANI, P.E.; NAGAI, H.; PASSOS, F.A. Tomate (estaqueado). In: RAI, J. B.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A.; FURLANI, A. M. C. **Recomendação de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**. Campinas: IAC, 1997. p. 183. (Boletim técnico, 100).

TRONCOSO, R.; ESPINOZA, C.; SÁNCHEZ-ESTRADA, A.; TIZNADO, M.E.; GARCÍA, H.S. Analysis of the isothiocyanates present in *Cabbage leaves* extract and their potential application to control *Alternaria* rot in bell peppers. **Food Research International**, Essex, v. 38, p. 701–708, 2005.

WALKER, J. T. Crambe and rapeseed meal as soil amendments: nematicidal potential and phytotoxic effects. **Crop Protection**, Amsterdam, v. 15, n. 5, p. 433-437, 1996.

WU, H.; WANG, C.J.; BIAN, X.W. B.; ZENG, S.Y.; LIN, K.C.; WU, B.; ZHANG, G.A.; ZHANG, X. Nematicidal efficacy of isothiocyanates against root-knot nematode *Meloidogyne javanica* in cucumber. **Crop Protection**, Amsterdam, v. 30, p. 33-37, 2011.

ZASADA, I.A.; FERRIS, H. Nematode suppression with brassicaceous amendments: application based upon glucosinolate profiles. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 36, p. 1017-1024, 2004.

7 CAPÍTULO 4 - CONTROLE DE *Meloidogyne javanica* EM TOMATEIRO POR DIFERENTES FORMAS DE APLICAÇÃO DO EXTRATO DE *Crambe abyssinica*

RESUMO

Com o objetivo de desenvolver métodos alternativos aos químicos para controle de fitonematoides, este trabalho estudou o efeito das épocas de aplicação, assim como das vias de aplicação de extrato de crambe, no controle de *M. javanica* em tomateiro. Foram conduzidos dois experimentos, o primeiro nos meses de abril à junho e o segundo de outubro à dezembro de 2014, em casa de vegetação. No primeiro experimento foram utilizadas três vias de aplicação do extrato de crambe: foliar; solo; foliar+solo, em quatro épocas: antes da inoculação; na inoculação; após a inoculação; e semanalmente até 45 dias. No segundo experimento foram utilizadas as vias de aplicação como citado anteriormente, em duas épocas (após a inoculação e semanalmente). Após sete dias do transplante, foram inoculados em ambos os experimentos 2.500 ovos de *M. javanica* por vaso. Em ambos os experimentos foram utilizados extrato hidroalcoólico na concentração de 250 mg L⁻¹ de folhas de crambe. Aplicações do extrato via solo+folha semanalmente reduziram a formação de massa de ovos em até 42% e o número de galhas totais em até 46%. Quando esse mesmo tratamento e a mesma via só que iniciada após a inoculação, houve redução do número de juvenis de segundo estágio (J2) e de ovos por grama de raiz em 35% e 37% respectivamente. Dessa forma, aplicações do extrato de crambe via solo+folha semanalmente apresentam-se promissoras para controle de *M. javanica* em tomateiro.

Palavras-chave: Tomateiro. *Brassica*. Fitonematoide. Controle alternativo. Massa de ovos.

CAPÍTULO 4 – *Meloidogyne javanica* CONTROL IN TOMATO PLANTS IN DIFFERENT FORMS OF *Crambe abyssinica* EXTRACT APPLICATION

ABSTRACT

Aiming to develop alternative methods to chemical nematode control, this paper studied the effect of application timing, as well as the crambe extract routes of administration on the control of *M. javanica* in tomato plants. Two experiments were carried out, the first one from April to June and the second one from October to December 2014, in greenhouse. In the first experiment three routes of administration of crambe extract were used: leaf; soil; leaf+soil, in four periods: before inoculation; on inoculation; after inoculation; and weekly up to 45 days. In the second experiment the application routes were used as previously mentioned, in two periods (after inoculation and weekly). Seven days after transplantation, in both experiments 2,500 *Meloidogyne javanica* eggs per pot were inoculated. In both experiments hydroalcoholic extract at a concentration of 250 mg L⁻¹ crambe leaves was used. Applications of the extract via soil+leaf weekly reduced the mass of eggs formation by 42%, and the total number of galls on up to 46%. When that same treatment and the same route initiated after inoculation, there was a reduction in second-stage juveniles (J2) numbers and eggs per gram of root in 35% and 37% respectively. Thus, applications of the crambe extract via soil+leaf weekly were promising to control *M. javanica* in tomato plants.

Keywords: Tomato plants. *Brassica*. Plant-parasitic nematode. Alternative control. Mass of eggs.

7.1 INTRODUÇÃO

A produção do tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) no Brasil chegou a 4 milhões de toneladas no ano de 2014, com rendimento médio de 65.942 kg ha⁻¹, e a área cultivada com tomateiro vem aumentando nos últimos anos, em 2005 era de 60.639 ha, já em 2014 a área foi para 65.146 ha (IBGE, 2015). O Brasil encontra-se em oitavo lugar na produção mundial de tomates, perdendo pra China, Índia, Estados Unidos da América, Turquia, Egito, Iran e Itália (FAOSTAT, 2012).

Os fitonematoides são considerados como um dos principais patógenos do sistema radicular de tomateiro, sendo o gênero *Meloidogyne* o mais importante, devido às complexas interações com seus hospedeiros (WESTERICH et al., 2012). O processo de parasitismo do nematoide das galhas sobre as plantas cultivadas resulta, entre outras coisas em plantas comprometidas quanto ao seu desenvolvimento vegetativo e produtivo (MELO, 2012).

O gênero *Meloidogyne* possui estratégias evoluídas para a formação de células de alimentação em muitas espécies de plantas. Por manipulação de elementos fundamentais no desenvolvimento da célula vegetal, este nematoide forma células gigantes como fonte de alimento permanente, e, para isso, são necessárias grandes alterações na expressão de genes promovidas pelas secreções esofagianas, tais como, reguladores de crescimento, proteínas e glicoproteínas (CAILLAUD et al., 2008). As células gigantes são fonte exclusiva de nutrientes para o desenvolvimento do nematoide, e são consequência da hiperplasia e hipertrofia celular, ao redor do corpo do nematoide, e estão associadas aos sintomas de galhas e redução no volume do sistema radicular, ocasionando menos absorção de água e nutrientes, resultando em baixos rendimentos da cultura (FERRAZ; MONTEIRO, 2011).

As células selecionadas pelo nematoide tornam-se multinucleadas, ocorrendo mitoses repetidas sem separação por citocinese. Nestas células o metabolismo é acelerado, com citoplasma denso e granuloso, contendo várias mitocôndrias, plastídios, ribossomos, o vacúolo dá origem a vários pequenos vacúolos que aumentam a absorção de soluto à partir do sistema vascular, e a parede celular desenvolve uma ligação com o xilema (CAILLAUD et al., 2008; ENGLER et al., 1999; JONES; PAYNE, 1978). Porém, durante a penetração, desenvolvimento do juvenis de segundo estágio (J2), formação de galhas e produção de ovos, ocorrem respostas de defesa da planta (CAILLAUD et al., 2008; SILVA et al., 2013).

Diferentes mecanismos estruturais e bioquímicos podem contribuir para resistência da planta contra fitopatógenos e proteínas relacionadas à patogênese são induzidas no hospedeiro em resposta à infecção por patógeno ou estímulo abióticos (STANGARLIN et al., 2011). O

aumento da atividade de peroxidases, polifenoloxidasas e fenilalanina amônia-liase, bem como maior concentração de lignina e compostos fenólicos nas raízes, podem ocorrer em função da ativação de mecanismos de resistência (SILVA et al., 2010). Modificações bioquímicas ocorridas em plantas após serem induzidas podem acarretar em modificações na natureza dos exsudatos radiculares e podem atrair ou repelir o nematoide (SALGADO; SILVA, 2005).

Extratos de espécies vegetais podem controlar nematoides, por induzir resistência por meio de aplicações foliares (CHINNASRI et al., 2003; LOPES et al., 2005) ou por efeito direto e/ou indutor, por aplicações via solo (AISSANI et al., 2013; WALKER, 1996). Espécies de brássicas, assim como o crambe, apresentam compostos com ação nematocida (AISSANI et al., 2013; LEONI et al., 1997; WALKER, 1996; WU et al., 2011). Pesquisas envolvendo o uso de extratos vegetais podem conduzir a resultados promissores no controle de nematoides. Diferentes formas de aplicação, de preparo dos extratos devem ser estudadas, assim como o potencial de diferentes espécies de plantas (LOPES et al., 2005).

As plantas são capazes de produzir vários metabólitos secundários, muitos dos quais podem atuar como repelentes, atrativos, inibidores, nematotóxicos e nematostáticos, e, além disso, são mais seguros para os humanos e ambientalmente corretos quando usados para controle de doenças em vegetais (CHITWODD, 2002). Segundo Sharma e Tripathi (2006), dificilmente os patógenos apresentam resistência aos produtos derivados das plantas, pois há numerosos componentes com diferentes mecanismos de ação. Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi verificar o efeito das épocas de aplicação assim como das vias de aplicação de extrato de crambe (*Crambe abyssinica*), no controle de *M. javanica* em tomateiro.

7.2 MATERIAL E MÉTODOS

7.2.1 Condução do Experimento

O experimento foi conduzido no período de abril à junho de 2014 (primeiro experimento) e a repetição do experimento (segundo experimento) foi conduzido no período de outubro à dezembro de 2014. Estes foram conduzidos em casa de vegetação climatizada localizado no Complexo de Controle Biológico e Cultivo Protegido Prof. Dr. Mário César Lopes, pertence a Universidade Estadual do Oeste do Paraná- UNIOESTE, *campus* Marechal Cândido Rondon, Paraná

Para ambos os experimentos o delineamento experimental foi em blocos casualizados com cinco repetições. O extrato utilizado foi o hidroalcoólico 250 mg L⁻¹ preparado segundo a

metodologia proposta por Loguercio et al. (2005). As folhas de crambe foram coletadas em estágio vegetativo, 35 dias após emergência da cultura (DAE) no município de Cascavel-PR, com coordenadas de latitude 24°57'21" sul e longitude 53°27'19" oeste, altitude de 781 metros, e foram secas em estufa a 45 °C por 48 h, trituradas em moinho de facas e passadas em peneiras de 48 Mesh, obtendo-se o pó desta planta, e armazenado em recipiente fechado no escuro a temperatura ambiente até o momento de preparo dos extratos.

O extrato por solução hidroalcoólica (70% v/v álcool etílico-C₂H₆O), foi estocada à temperatura ambiente, protegida da luz, por um período de 15 dias, após foi filtrado em papel filtro Whatman n° 1, em seguida, roto-evaporados à vácuo em temperatura de aproximadamente 50 °C, e ressuspenso em 1000 mL de água destilada com 0,6% de Tween 20.

Foram utilizadas mudas de tomateiro Santa Cruz Kada (Paulista) com 25 dias após a semeadura (DAS), em bandeja de poliestileno com substrato comercial Plantmax, e transplantadas em vasos com capacidade de três litros preenchidos com solo esterilizado por autoclavagem à 120 °C/1 atm durante 1 hora, na mistura 3:2:1 (solo:areia:matéria orgânica). Após foi enviado uma amostra de solo para análise química no Laboratório de Química Agrícola e Ambiental da Unioeste, para posterior correção conforme recomendação de Trani, Nagai e Passos (1997).

O inóculo foi obtido de tomateiros infectados cultivados em casa de vegetação e identificados com base na configuração da região perineal (HARTMAN; SASSER, 1985).

7.2.2 Variáveis Analisadas

As variáveis foram analisadas 45 dias após inoculação, com o término do experimento. Após a separação das raízes do solo, estas foram lavadas e secas em temperatura ambiente para determinação da massa fresca da raiz, posterior armazenamento em sacos plásticos tanto as raízes como o solo separados em temperatura próxima aos 4 °C.

7.2.2.1 Massa de Ovos e Galhas Totais nas Raízes

Para verificar a existência de massa de ovos nas raízes, estas foram coradas com Floxina B à 15 mg L⁻¹ durante 20 min, após lavadas para tirar o excesso de corante (TAYLOR; SASSER, 1978), secas com papel toalha e contados galhas com massa de ovos e sem massa de ovos com auxílio de lupa de mesa. O número de galhas totais foram quantificadas visualmente com auxílio de lupa de mesa.

7.2.2.2 Número de Ovos e Juvenis de Segundo Estádio (J2) por grama de raiz

Para extração de ovos e nematoides das raízes foi utilizado a metodologia de Freitas et al. (2007). As raízes foram cortadas e trituradas em liquidificador por 20 seg, vertido sobre peneira de 0,427 mm de abertura de malha (48 Mesh) acoplada na peneira de 0,037 mm de abertura de malha (400 Mesh), nesta os nematoides foram retidos e o conteúdo recolhido em tubos de centrifuga e submetidos ao método de flotação centrifuga em solução de sacarose. Os ovos e J2 retidos na peneira de 400 Mesh foram transferidos para lâmina de Peters e quantificado.

7.2.2.3 Número de Ovos e J2 por 100 cm³ de Solo

O método flotação centrífuga em solução de sacarose foi empregado para extração de ovos e nematoides do solo (JENKIS, 1964). O procedimento correspondeu com a extração de 100 cm³ de solo, peneiramento à 0,427 mm de abertura de malha (48 Mesh) acoplada na peneira de 0,037 mm de abertura de malha (400 Mesh), nesta os nematoides foram retidos e o conteúdo recolhido em tubos de centrifuga e submetidos a centrifugação em solução de sacarose com densidade de 1,15 g cm³. Os ovos e J2 retidos na peneira de 400 Mesh foram transferidos para lâmina de Peters e quantificado.

7.2.3 Primeiro Experimento

O esquema fatorial (3x4+1) foi utilizado, sendo, três diferentes vias de aplicação na planta: via solo; via foliar e via solo+foliar, em quatro épocas de aplicação: 1) antes da inoculação (três dias após o transplante das mudas); 2) na inoculação (sete dias após o transplante); 3) após a inoculação (uma semana após a inoculação); e 4) semanalmente até aos 45 dias após a inoculação, totalizando nove aplicações (incluindo todas as épocas de aplicação citadas anteriormente) e um tratamento adicional, testemunha inoculada e não tratada.

As plantas foram tratadas com fungicida (Trifloxistrobina+ Tebuconazol (75 + 150 g i.a. ha⁻¹)) devido a presença da mancha-de-estenfílio, causada pelo fungo *Stemphyllium* sp., 15 dias após o transplante, com três dias de diferença entre a aplicação do fungicida com o extrato, e a outra aplicação de fungicida foi 15 dias após a primeira aplicação.

O extrato aplicado via foliar através de pulverização com borifador da parte adaxial das folhas até ponto de escorrimento. Para não entrar em contato com o solo, o vaso foi coberto com papel laminado e jornal, para que a aspersão não entrasse em contato com outras plantas estes vasos foram retirados e isolados, plantas tratadas via solo receberam 30 mL do extrato por vaso, correspondendo à 1% do v/v. Todos os tratamentos foram efetuados no período da manhã. Após sete dias do transplante foi efetuada a inoculação de 2.500 ovos e 513 J2 por vaso de *M. javanica* por meio de perfurações ao redor das raízes com profundidade de 5 cm.

Para análise dos dados foi realizado o teste de normalidade de Lilliefors à 5% de probabilidade, em todos os dados foi aplicado o teste Q, ficando com quatro repetições, e ainda na ausência de normalidade para massa de ovos e J2 e ovos por grama de raiz, os dados foram transformados em $\sqrt{x + 0,5}$. Posteriormente, realizou-se a análise de variância e as médias referentes aos tratamentos foram submetidas ao teste de médias de Tukey, e quando o tratamento adicional mostrava-se significativo na análise de variância utilizou-se um teste adicional, o Dunnett. O software estatístico Genes (CRUZ, 2006) foi utilizado.

7.2.4 Segundo Experimento

Após análise dos dados do primeiro experimento, foi conduzido um segundo experimento para confirmação das melhores épocas de aplicação. Utilizou-se o esquema fatorial (3x2+1), três vias de aplicação na planta, como citado no primeiro experimento, quanto as épocas de aplicação foram as seguintes: 1) após inoculação (uma semana após a inoculação); e 2) semanalmente (inclui as seguintes aplicações: três dias após o transplante das mudas; sete dias após o transplante; uma semana após a inoculação e semanalmente até aos 45 dias após a inoculação, totalizando nove aplicações. Foram inoculados aproximadamente 2.500 ovos e 356 J2 de *M. javanica* por vaso. As mudas foram tratadas com fungicida (Trifloxistrobina+ Tebuconazol (75 + 150 g i.a. ha⁻¹)) devido a ocorrência mancha-de-estênfilo, oito dias antes do transplante.

Após a contagem do número de massa de ovos e galhas totais, as massas de ovos foram coletadas para avaliar a viabilidade. Foram utilizadas três repetições por tratamento e em triplicata, em delineamento inteiramente casualizado. Placas de Elisa com água destilada foram utilizadas e em cada célula da placa Elisa foi colocado uma massa de ovo e após 15 dias foi avaliado a eclosão dos ovos

Para análise dos dados foi realizado o teste de normalidade de Lilliefors à 5% de probabilidade, em todos os dados foi aplicado o teste Q, ficando com quatro repetições. A

normalidade foi encontrada para galhas totais, J2 e ovos por grama de raiz e por 100 cm³ de solo, quando os dados foram transformados em log (x+1). Posteriormente, realizou-se a análise de variância e as médias referentes aos tratamentos foram submetidas ao teste de médias Tukey, e quando o tratamento adicional mostrava-se significativo na análise de variância utilizou-se um teste adicional, o Dunnett. O software estatístico Genes (CRUZ, 2006) foi utilizado.

7.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A única via que diferiu entre as épocas de aplicação foi solo+folha (Tabela 7.1), com menor média de massa de ovos em aplicações semanais, e foi 18,52% inferior a época após a inoculação, porém, esta não diferiu estatisticamente com média intermediária (14,47). Apesar da via solo não diferir entre as épocas de aplicação, diferiu em todas as épocas da testemunha com menos massa de ovos, diferente da via foliar que não diferiu em nenhuma época da testemunha. Para controlar a reprodução de *M. javanica*, a via foliar independente de outras vias de aplicação não se mostrou eficaz. A capacidade reprodutiva mostra que as células gigantes foram eficientes no fornecimento de alimento aos juvenis e fêmeas (CAMPOS et al., 2011).

Tabela 7.1- Massa de ovos em raízes de tomateiro inoculados com *Meloidogyne javanica*, na qual as raízes das plantas de tomateiro foram tratadas com extrato de *Crambe abyssinica*, e as mesmas plantas receberam o extrato em diferentes vias e em épocas distintas de aplicação, sendo antes da inoculação (três dias após o transplante das mudas); na inoculação (sete dias após o transplante); após a inoculação (uma semana após a inoculação); e semanalmente até aos 45 dias após a inoculação (incluindo as demais aplicações), o tratamento adicional é representado pela testemunha inoculada e não tratada. Marechal Cândido Rondon, abril de 2014.*

Vias de aplicação do extrato	Épocas de aplicação			
	Antes da inoculação	Na inoculação	Após a inoculação	Semanalmente
Solo	232,50 Aa	313,50 Aa	225,00 Ab	258,00 Aa
Folha	299,25 Aa α	353,75 Aa α	335,00 Aa α	332,25 Aa α
Solo + Folha	281,50 ABa	374,50 Aa α	212,25 BCb	139,50 Cb
Testemunha	416,50 α			
CV (%)	10,40	6,03	12,23	9,38

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

α Médias não diferem da testemunha pelo teste de Dunnett ao nível de 5% de probabilidade.

*Neste primeiro experimento foram utilizados quatro épocas de aplicação.

Na época de aplicação após a inoculação, as vias solo e solo+folha não diferiram entre si e apresentaram menos massa de ovos 17,80% e 20,54% comparado a via foliar, quando comparado com a testemunha, estas vias reduziram massa de ovos em 26,40% e 28,86%, respectivamente.

A massa de ovos foi inferior para via solo+folha na época semanal em 26,36% e 35,29% comparado à via solo e via foliar, respectivamente, e inferiores 42% à testemunha. Portanto, aplicações via solo+folha semanalmente apresentam maior potencial de controle do que cada via independente, e maior redução de massa de ovos do que a mesma via quando aplicado após a inoculação em 13,14%.

Aplicações sequenciais via solo+folha, apresentam maior efeito na reprodução de *M. javanica*, e conseqüentemente menos fêmeas com ovos. Talvez a necessidade de aplicações sequencias, esteja relacionada a vida útil dos compostos tóxicos presentes em brássicas. Isotiocianatos derivados de brássicas tais como, 2-propenil, benzil, 2-feniletil e metil isotiocianato, foram estudados em aplicações ao solo, e os mesmos persistiram de 2,5 à 11 dias, dependendo das condições na qual o solo se encontrava (WARTON et al., 2003). Feniletil isotiocianato foi degradado dentro de 96 h pelos microrganismos do solo, no entanto, adições sequenciais afetaram os patógenos do solo (RUMBERGER; MARSCHNER, 2003). Nematicidas químicos também necessitam de aplicações complementares, uma vez que, são degradados pela população microbiana do solo e diminuem a persistência e eficácia com o tempo (RAHMAN et al., 2011).

As aplicações via foliar em todas as épocas de aplicação avaliadas (Tabela 7.1), não apresentaram controle de massa de ovos. Sugere-se portanto, que a aplicação do extrato não tenha apresentado indução de resistência quando aplicado via foliar, ou tenham ativado rotas de sinalização que não contemplem a indução de resistência contra fitonematoides. Salgado et al. (2007) observaram que pulverizações de acibenzolar-S-metil (ASM) em cafeeiro, e adicionados ao solo aos sete dias antes da inoculação, e aos dois e sete dias após a inoculação de ovos de *Meloidogyne exigua*, não demonstraram redução do número de galhas, fator de reprodução e população final. Os autores atribuíram tal fato, à possível ativação da rota de sinalização pelo ácido salicílico, e que provavelmente, a rota de sinalização que induz resistência de plantas contra fitonematoides seja dependente de ácido jasmônico e etileno. No entanto, Oka et al. (1999) verificaram que, pulverização foliar e adição ao solo de ácido salicílico, ácido jasmônico e metil jasmonato, não induziram resistência ao tomateiro para o controle *M. javanica*.

Na Tabela 7.2, pode-se observar que a única via de aplicação e época que mostrou diferença da testemunha foi via solo+folha semanalmente, com 46,15% a menos de galhas totais. Sendo assim, aplicações via solo+folha necessitam de aplicações semanais para reduzir a formação de sítios de alimentação. Gardiano et al. (2009) observaram que a ação nematostática e/ou nematicida, reduz o número de nematoides e conseqüentemente o número de galhas e de ovos, com aplicações de extratos aquosos de hortelã, bardana e mamona via solo.

Tabela 7.2 - Galhas totais em raízes de tomateiro inoculados com *Meloidogyne javanica*, na qual as raízes das plantas de tomateiro foram tratadas com extrato de *Crambe abyssinica*, e as mesmas plantas receberam o extrato em diferentes vias e em épocas distintas de aplicação, sendo antes da inoculação (três dias após o transplante das mudas); na inoculação (sete dias após o transplante); após a inoculação (uma semana após a inoculação); e semanalmente até aos 45 dias após a inoculação (incluindo as demais aplicações), o tratamento adicional é representado pela testemunha inoculada e não tratada. Marechal Cândido Rondon, abril de 2014.*

Vias de aplicação do extrato	Épocas de aplicação			
	Antes da inoculação	Na inoculação	Após a inoculação	Semanalmente
Solo	448,00 Ba α	608,75 Aa α	461,50 ABa α	444,50 Bab α
Folha	526,25 Aa α	580,50 Aa α	506,75 Aa α	551,25 Aa α
Solo + Folha	524,00 ABa α	602,75 Aa α	441,75 BCa α	319,75 Cb
Testemunha	593,75 α			
CV (%)	16,71	14,5	19,37	17,64

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

^aMédias não diferem da testemunha pelo teste de Dunnett ao nível de 5% de probabilidade.

*Neste primeiro experimento foram utilizados quatro épocas de aplicação.

Segundo Oka et al. (1999), aplicações via solo e foliar de ácido DL- β -amino-*n*-butírico (BABA), indutor de resistência, com intervalos de 10 dias até 40 dias e inoculação dois dias após a primeira aplicação, reduziram o número de ovos e galhas de *M. javanica* nas raízes de tomateiro. No entanto, pulverizações via foliar nas mudas cinco dias após e três dias antes da inoculação dos J2, retardaram o desenvolvimento do nematoide e afetaram o número de galhas. Os autores explicaram o controle, por mecanismos de defesa ativados, porém quando a inoculação foi feita imediatamente após a pulverização foliar os tomateiros apresentavam mais galhas, inoculações após cinco dias do tratamento, os nematoides invadiam as raízes laterais novas e induziam a formação de galhas. Os autores concluíram que a duração da indução de resistência foi aproximadamente cinco dias. Estes resultados corroboram com o presente

trabalho para aplicações via solo+folha, pois, quando aplicados semanalmente reduzem o número de galhas e massa de ovos.

Apesar de aplicações em algumas vias na época após a inoculação apresentarem menos massa de ovos que a testemunha, estas não reduziram significativamente a formação de galhas sendo assim, a atuação para esta época de aplicação pode ser principalmente na reprodução. Silva et al. (2013) relatam em seus estudos com mecanismos de resistência induzidos em plantas, que a planta pode formar galha mas a fêmea não reproduzir. O J2 de *M. javanica* pode penetrar nas raízes mas não ter sucesso na formação do sítio de alimentação, assim como, pode ter sucesso na formação de células gigantes, mas incapazes de suprir nutricionalmente as fêmeas e muito menos a reprodução (CAMPOS et al., 2011).

Com base nas informações das Tabelas 7.1 e 7.2, pode-se observar que as épocas que apresentaram maior controle na reprodução e formação de galhas, foram após a inoculação e semanalmente. Portanto, as épocas de maior eficiência no controle de *M. javanica* foram avaliadas novamente num segundo experimento, para confirmação dos resultados

O segundo experimento confirmou os resultados do primeiro para a massa de ovos na época de aplicação semanal, uma vez que, a via solo+folha foi a menor média e inferior 73,13% comparado com a via solo, e estas inferiores 85,47% e 45,91% comparado à testemunha, respectivamente (Tabela 7.3).

Tabela 7.3 - Massa de ovos (MO) e galhas totais (GT) em raízes de tomateiro inoculados com *Meloidogyne javanica*, na qual a planta foi tratada com extrato de *Crambe abyssinica* em diferentes vias e em épocas distintas de aplicação, sendo após a inoculação (uma semana após a inoculação) e semanalmente até aos 45 dias após a inoculação, a testemunha é considerada como tratamento adicional e é representado por plantas inoculadas e não tratadas. Marechal Cândido Rondon, outubro de 2014.*

Vias de aplicação do extrato	MO		GT	
	Épocas de aplicação			
	Após a inoculação	Semanalmente	Após a inoculação	Semanalmente
Solo	286,50 Aa α	244,75 Ab	425,50 Aa α	314,75 Aa α
Folha	421,00 Aa α	424,25 Aa α	629,50 Aa α	565,25 Aa α
Solo + Folha	386,25 Aa α	65,75 Bc	584,50 Aa α	96,50 Bb
Testemunha	452,50 α		543,25 α	
CV (%)	21,7	27,76	6,49	7,35

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

α Médias não diferem da testemunha pelo teste de Dunnett ao nível de 5% de probabilidade.

*Neste segundo experimento foram utilizadas apenas duas épocas de aplicação.

As vias de aplicação não diferiram entre si, e comparado com a testemunha na época de aplicação após a inoculação, para massa de ovos, não conferindo com os resultados do primeiro experimento que apresentou redução na via solo e solo+folha. Tais resultados podem ser devido a diferença de temperatura entre o primeiro e segundo experimento, pois, no segundo experimento as temperaturas estavam mais elevadas com média de 24,8 °C, favorecendo a reprodução. No primeiro experimento, a temperatura média foi de 19,3 °C, estes dados da temperatura são da Estação Meteorológica de Observação de Superfície Automática (A820) da Estação Experimental Prof. Dr. Antônio Carlos dos Santos Pessoa, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná de Marechal Cândido Rondon.

De acordo com Campos et al. (2011), a temperatura de 28 °C é favorável à reprodução de *M. javanica* em plantas de soja resistentes como para as suscetíveis, e apresentam maior número de massa de ovos, já a temperatura de 20 °C afeta apenas o desenvolvimento pós-embrionário, elevando a soma de J3 e J4 dentro do hospedeiro, não favorecendo a reprodução e o número de fêmeas e ovos. Ainda, temperaturas de 24 °C são mais favoráveis a reprodução e sucesso no parasitismo do que temperatura de 20 °C. De forma complementar, os estádios juvenis 3 e 4 são desprovidos de estilete e são incapazes de se alimentar (FERRAZ; MONTEIRO, 2011).

As galhas totais (Tabela 7.3) não foram influenciadas por diferenças de temperatura nas épocas de aplicações semanais e após a inoculação, pois os resultados no primeiro e segundo experimento se mantiveram. Segundo Campos et al. (2011), a penetração de J2 foi semelhante em temperaturas de 20 °C e 32 °C.

Tanto no primeiro experimento como no segundo, a melhor via e época de aplicação para controle de galhas totais foi via solo+folha semanalmente, talvez pelo fato de vários mecanismos de ação estarem atuando simultaneamente, como efeitos nematocidas e/ou nematostáticos e indução de resistência. Mecanismos de defesa podem ser manifestados pela necrose ao redor da célula inicial do sítio de alimentação ou pela expansão retardada dessa célula (FARIA et al., 2003). Mecanismos de resistência à nematoides em plantas envolvem vários compostos, tais como, compostos fenólicos, lignina, suberina, ácido clorogênico, fitoalexinas, isoflavonóides e cumarinas, sendo a rota dos fenilpropanóides precursora da produção (MOLINARI, 1996).

Os resultados obtidos no presente trabalho e as características atribuídas às brássicas, indicam que o extrato deve ter atuado sobre a eclosão de ovos, sobre a mortalidade e paralização de J2 (AISSANI et al., 2013; NEVES et al., 2009; PAL VIG et al., 2009; WU et al., 2011), visto que o número de galhas foi reduzido em mais de 30% e massa de ovos mais de 80% para via

solo+folha semanal. Porém, não foram encontradas pesquisas relacionadas a indução de resistência por aplicações via solo e foliar de brássicas contra nematoides.

Segundo Wu et al. (2011), produtos sintetizados a partir de isotiocianatos derivados dos glicosinolatos de brássicas, apresentam efeito nematicida e tem potencial para serem usados como bio-fumigantes, como acrilóil isotiocianato (>95% AcITC) e alil isotiocianato (>94% AITC), que apresentaram os melhores resultados no controle de *M. javanica* em pepino, demonstrando que estes compostos além do grande potencial para serem usados como novo nematicida, tem pouca toxicidade a organismos não alvo e sem perigos de aplicação.

As épocas de aplicação não diferiram dentro de cada via para controle de J2 e ovos por grama de raiz. Porém, as vias de aplicação diferiram dentro de cada época (Tabela 7.4). Sendo assim, antes da inoculação a via solo foi inferior 41,44% comparado à testemunha, o que pode ser devido a efeitos diretos sobre o nematoide ou por indução de resistência. Alguns autores observaram indução de resistência em tomateiro e efeito nematostático promovida por tratamentos protetores via solo no controle de *M. javanica* (JAVED et al., 2007; JAVED et al., 2008).

Tabela 7.4 - Ovos e juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* por grama de raiz, na qual as raízes das plantas de tomateiro foram tratadas com extrato de *Crambe abyssinica*, e as mesmas plantas receberam o extrato em diferentes vias e em épocas distintas de aplicação, sendo antes da inoculação (três dias após o transplante das mudas); na inoculação (sete dias após o transplante); após a inoculação (uma semana após a inoculação); e semanalmente até aos 45 dias após a inoculação (incluindo as demais aplicações), o tratamento adicional é representado pela testemunha inoculada e não tratada. Marechal Cândido Rondon, abril de 2014.*

Vias de aplicação do extrato	Épocas de aplicação			
	Antes da inoculação	Na inoculação	Após a inoculação	Semanalmente
Solo	14,91 Ab	25,57 Aa α	25,14 Aab α	13,09 Ab
Folha	40,73 Aa α	44,89 Aa α	42,44 Aa α	39,74 Aa α
Solo + Folha	28,52 Aab α	33,70 Aa α	18,33 Ab	18,74 Ab
Testemunha	44,66 α			
CV (%)	15,98	19,7	27,47	20,03

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

αMédias não diferem da testemunha pelo teste de Dunnett ao nível de 5% de probabilidade.

*Neste primeiro experimento foram utilizados quatro épocas de aplicação.

A época de aplicação após a inoculação na via solo+folha diferiu da testemunha, com menos J2 e ovos por grama de raiz em 37,40% (Tabela 7.4). Segundo Javed et al. (2007),

aplicações de formulados de nim (*Azadirachta indica*) com efeito curativo em tomateiro, com solo infestado de *M. javanica*, pode reduzir a população de nematoides.

A aplicação do extrato de crambe na época semanal, demonstrou controle tanto para a via solo como para a via solo+folha, estes não diferiram entre si e apresentaram redução de J2 e ovos por grama de raiz em 45,64% e 35,28% em comparação com a testemunha. Esses resultados podem ser devido a interferência na reprodução como foi observado para massa de ovos e/ou menor penetração, devido a mecanismos de resistência ativados e/ou efeito tóxico direto no solo que desorientou o J2 ou inativou e levou a morte. Alterações nos exsudatos radiculares podem ocorrer após a indução de resistência, atraindo ou repelindo o nematoide (SALGADO; SILVA, 2005).

Aplicações de compostos que repelem ou atraem os nematoides afetam o comportamento destes, podem fazer com que o nematoide gaste a energia que seria necessária para parasitar o sistema radicular, podem desorientar os J2 e tornar difícil a localização do sistema radicular para a penetração. Além disso, a atração dos nematoides para áreas com nematicidas podem aumentar a eficácia do controle (HEWLETT et al., 1997; MAISTRELLO et al., 2010).

Diferenças significativas podem ser observadas entre os tratamentos (Tabela 7.5), no controle de J2 e ovos por 100 cm³ de solo. A aplicação do extrato via solo apresentou menor média de J2 e ovos por 100 cm³ de solo, quando aplicado semanalmente, inferior 36,37% e 45% comparado com as épocas de aplicação antes da inoculação e na inoculação, respectivamente. Sendo assim, aplicações via solo devem ter aplicações sequenciais, isso pode ser devido aos compostos presentes em brássicas, que podem apresentar vida útil curta, podem ser degradados ou ainda, os compostos ativos podem ser adsorvidos pela argila do solo, inativando-os (NANDAL; BHATTI, 1986; OKA, 2010). Alguns isotiocianatos podem ser inativados pelo solo, e isso depende se este é alifático ou aromático. Os alifáticos são biologicamente mais ativos, e menos afetados pelo solo comparado aos aromáticos, que apresentam atividade reduzida pelo solo e matéria orgânica. Portanto, brássicas ricas em isotiocianatos alifáticos apresentam maior potencial contra patógenos em solo (MATTHIESSEN; SHACKLETON, 2005). O *Crambe abyssinica* contém predominantemente glicosinolatos alifáticos do que aromáticos (FAHEY et al., 2001).

Tabela 7.5 - Ovos e juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* por 100 cm³ de solo, na qual as raízes das plantas de tomateiro foram tratadas com extrato de *Crambe abyssinica*, e as mesmas plantas receberam o extrato em diferentes vias e em épocas distintas de aplicação, sendo antes da inoculação (três dias após o transplante das mudas); na inoculação (sete dias após o transplante); após a inoculação (uma semana após a inoculação); e semanalmente até aos 45 dias após a inoculação (incluindo as demais aplicações), o tratamento adicional é representado pela testemunha inoculada e não tratada. Marechal Cândido Rondon, abril de 2014.*

Vias de aplicação do extrato	Épocas de aplicação			
	Antes da inoculação	Na inoculação	Após a inoculação	Semanalmente
Solo	1708,80 ABa	1977,60 ABb α	2388,00 Aa α	1087,20 Bb
Folha	2313,60 Aa α	1614,00 Ab	2211,60 Aa α	2263,20 Aa α
Solo + Folha	2157,60 ABa α	2917,20 Aa α	1701,60 Ba	1443,60 Bab
Testemunha	2970,00 α			
CV (%)	31,04	22,75	20,9	22,44

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

α Médias não diferem da testemunha pelo teste de Dunnett ao nível de 5% de probabilidade.

*Neste primeiro experimento foram utilizados quatro épocas de aplicação.

A aplicação via solo+folha apresentou menos J2 e ovos em 100 cm³ de solo nas épocas de aplicação após a inoculação e semanalmente, estes não diferiram entre si e foram 42,70% e 51,39% inferiores à testemunha, respectivamente. Nas épocas de aplicação antes da inoculação na via solo, aplicações na inoculação pela via foliar, após a inoculação via solo+folha e semanalmente via solo e solo+folha, foram inferiores 42,46%, 45,65%, 42,70%, 63,39% e 51,39% comparado à testemunha. Sendo assim, maior efeito na redução de J2 e ovos por 100 cm³ de solo foi para aplicações semanais via solo e solo+folha. Estes podem ter interferido na eclosão de ovos, o qual pode estar relacionado com a presença de J2 no solo. A eclosão de ovos de nematoides pode ser estimulada por exsudatos das raízes e compostos químicos da rizosfera, além disso, servem para orientar os J2 em direção a raiz, os exsudatos também podem atuar como repelentes ou tóxicos aos nematoides (FARIA et al., 2003; ZHAO et al., 2000).

Segundo Maistrello et al. (2010), redução de J2 e ovos em cada cm³ de solo e por grama de raiz e menor taxa de reprodução foi observado em tomateiro, quando o solo já infestado com *M. javanica* foi tratado duas vezes com tanino, uma no momento do transplante e duas semanas mais tarde, o que demonstra efeito positivo na proteção de plantas com repetidas aplicações de tratamento.

Assim como para massa de ovos e galhas totais, as épocas de aplicação após a inoculação e semanalmente demonstraram maior potencial para controle de J2 e ovos por grama de raiz e em 100 cm³ de solo, sendo assim, foram repetidos num segundo experimento.

De acordo com a Tabela 7.6, o segundo experimento mostra diferenças em relação ao primeiro, para J2 e ovos por grama de raiz na época de aplicação após a inoculação. As vias de aplicação não diferiram entre si na época de aplicação após a inoculação, porém diferiram da testemunha com menos J2 e ovos no interior das raízes. No primeiro experimento (Tabela 7.4), somente a via solo+folha diferiu da testemunha, confirmando assim o efetivo controle da via solo+folha. Na época de aplicação semanalmente, o segundo experimento confirmou os resultados do primeiro, com maior controle para a via solo e solo+folha, estes inferiores 21% e 21,46% em comparação à testemunha.

Tabela 7.6 - Juvenis de segundo estágio (J2) e ovos de *Meloidogyne javanica* por grama de raiz e por 100 cm³ de solo, na qual a planta foi tratada com extrato de *Crambe abyssinica* em diferentes vias e em épocas distintas de aplicação, sendo após a inoculação (uma semana após a inoculação) e semanalmente até aos 45 dias após a inoculação, a testemunha é considerada como tratamento adicional e é representado por plantas inoculadas e não tratadas. Marechal Cândido Rondon, outubro de 2014.*

Vias de aplicação do extrato	J2 e ovos por grama de raiz		J2 e ovos por 100 cm ³ de solo	
	Épocas de aplicação			
	Após a inoculação	Semanalmente	Após a inoculação	Semanalmente
Solo	153,70 Aa	94,41 Ab	1653,60 Aa	921,60 Ba
Folha	129,43 Aa	192,92 Aa α	1156,60 Aa	1029,60 Aa
Solo + Folha	153,23 Aa	89,20 Ab	1307,90 Aa	735,50 Ba
Testemunha	317,18 α		1008,00 ^{ns}	
CV (%)	7,12	6,83	3,79	7,23

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

α Médias não diferem da testemunha pelo teste de Dunnett ao nível de 5% de probabilidade.

*Neste segundo experimento foram utilizadas apenas duas épocas de aplicação.

^{ns} Médias não diferem estatisticamente entre si pela análise de variância.

Os resultados do segundo experimento para J2 e ovos por 100 cm³ de solo (Tabela 7.6), apesar de diferirem entre as épocas de aplicação, com menor população para as vias solo e solo+folha semanal, não houve diferenças estatísticas entre os tratamentos utilizados e a testemunha. Este resultado não confirma os encontrados no primeiro experimento, podendo ser devido às diferenças de temperatura entre os experimentos, como citado anteriormente para massa de ovos.

A viabilidade de massa de ovos é apresentada na Tabela 7.7. A aplicação via solo semanalmente foi a única via que diferiu significativamente da testemunha, inferior 42,33% para ovos viáveis. No entanto, mesmo que a via solo apresente menos ovos viáveis, e conseqüentemente menor população de J2 e ovos por 100 cm³ de solo, como demonstrado na Tabela 7.5 para a via solo semanalmente, o controle também se dá quando menor número de fêmeas produzam massa de ovos, com menor interferência na nutrição da planta, menos sítios de alimentação e conseqüentemente menos J2 e ovos no interior da raiz, como acontece com a aplicação via solo+folha semanalmente. Segundo Javed et al. (2007), menor número de ovos por postura foi observado em tratamentos após a inoculação de *M. javanica* via solo, porém maior o número de massa de ovos, demonstrando assim baixa eficiência de controle.

Tabela 7.7 - Viabilidade de massa de ovos de *Meloidogyne javanica*, na qual a planta de tomateiro foi tratada com extrato de *Crambe abyssinica* em diferentes vias e em épocas distintas de aplicação, sendo após a inoculação (uma semana após a inoculação) e semanalmente até aos 45 dias após a inoculação, a testemunha é considerada como tratamento adicional e é representado por plantas inoculadas e não tratadas. Marechal Cândido Rondon, outubro de 2014.

Vias de aplicação do extrato	J2 eclodidos dos ovos	
	Épocas de aplicação	
	Após a inoculação	Semanalmente
Solo	70,22 Aa α	20,11 Ba
Folha	56,67 Aa α	41,11 Aa α
Solo + Folha	49,33 Aa α	46,89 Aa α
Testemunha	60,33 α	
CV (%)	27,95	21,62

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

^aMédias não diferem da testemunha pelo teste de Dunnett ao nível de 5% de probabilidade.

Fêmeas de *M. javanica* depositaram uma média de 450 ovos por massa de ovos, no entanto, em plantas de soja e feijão de corda tratadas uma única vez via foliar com acibenzolar-S-metil, teria induzido a resistência sistêmica adquirida e o número de ovos caiu para 250, redução de 46%, o que explicaria a reprodução reduzida (CHINNASRI et al., 2003). No presente trabalho, indução de resistência não pode ser o responsável pela redução da viabilidade dos ovos, mas sim pode ser um conjunto de mecanismos que atuaram, pois aplicações via foliar não demonstraram bons resultados para as variáveis estudadas, a via solo foi mais efetivo, por isso podem estar associados mecanismos de indução de resistência e efeito direto sobre o nematoide.

7.4 CONCLUSÃO

Aplicações de extrato hidroalcoólico de crambe via solo+folha semanalmente em tomateiro reduzem massa de ovos, número de galhas e J2 e ovos por grama de raiz e por 100 cm³ de solo de *M. javanica*.

7.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AISSANI, N.; TEDESCHI, P.; MAIETTI, A.; BRANDOLINI, V.; GARAU, V. L.; CABONI, P. Nematicidal activity of allylisothiocyanate from horseradish (*Armoracia rusticana*) roots against *Meloidogyne incognita*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 61, p. 4723-4727, 2013.

ALAM, M.M., AHMAD, M., KHAN, A.M. Effect of organic amendment on the growth and chemical composition of tomato, eggplants and chilli and their susceptibility to attack by *Meloidogyne incognita*. **Plant and Soil**, The Hague, v. 57, p. 231–236, 1980.

BONALDO, S.M.; PASCHOLATI, S.F.; ROMEIRO, R.S. Indução de resistência: noções básicas e perspectivas. In: CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO, R.M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S.F.; RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R.S. **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, v. 13, p. 11-27, 2005.

CAILLAUD, M.C.; DUBREUIL, G.; QUENTIN, M.; PERFUS-BARBEOCH, L.; LECOMTE, P.; ENGLER, J.A.; ABAD, P.; ROSSO, M.N.; FAVERY, B. Root-knot nematodes manipulate plant cell functions during a compatible interaction. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 165, p. 104-113, 2008.

CAMPOS, H.D.; SILVA, J.R.C.; CAMPOS, V.P.; SILVA, L.H.C.P.; COSTA, L.S.A.S.; SILVA, W.J.R. Effect of soil temperature on infectivity and reproduction of *Meloidogyne javanica* and *Heterodera glycines* in soybean cultivars. **Ciência Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 5, p. 900-907, 2011.

CHINNARSI, B.; SIPES, B.S.; SCHMITT, D.P. Effects of acibenzolar-S-methyl application to *Rotylenchulus reniformis* and *Meloidogyne javanica*. **Journal of Nematology**, Hanover, v. 35, n. 1, p. 110-114, 2003.

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

CRUZ, C.D. **Programa Genes: Biometria**. Viçosa: UFV, 2006. 382p.

ENGLER, J.A.; VLEESSCHAUWER, V.; BURSSSENS, S.; CELENZA, J.L.; INZE, D.; MONTAGU, M.V.; ENGLER, G.; GHEYSEN, G. Molecular markers and cell cycle inhibitors show the importance of cell cycle progression in nematode-induced galls and syncytia. **The Plant Cell**, Waterbury, v. 11, p. 793–807, 1999.

FAHEY, J.W.; ZALCMANN, A.T.; TALALAY, P. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. **Phytochemistry**, New York, v.56, p.05-51, 2001.

FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Statistics Division**. Agriculture Data. Roma, 2012. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acesso em: 13 jun. 2015.

FARIA, C.M.D.R.; SALGADO, S.M.L.; CAMPOS, H.D.; RESENDE, M.L.V.; CAMPOS, V.P.; COIMBRA, J.L. Mecanismos de ataque e defesa na interação nematoide-planta. **Revista Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 11, p. 373-410, 2003.

FERRAZ, L.C.C.B.; MONTEIRO, A.R. Nematoides. In: AMORIM, Lilian; RESENDE, Jorge Alberto Marques; BERGAMIM FILHO, Armando. **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. 4 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2011. cap. 13, p. 277-305.

FREITAS, L. G.; NEVES, W. S.; OLIVEIRA, R. D. L. Métodos em nematologia vegetal. In: ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. **Métodos em fitopatologia**. 1. ed. Viçosa: UFV, 2007. p. 253-291.

GARDIANO, C.G.; FERRAZ, S.; LOPES, E.A.; FERREIRA, P.A.; AMORA, D.X.; FREITAS, L.G. Avaliação de extratos aquosos de várias espécies vegetais, aplicados ao solo, sobre *Meloidogyne javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949. **Semina**, Londrina, v. 30, n. 3, p. 551-556, 2009.

HARTMAN, K.M.; SASSER, J. N. Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential host test and perineal pattern morphology. In: BARKER, K.R.; CARTER, C.C.; SASSER, J.N. **An advanced treatise on Meloidogyne**. Methodology, North Carolina: University Graphics, p. 69-77, 1985.

HEWLETT, T.E.; HEWLETT, E.M.; DICKSON, D.W. Response of *Meloidogyne* spp., *Heterodera glycines*, and *Radopholus similis* to tannic acid. **Journal of Nematology**, Hanover, v. 29, p. 737-741, 1997.

IBGE-Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Levantamento sistemático da produção agrícola: pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil**. Rio de Janeiro, v. 29, n. 4, p. 1-18, 2015.

JAVED, N.; GOWEN, S.R.; INAN-UL-HAQ, M.; ANWAR, S.A. Protective and curative effect of neem (*Azadirachta indica*) formulations on the development of root-knot nematode *Meloidogyne javanica* in roots of tomato plants. **Crop Protection**, Amsterdam, v. 26, p. 530–534, 2007.

JAVED, N.; GOWEN, S.R.; EL-HASSAN, S.A.; INAN-UL-HAQ, SHAHIMA, F.; PEMBROKE, B. Efficacy of neem (*Azadirachta indica*) formulations on biology of root-knot nematodes (*Meloidogyne javanica*) on tomato. **Crop Protection**, Amsterdam, v. 27, p. 36-43, 2008.

JENKINS, W.R. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. **Plant Disease Reporter**, St. Paul, v. 48, p. 692, 1964.

JONES, M.G.K.; PAYNE, H.L. Early stages of nematode-induced giant-cell formation in roots of *Impatiens balsamina*. **Journal of Nematology**, Hanover, v. 10, n. 1, p. 70-84, 1978.

LEONI, O.; IORI, R.; PALMIERI, S.; ESPOSITO, E.; MENEGATTI, E.; CORTESI, R.; NASTRUZZI, C. Myrosinase-generated isothiocyanate from glucosinolates: isolation, characterization and *in vitro* antiproliferative studies. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 5, n. 9, p. 1799-1806, 1997.

LOGUERCIO, A. P.; BATTISTIN, A.; VARGAS, A. C.; HENZEL, A.; WITT, N. M. Atividade antibacteriana de extrato hidroalcoólico de folhas de jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skells). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, p. 371-376, 2005.

LOPES, E.A.; FERRAZ, S.; FREITAS, L.G.; FERREIRA, P.F.; AMORA, D.X. Efeito dos extratos aquosos de Mucuna Preta e de Manjeriço sobre *Meloidogyne incognita* e *M. javanica*. **Nematologia Brasileira**. Piracicaba, v. 29, p. 67-74, 2005.

MAISTRELLO, L.; VACCARI, G.; SASANELLI, N. Effect of chestnut tannins on the root-knot nematode *Meloidogyne javanica*. **Helminthologia**, Berlim, v. 47, n. 1, p. 48-57, 2010.

MATTHIESSEN J.N.; SHACKLETON, M.A. Biofumigation: environmental impacts on the biological activity of diverse pure and plant-derived isothiocyanates. **Pest Management Science**, Grã-Bretanha, v. 61, p. 1043-1051, 2005.

MELO, T.A.; SERRA, I.M.R.S.; SILVA, G.S.; SOUSA, R.M.S. Produtos naturais aplicados para manejo de *Meloidogyne incognita* em tomateiros. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 38, n. 3, p. 223-227, 2012.

MOLINARI, S. Molecular aspects of plant-nematode interaction. **Nematologia Mediterrânea**, Cabo, v. 24, p. 139-154, 1996.

NANDAL, S.N.; BHATTI, D.S. Influence of four plant extracts on the hatching of *Meloidogyne javanica* and invasion of host roots. **Nematologia Mediterranea**, Cabo, v. 14, p. 291-294, 1986.

NEVES, W.S.; FREITAS, L.G.; COUTINHO, M.M.; DALLEMOLE-GIARETTA, R.; FABRY, C.F.S.; DHINGRA, O.D.; FERRAZ, S. Ação nematicida de extratos de alho, mostarda, pimenta malagueta, de óleo de mostarda e de dois produtos à base de capsainóides e alil isotiocianato sobre juvenis de *Meloidogyne javanica*, (treub) Chitwood, 1949, em casa de vegetação. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 35, n. 4, p. 255-261, 2009.

OKA, Y.; COHEN, Y.; SPIEGEL, Y. Local and systemic induced resistance to the root-knot nematode in tomato by DL-b-amino-*n*-butyric acid. **Phytopathology**, St. Paul, v. 89, p. 1138-1143, 1999.

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

PAL VIG, A.; RAMPAL, G.; THIND, T.S.; ARORA, S. Bio-protective effects of glucosinolates. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 42, p. 1561-1572, 2009.

RAHMAN, L.; WHITELAW-WECKERT, M.A.; ORCHARD, B. Consecutive applications of brassica green manures and seed meal enhances suppression of *Meloidogyne javanica* and increases yield of *Vitis vinifera* cv Semillon. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 47, p. 195-203, 2011.

RUMBERGER, A.; MARSCHNER, P. 2-Phenylethylisothiocyanate concentration and microbial community composition in the rhizosphere of canola. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 35, p. 445-452, 2003.

SALGADO, S.M.L.; SILVA, L.H.C.P. Potencial da indução de resistência no controle de fitonematóides. In: CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO, R.M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S.F.; RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R.S. **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, v. 13, 2005. p. 155-165.

SALGADO, S.M.L.; RESENDE, M.L.V.; CAMPOS, V.P. Efeito de indutores de resistência sobre *Meloidogyne exigua* do cafeeiro. **Ciência agrotecnológica**. Lavras, v. 31, n. 4, p. 1007-1013, 2007.

SHARMA, N.; TRIPATHI, A. Fungitoxicity of the essential oil of *Citrus sinensis* on post-harvest pathogens. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Seoul, v. 22, p. 587-593, 2006.

SILVA, R.V.; OLIVEIRA, R.D.L.; NASCIMENTO, K.J.T.; RODRIGUES, F.A. Biochemical responses of coffee resistance against *Meloidogyne exigua* mediated by silicone. **Plant Pathology**, Oxford, v. 59, p. 586-593, 2010.

SILVA, R.V.; OLIVEIRA, R.D.L.; FERREIRA, P.S.; FERREIRA, A.O.; RODRIGUES, F.A. Defense responses to *Meloidogyne exigua* in resistant coffee cultivar and non-host plant. **Tropical Plant Pathology**, Viçosa, v. 38, n. 2, p. 114-121, 2013.

STANGARLIN, J.R.; KUHN, O.J.; TOLEDO, M.V.; PORTZ, R.L.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; PASCHOLATI, S.F. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**, Cascavel, v. 10, p. 18-46, 2011.

TAYLOR, A.L.; SASSER, J.N. **Biology, identification and control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* sp.)**. Raleigh, 1978. 111 p.

TRANI, P.E.; NAGAI, H.; PASSOS, F.A. Tomate (estaqueado). In: RAI, J. B.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A.; FURLANI, A. M. C. **Recomendação de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**. Campinas: IAC, 1997. p. 183. (Boletim técnico, 100).

WALKER, J. T. Crambe and rapeseed meal as soil amendments: nematicidal potential and phytotoxic effects. **Crop Protection**, Amsterdam, v. 15, n. 5, p. 433-437, 1996.

WARTON, B. MATTHIESSEN, J.N.; SHACKLETON, M.A. Cross-enhancement: enhanced biodegradation of isothiocyanates in soils previously treated with metham sodium. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 35, p. 1123-1127, 2003.

WESTERICH, J.N.; RODELLA, R.A.; ROSA, J.M.O.; WILCKEN, S.R.S. Alterações anatômicas induzidas por *Meloidogyne enterolobii* (= *M. mayaguensis*) e *Meloidogyne javanica* em tomateiros resistentes a meloidoginose. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 38, n. 3, p. 192-197, 2012.

WU, H.; WANG, C.J.; BIAN, X.W. B.; ZENG, S.Y.; LIN, K.C.; WU, B.; ZHANG, G.A.; ZHANG, X. Nematicidal efficacy of isothiocyanates against root-knot nematode *Meloidogyne javanica* in cucumber. **Crop Protection**, Amsterdam, v. 30, p. 33-37, 2011.

ZHAO, X. SCHMITT, M.; HAWES, M.C. Species-dependent effects of border cell and root tip exudates on nematode behavior. **Phytopathology**, St Paul, v. 90, p. 1239-1245, 2000.

8 CAPÍTULO 5 – CONTROLE DE *Meloidogyne javanica* EM TOMATEIRO POR EXTRATO DE *Crambe abyssinica*

RESUMO

O gênero *Meloidogyne* interfere na produção do tomateiro, e o uso indiscriminado de nematicidas químicos, além de onerar os custos de produção, pode trazer problemas de contaminação ambiental. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de extrato hidroalcoólico na concentração de 250 mg L⁻¹ de folhas de crambe no controle de *Meloidogyne javanica*, com diferentes vias e épocas de aplicação em tomateiro. Foram conduzidos dois experimentos, o primeiro nos meses de abril à junho e o segundo de outubro à dezembro de 2014, em casa de vegetação. No primeiro experimento, as raízes das mudas de tomateiro foram imersas no extrato com posteriores aplicações: via foliar; solo e foliar+solo, em quatro épocas: antes da inoculação; na inoculação; após a inoculação; e semanalmente. No segundo experimento foram utilizadas três vias de aplicação como citado anteriormente, em duas épocas (após a inoculação e semanalmente). Após sete dias do transplante, em ambos os experimentos foram inoculados 2.500 ovos de *M. javanica* por vaso, e aos 45 dias após a inoculação foram feitas as avaliações. Aplicações na época após a inoculação pela via raiz+folha e semanalmente pela via raiz+solo, foram eficientes para reduzir a produção de massas de ovos. Houve redução de 41% e 47% do número de galhas totais para aplicações semanais pelas vias raiz+solo e raiz+solo+folha, respectivamente. No segundo experimento, para a via raiz+solo+folha em aplicações semanais, a produção de massa de ovos e galhas totais foram reduzidas em 61% e 28% respectivamente. Apesar de outras vias e épocas de aplicação também apresentarem resultados positivos na redução do número de juvenis de segundo estágio (J2) e ovos por grama de raiz e por 100 cm³ de solo, aplicações semanais de extrato de crambe via raiz+solo+folha confirmaram seu potencial, em dois experimentos, para controle de *M. javanica* em tomateiro em cultivo protegido.

Palavras-chave: *Solanum lycopersicum* L.. Nematóide de galhas. Massa de ovos. Indução de resistência. Nematóide.

CAPÍTULO 5 – *Meloidogyne javanica* CONTROL IN TOMATO WITH *Crambe abyssinica* EXTRACT

ABSTRACT

The genus *Meloidogyne* interferes on the production of tomato plants, and the indiscriminate use of chemical nematicides, in addition of adding production costs, can bring environmental pollution problems. The objective of this study was to evaluate the effect of hydroalcoholic extract at a concentration of 250 mg L⁻¹ of crambe leaves in the control of *Meloidogyne javanica*, with different routes and application times in tomato plants. Two experiments were carried out, the first one from April to June and the second one from October to December 2014, in greenhouse. In the first experiment, the roots of tomato seedlings were immersed in the extract with later applications: via leaf; soil and leaf+soil, in four periods: before inoculation; on inoculation; after inoculation; and weekly. In the second experiment three routes of administration were used as previously mentioned, in two periods (after inoculation and weekly). Seven days after the transplantation in both experiments 2,500 eggs of *M. javanica* per pot were inoculated, and 45 days after inoculation evaluations were made. Applications after inoculation via root+leaf and weekly via root+soil were efficient to reduce the production of egg masses. There was a reduction of 41% and 47% of the total number of galls for weekly applications via root+soil and root+soil+leaf respectively. In the second experiment weekly applications via root+soil+leaf, the mass production of total eggs and galls were reduced by 61% and 28% respectively. Although other methods and application times also present positive results in reducing the number of second stage juveniles (J2) and eggs per gram of root and 100 cm³ of soil, weekly applications of crambe extract via root+soil+leaf confirmed their potential, in two experiments to control *M. javanica* on tomato in greenhouses.

Keywords: *Solanum lycopersicum* L. Root-knot nematodes. Mass of eggs. Induction of resistance. Nematode.

8.1 INTRODUÇÃO

A produção de hortaliças tem grande importância social e econômica, pois, além da produção de alimento, gera emprego e renda, fortalece a agricultura familiar, reduz o êxodo rural e promove o desenvolvimento regional (CARVALHO et al., 2014). O tomate (*Solanum lycopersicum* L.) é a hortaliça mais popular na refeição do brasileiro (BELAN et al., 2011), e a área cultivada vem aumentando nos últimos anos (IBGE, 2015). Entre os problemas que afetam a produção do tomateiro estão as doenças e, dentre estas, estão os fitonematoides, que podem causar danos consideráveis.

Os nematoides das galhas (*Meloidogyne* spp.) são encontrados em regiões tropicais e temperadas e estão entre os patógenos mais prejudiciais no mundo (TRUDGILL; BLOK, 2001). Este gênero promove alterações drásticas no desenvolvimento da raiz por induzir e manter as células gigantes que são fonte de nutrientes para os nematoides (CAILLAUD et al., 2008). As células gigantes são consequência da hiperplasia e hipertrofia celular e estão associadas aos sintomas de galhas e redução no volume do sistema radicular, e como consequência a planta absorve menos água e nutrientes, resultando em baixos rendimentos da cultura (FERRAZ; MONTEIRO, 2011). Quando o juvenil de segundo estágio (J2) infecta uma raiz e estabelece seu sítio de alimentação, ocorre uma reprogramação das células, correlacionada com atividade de genes no metabolismo, síntese de proteínas, divisão celular, e transporte e transdução de sinal (GHEYSEN; FENOLL, 2002).

A planta não permite de maneira passiva a entrada do patógeno, pois possui sistema de defesa, incluindo proteínas relacionadas à patogênese, fitoalexinas e compostos fenólicos entre outros (STANGARLIN et al., 2011). Para ativação dos mecanismos de defesa da planta no controle de fitonematoides podem ser utilizados indutores abióticos como bióticos (SALGADO; SILVA, 2005).

Nematicidas químicos são utilizados no controle de fitonematoides, porém o uso contínuo pode reduzir sua eficiência, tornar os nematoides resistentes, além dos impactos negativos para o ambiente e sociedade (JAVED et al., 2008; ZHANG et al., 2012). Dessa forma, há uma crescente procura por desenvolvimento de novos nematicidas naturais visando a substituição parcial ou total de nematicidas químicos (AISSANI et al., 2013). A cultura do tomate é altamente dependente do uso de agrotóxicos, por isso, é necessário o estudo de medidas alternativas e entender desde a aplicabilidade quanto ao modo de ação dos extratos vegetais, para que possam ser utilizados de maneira eficiente no manejo das doenças (SCHWAN-ESTRADA, 2009). Nesse sentido, várias são as pesquisas com metabólitos

secundários de plantas contra nematoides das galhas (DIAS-ARIEIRA et al., 2003; LOPES et al., 2005; NTALLI et al., 2012; OKA et al., 2006;).

Extratos vegetais tem sido utilizados com várias formas e épocas de aplicação para o controle de nematoides, com efeito protetor ou curativo, indutor de resistência ou com efeito direto sobre o patógeno (CHINNASRI et al., 2003; JAVED et al., 2008; MOLINARI; LOFFREDO, 2006). No entanto, vários estudos tem mostrado a eficiência do controle de nematoides correlacionados com glicosinolatos em plantas, principalmente plantas pertencentes à família Brassicaceae (AISSANI et al., 2013; WALKER et al., 1996; WU et al., 2011). O crambe (*Crambe abyssinica* Hochst) pertence à esta família e contém glicosinolatos (LAZZERI et al., 1994). Porém, poucos são os estudos envolvendo o crambe no controle de fitonematoides, assim como, poucos são os estudos envolvendo ativação de mecanismos de resistência com brássicas.

Portanto, em decorrência da contaminação ambiental promovida por nematicidas químicos, devido às aplicações via solo que podem contaminar as águas subterrâneas, além de alguns deles poderem ser absorvidos pelas plantas, e trazer consequências negativas à sociedade (OKA et al., 2010), e a demanda dos consumidores por alimentos seguros, associado a utilidade benéfica dos compostos presentes nas brássicas e aos poucos estudos com crambe, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de extrato de crambe no controle de *Meloidogyne javanica*, com diferentes vias e épocas de aplicação em tomateiro.

8.2 MATERIAL E MÉTODOS

8.2.1 Condução do Experimento

O experimento foi conduzido no período de abril à junho de 2014 (primeiro experimento) e a repetição do experimento (segundo experimento) foi conduzido no período de outubro à dezembro de 2014. Estes foram conduzidos em casa de vegetação climatizada localizado no Complexo de Controle Biológico e Cultivo Protegido Prof. Dr. Mário César Lopes, pertence a Universidade Estadual do Oeste do Paraná- UNIOESTE, *campus* Marechal Cândido Rondon, Paraná

Para ambos os experimentos o delineamento experimental foi em blocos casualizados com cinco repetições. O extrato utilizado foi o hidroalcoólico 250 mg L⁻¹ preparado segundo a metodologia proposta por Loguercio et al. (2005). As folhas de crambe foram coletadas em estágio vegetativo, 35 dias após emergência da cultura (DAE) no município de Cascavel-PR,

com coordenadas de latitude 24°57'21" sul e longitude 53°27'19" oeste, altitude de 781 metros, e foram secas em estufa a 45 °C por 48 h, trituradas em moinho de facas e passadas em peneiras de 48 Mesh, obtendo-se o pó desta planta, e armazenado em recipiente fechado no escuro a temperatura ambiente até o momento de preparo dos extratos.

O extrato por solução hidroalcoólica (70% v/v álcool etílico-C₂H₆O), foi estocada à temperatura ambiente, protegida da luz, por um período de 15 dias, após foi filtrado em papel filtro Whatman n° 1, em seguida, roto-evaporados à vácuo em temperatura de aproximadamente 50 °C, e ressuspensão em 1000 mL de água destilada com 0,6% de Tween 20.

Foram utilizadas mudas de tomateiro Santa Cruz Kada (Paulista) com 25 dias após a semeadura (DAS), em bandeja de poliestileno com substrato Plantmax e transplantadas em vasos com capacidade de três litros preenchidos com solo esterilizado por autoclavagem à 120 °C/1 atm durante 1 hora, na mistura 3:2:1 (solo:areia:matéria orgânica). Após foi enviada uma amostra de solo para análise química no Laboratório de Química Ambiental e Instrumental da Unioeste, para posterior correção conforme recomendação de Trani, Nagai e Passos (1997).

O inóculo foi obtido de tomates infectados cultivados em casa de vegetação e identificados com base na configuração da região perineal (HARTMAN; SASSER, 1985).

8.2.2 Variáveis Analisadas

As variáveis foram analisadas 45 dias após inoculação, com o término do experimento. Após a separação das raízes do solo, estas foram lavadas e secas em temperatura ambiente para determinação da massa fresca da raiz, posterior armazenamento em sacos plásticos tanto as raízes como o solo separados em temperatura próxima aos 4 °C.

8.2.2.1 Massa de Ovos e Galhas Totais nas Raízes

Para verificar a existência de massa de ovos nas raízes, estas foram coradas com Floxina B à 15 mg L⁻¹ durante 20 min, após lavadas para tirar o excesso de corante (TAYLOR; SASSER, 1978), secas com papel toalha e contados galhas com massa de ovos e sem massa de ovos com auxílio de lupa de mesa. O número de galhas totais foi quantificado visualmente por contagem com auxílio de lupa de mesa.

8.2.2.2 Número de Ovos e Juvenis de Segundo Estádio (J2) por grama de raiz

Para extração de ovos e nematoides das raízes foi utilizado a metodologia de Freitas et al. (2007). As raízes foram cortadas e trituradas em liquidificador por 20 seg, vertido sobre peneira de 0,427 mm de abertura de malha (48 Mesh) acoplada na peneira de 0,037 mm de abertura de malha (400 Mesh), nesta os nematoides foram retidos e o conteúdo recolhido em tubos de centrífuga e submetidos ao método de flotação centrífuga em solução de sacarose. Os ovos e J2 retidos na peneira de 400 Mesh foram transferidos para lâmina de Peters e quantificado.

8.2.2.3 Número de Ovos e J2 por 100 cm³ de Solo

O método flotação centrífuga em solução de sacarose foi empregado para extração de ovos e nematoides do solo (JENKIS, 1964). O procedimento correspondeu com a extração de 100 cm³ de solo, peneiramento à 0,427 mm de abertura de malha (48 Mesh) acoplada na peneira de 0,037 mm de abertura de malha (400 Mesh), nesta os nematoides foram retidos e o conteúdo recolhido em tubos de centrífuga e submetidos a centrifugação em solução de sacarose com densidade de 1,15 grama cm³. Os ovos e J2 retidos na peneira de 400 Mesh foram transferidos para lâmina de Peters e quantificado.

8.2.3 Primeiro Experimento

O esquema fatorial (3x4+1) foi utilizado, sendo o extrato primeiramente aplicado via sistema radicular e posteriormente em três diferentes vias na planta: via solo, via foliar e solo+foliar, em quatro épocas de aplicação: 1) antes da inoculação (três dias após o transplante das mudas); 2) na inoculação (sete dias após o transplante); 3) após a inoculação (uma semana após a inoculação); e 4) semanalmente até aos 45 dias após a inoculação, totalizando nove aplicações (incluindo todas as épocas de aplicação citadas anteriormente) e um tratamento adicional, testemunha inoculada e não tratada.

As plantas foram tratadas com fungicida (Trifloxistrobina+ Tebuconazol (75 + 150 g i.a. ha⁻¹)) devido a presença da mancha-de-estenfílio, causada pelo fungo *Stemphyllium* sp., 15 dias após o transplante, com 3 dias de diferença entre a aplicação do tratamento com o extrato, e a outra aplicação de fungicida foi 15 dias após a primeira aplicação.

O extrato primeiramente foi aplicado via sistema radicular em todas as plantas exceto para a testemunha, no momento do transplante mudas tiveram suas raízes mergulhadas por um período aproximado de 3 seg e transplantadas nos vasos; posteriormente as plantas com tratamento via foliar, tiveram suas folhas pulverizadas com borifador na parte adaxial até ponto de escorrimento, para não entrar em contato com o solo, o vaso foi coberto com papel laminado e jornal, para que a aspersão não entrasse em contato com outras plantas estes vasos foram retirados e isolados, plantas tratadas via solo receberam 30 mL do extrato por vaso, correspondendo à 1% do v/v. Todos os tratamentos foram efetuados no período da manhã. Após sete dias do transplante foi efetuada a inoculação de 2.500 ovos e 513 J2 por vaso de *M. javanica*, por meio de perfurações ao redor das raízes com profundidade de 5 cm.

Para análise dos dados foi realizado o teste de normalidade de Lilliefors à 5% de probabilidade, em todos os dados foi aplicado o teste Q, ficando com quatro repetições, e ainda na ausência de normalidade que foi verificado para massa de ovos e J2 e ovos por 100 cm³ de solo os dados foram transformados em $\sqrt{x + 0,5}$ e para ovos e J2 por grama de raiz os dados foram transformados em $\log(x+1)$. Posteriormente, realizou-se a análise de variância e as médias referentes aos tratamentos foram submetidas ao teste de médias de Tukey, e quando o tratamento adicional mostrava-se significativo na análise de variância utilizou-se um teste adicional, o Dunnett. O software estatístico Genes (CRUZ, 2006) foi utilizado.

8.2.4 Segundo Experimento

Após análise dos dados do primeiro experimento, foi conduzido um segundo experimento para confirmação das melhores épocas de aplicação. Utilizou-se o esquema fatorial (3x2+1), sendo o extrato aplicado via sistema radicular e nas três diferentes partes da planta, assim como no primeiro experimento, quanto as épocas de aplicação foram as seguintes: 1) após inoculação (uma semana após a inoculação); e 2) semanalmente (inclui as aplicações: três dias após o transplante das mudas; sete dias após o transplante; uma semana após a inoculação e semanalmente até aos 45 dias após a inoculação, totalizando 9 aplicações). Foram inoculados aproximadamente 2.500 ovos e 356 J2 por vaso. As mudas foram tratadas com fungicida (Trifloxistrobina+ Tebuconazol (75 + 150 g i.a. ha⁻¹)) devido a ocorrência mancha-de-estenfílio, oito dias antes do transplante.

Para análise dos dados foi realizado o teste de normalidade de Lilliefors à 5% de probabilidade, em todos os dados foi aplicado o teste Q, ficando com quatro repetições. Na ausência de normalidade os dados foram transformados em $\log(x+1)$ e $\sqrt{x + 0,5}$, até encontrar

normalidade. Posteriormente, realizou-se a análise de variância e as médias referentes aos tratamentos foram submetidas ao teste de médias de Tukey, e quando o tratamento adicional mostrava-se significativo na análise de variância utilizou-se um teste adicional, o Dunnett. O software estatístico Genes (CRUZ, 2006) foi utilizado.

8.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A massa de ovos de *M. javanica* foi menor que a testemunha apenas para algumas vias de duas épocas de aplicação, após a inoculação e semanalmente (Tabela 8.1). Após a inoculação as vias raiz+folha e raiz+solo+folha foram inferiores que a testemunha em 24,50% e 34,17% respectivamente. Já, para a época semanal as vias com menos massa de ovos foram raiz+solo com 27,33% e via raiz+solo+folha com 42,77% comparado à testemunha, apesar destes não diferirem entre si, esta última via apresentou 15,44% à menos de massa de ovos comparado com a via raiz+solo, e 8,60% inferior a via raiz+solo+folha da época após a inoculação. Sendo assim, aplicações sucessivas e desde o início de cultivo até o final, via solo e via foliar juntos associados ao tratamento via raiz, aumentam a proteção do tomateiro, por mecanismos de indução de resistência e/ou por efeito direto.

Tabela 8.1 - Massa de ovos em raízes de tomateiro inoculados com *Meloidogyne javanica*, na qual as raízes das plantas de tomateiro foram tratadas com extrato de *Crambe abyssinica*, e as mesmas plantas receberam o extrato em diferentes vias e em épocas distintas de aplicação, sendo antes da inoculação (três dias após o transplante das mudas); na inoculação (sete dias após o transplante); após a inoculação (uma semana após a inoculação); e semanalmente até aos 45 dias após a inoculação (incluindo as demais aplicações), o tratamento adicional é representado pela testemunha inoculada e não tratada. Marechal Cândido Rondon, abril de 2014.*

Vias de aplicação do extrato	Épocas de aplicação			
	Antes da inoculação	Na inoculação	Após a inoculação	Semanalmente
Raiz + Solo	259,00 Ab α	297,25 Aa α	293,25 Aa α	219,00 Ab
Raiz + Folha	498,25 Aa α	386,50 Aa α	240,50 Bab	393,75 Aa α
Raiz + Solo + Folha	269,75 ABb α	314,75 Aa α	180,50 BCb	135,75 Cb
Testemunha	416,50 α			
CV (%)	15,44	6,07	12,82	7,62

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

^aMédias não diferem da testemunha pelo teste de Dunnett ao nível de 5% de probabilidade.

*Neste primeiro experimento foram utilizados quatro épocas de aplicação.

Vários compostos estão envolvidos nos mecanismos de indução de resistência à nematoides em plantas, tais como, compostos fenólicos, lignina, suberina, ácido clorogênico, fitoalexinas, isoflavonóides e cumarinas (MOLINARI, 1996). Superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foram produzidos como mecanismo de defesa contra *Meloidogyne*, pois, são tóxicos aos mesmos (MELILLO et al., 2006). No presente trabalho, aplicações do extrato após a inoculação via raiz+folha, podem ter apresentado ativação de mecanismos de resistência sistêmica, porém, melhor controle foi quando associado às vias de aplicação.

Oka e Cohen (2001) verificaram que aplicações via foliar de DL- β -amino-*n*-butirico (BABA) contra *Meloidogyne* sp. em trigo e cevada, reduziu o número de massa de ovos. Estes mesmos autores observaram correlação negativa entre número de aplicações foliares (iniciando dois dias antes da inoculação e com intervalos de dez dias) e o número de cistos de *Heterodera avenae* em mudas de trigo e cevada tratadas com BABA. Esses resultados contribuem com o presente trabalho, para tomateiros que receberam aplicações do extrato via foliar, tanto em aplicações após a inoculação como para semanalmente, pois, com mais aplicações não houve efetivo controle e após a inoculação foi verificado controle, possivelmente uma única aplicação é suficiente para induzir resistência, mais aplicações podem favorecer o desenvolvimento do nematoide.

A redução da taxa populacional de *Meloidogyne* spp. em canavial foi conseguida pela adoção de um conjunto de tratamentos do que cada um isolado, mesmo com o uso de nematicida químico, foi necessário adotar outros tratamentos em conjunto, como extrato de nim aplicado no solo ou calcário, uma vez que, indutores de resistência como acibenzolar-S-metil (ASM) aplicados aos dois e quatro meses após o plantio de canavial em solo contaminado com *Meloidogyne* spp. não promoveu controle da população (CHAVES et al., 2012). Estes resultados corroboram com o presente trabalho, pois quando combinado aplicações via raiz+solo+folha os resultados foram mais expressivos, e reduzindo a massa de ovos consequentemente reduz a população.

De acordo com a Tabela 2, apenas as aplicações via raiz+solo e raiz+solo+folha semanalmente diferiram da testemunha, com redução de galhas nas raízes de tomateiro em 41% e 47,75%, respectivamente, e estas não diferiram entre si. Aplicações via foliar não diferiram da testemunha em todas as épocas testadas. Estes resultados corroboram com os encontrados por Lopes et al. (2005), nos quais aplicações via foliar de extratos de folhas e sementes de mucuna preta e folhas de manjeriço não afetaram a altura e massa fresca da parte aérea de tomateiro, assim como o número de ovos por sistema radicular e o número de galhas induzidas por *M. javanica*. Neste mesmo trabalho, a aplicação dos extratos ao solo reduziu apenas o

número de ovos, o que levou os autores a suporem que a degradação pela microbiota do solo pode ter afetado a eficiência dos extratos aplicados ao solo. Esse fato também pode ter ocorrido no presente trabalho para a aplicação via solo, a qual necessitou de repetidas aplicações.

Tabela 8.2 - Galhas totais em raízes de tomateiro inoculados com *Meloidogyne javanica*, na qual as raízes das plantas de tomateiro foram tratadas com extrato de *Crambe abyssinica*, e as mesmas plantas receberam o extrato em diferentes vias e em épocas distintas de aplicação, sendo antes da inoculação (três dias após o transplante das mudas); na inoculação (sete dias após o transplante); após a inoculação (uma semana após a inoculação); e semanalmente até aos 45 dias após a inoculação (incluindo as demais aplicações), o tratamento adicional é representado pela testemunha inoculada e não tratada. Marechal Cândido Rondon, abril de 2014.*

Vias de aplicação do extrato	Épocas de aplicação			
	Antes da inoculação	Na inoculação	Após a inoculação	Semanalmente
Raiz +Solo	542,75 Ab α	474,00 Aa α	502,25 Aa α	350,25 Ab
Raiz + Folha	751,50 Aa α	553,75 ABa α	549,00 Ba α	588,25 ABa α
Raiz + Solo + Folha	530,75 Ab α	561,50 Aa α	437,50 ABa α	310,25 Bb
Testemunha	593,75 α			
CV (%)	22,63	8,39	10,91	25,43

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

^aMédias não diferem da testemunha pelo teste de Dunnett ao nível de 5% de probabilidade.

*Neste primeiro experimento foram utilizados quatro épocas de aplicação.

Segundo Almeida et al. (2012), extratos de diferentes espécies vegetais (nim, urtiga e mamona) e preparados com diferentes metodologias, foram aplicados via solo, e promoveram redução do número de galhas em tomateiro inoculados com ovos/juvenis de *M. javanica*, tornando a planta menos atrativa para os nematoides e reduzindo o parasitismo, de forma nematicida, nematostática, reforçando a hipótese de que metabólitos de plantas podem apresentar atividade biocida. Acredita-se que no presente trabalho, as aplicações semanais que contemplem o solo como via, tenham apresentado também atividade nematicida.

Na época de aplicação após a inoculação, não houve diferença entre as vias de aplicação e a testemunha, porém, nesta mesma época, houve redução do número de massa de ovos para as vias raiz+folha e raiz+solo+folha, sendo assim, pode-se inferir que o extrato atuou na reprodução, uma vez que sítios de alimentação foram induzidos. De acordo com Campos et al. (2011), *M. javanica* pode penetrar nas raízes e formar sítios de alimentação, porém, sem garantia que se reproduzirá, pois, as condições nutricionais influenciam na reprodução. O contínuo estímulo do nematoide para indução e manutenção das células gigantes é necessário,

caso contrário as células atrofiam-se (REDDIGARI et al., 1985). Zanella et al. (2005), observaram que avaliações baseadas exclusivamente no número de galhas não refletem a reprodução do nematoide, podendo ocorrer galhas com poucas massas de ovos, pois, nem sempre o maior número de galhas permitirá maior reprodução do nematoide.

As aplicações nas épocas antes da inoculação e na inoculação, não reduziram massa de ovos e galhas totais (Tabelas 8.1 e 8.2). Na época antes da inoculação, talvez devido as mudas de tomateiro estarem ainda em período de adaptação, pode não ter havido o reconhecimento do eliciador e sinalização na planta. Aplicações do extrato na inoculação, o que pode ter ocorrido é a falta de tempo necessário entre a indução e a inoculação, na qual o nematoide venceu as barreiras da planta e desenvolveu seu ciclo. Outra hipótese pode ser devido ao inóculo de *M. javanica* ser praticamente composto por ovos, em que diferentes estádios de embriogênese possibilitam a eclosão dos juvenis ao longo do tempo de condução do experimento.

Segundo Salgado et al. (2007), aplicação de ASM independente da época não diferiu da testemunha para número de galhas, fator de reprodução e população de *M. exigua* em cafeeiro. Os autores atribuíram tal fato ao inóculo, por apresentar diferentes estádios de embriogênese, recomendando o uso de juvenis (J2) ao invés de ovos, uma vez que a fase de penetração e início da formação do sítio de alimentação nas raízes, poderia coincidir com a fase de máximo efeito do ASM. No entanto, Silva et al. (2002) desenvolveram um trabalho com aplicações de ASM a cada sete dias em tomateiro inoculado somente com ovos, e observaram redução da massa de ovos e galhas de *Meloidogyne* sp.

Nematoides das galhas podem induzir mudanças de longo prazo na organização do citoesqueleto em células gigantes. Durante a expansão das células, o citoesqueleto exibe um grande número de feixes de actina distribuídos aleatoriamente, microtúbulos e microfilamentos. Tratamentos químicos que bloqueiam a dinâmica do citoesqueleto, resultando na paralisação do desenvolvimento de nematoides (ENGLER et al., 2005).

As épocas que apresentaram efeito sobre massa de ovos foi após a inoculação e semanalmente, e sobre galhas totais semanalmente, portanto, estas épocas foram repetidas num segundo experimento para confirmação do efeito sobre *M. javanica* em tomateiro.

No segundo experimento, o menor número de massa de ovos foi observado somente na via raiz+solo+folha quando aplicado semanalmente, com redução de 60,95% comparado à testemunha (Tabela 8.3). Podendo assim dizer, que provavelmente houve efeito indutor de resistência associado ao efeito direto nos nematoides. Aplicações de extratos vegetais de *Tagetes patula* tanto na parte aérea como no solo, podem ativar mecanismos de defesa em raízes de tomateiro contra *M. incognita* (FRANZENER et al., 2007).

Tabela 8.3 - Massa de ovos (MO) e galhas totais (GT) em raízes de tomateiro inoculados com *Meloidogyne javanica*, na qual as raízes das plantas de tomateiro foram tratadas com extrato de *Crambe abyssinica*, e as mesmas plantas receberam o extrato em diferentes vias e em épocas distintas de aplicação, sendo após a inoculação (uma semana após a inoculação); e semanalmente até aos 45 dias após a inoculação, o tratamento adicional é representado pela testemunha inoculada e não tratada. Marechal Cândido Rondon, outubro de 2014.*

Vias de aplicação do extrato	MO		GT	
	Épocas de aplicação			
	Após a inoculação	Semanalmente	Após a inoculação	Semanalmente
Raiz + Solo	407,25 Aa α	340,50 Aa α	557,25 Aa α	424,00 Aa α
Raiz + Folha	261,75 Aa α	378,50 Aa α	496,25 Aa α	405,25 Aa α
Raiz + Solo + Folha	415,50 Aa α	197,00 Ba	508,50 Aa α	286,50 Ba
Testemunha	504,50 α		543,25 α	
CV (%)	36,15	40,42	11,98	17,23

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

^aMédias não diferem da testemunha pelo teste de Dunnett ao nível de 5% de probabilidade.

*Neste segundo experimento foram utilizadas apenas duas épocas de aplicação.

O número de galhas totais foi inferior à testemunha no segundo experimento somente para a via raiz+solo+folha quando as aplicações foram semanais, inferior 27,95% quando comparado à testemunha (Tabela 8.3). Confirmando assim, que o extrato de crambe deve ser aplicado desde o início de cultivo até o final, com intervalos de uma semana, e em todas as vias de aplicação, para assim, juntar os possíveis efeitos gerados da indução de resistência e/ou efeito direto. De acordo com Dias-Arieira et al. (2013), alguns fatores devem ser considerados para a indução de resistência contra fitonematoides, genética da planta hospedeira, patossistema envolvido e a necessidade de reativar os mecanismos de defesa, tendo em mente o efeito temporário do indutor.

De acordo com Williamson e Kumar (2006), mecanismos de resistência podem ocorrer em plantas contra nematoides, como a morte celular próximo a extremidade anterior do nematoide, afetando o desenvolvimento dos sítios de alimentação, assim como pode ocorrer após iniciada a alimentação, atrofiando ou promovendo um desenvolvimento anormal do sítio de alimentação.

Alil isotiocianato e alil nitrila, derivados de glicosinolatos presentes em brássicas, e importantes no controle de patógenos do solo, foram avaliados quanto a sua persistência, ou seja, expressão da atividade biológica em solo. Estes foram influenciados por vários fatores que resultaram em conversão química ou adsorção aos constituintes do solo. O alil foi afetado negativamente por carbono orgânico e nitrogênio total, o aumento da temperatura afetou

negativamente a vida útil, na temperatura de 20 °C a vida útil foi de aproximadamente quatro dias, porém foi afetado positivamente com o aumento da umidade, já o desaparecimento de alil nitrila no solo ocorreu mais rapidamente em solos úmidos, concentrações mais elevadas de carbono inorgânico e temperaturas baixas. Portanto, a dissipação de ambos os compostos no solo, tem implicações importantes no controle de patógenos no solo, devendo apresentar várias fumigações ou aplicações no solo (BOREK et al., 1995). Talvez, seja esse o motivo que faz com que as aplicações via solo devem ser repetidas no presente trabalho.

De acordo com a Tabela 8.4, a aplicação via raiz+solo apresentou menos J2 e ovos de *M. javanica* por grama de raiz na época de aplicação na inoculação, e inferior 30,49% comparado à testemunha. Porém, a época após a inoculação com a via raiz+solo não diferiu estatisticamente com média intermediária e inferior 25,61% comparado à testemunha. Apesar da época semanal ser intermediário e não diferir estatisticamente da época na inoculação, não diferiu da testemunha. Os mecanismos envolvidos no controle de *M. javanica* para a via raiz+solo em aplicações semanais, deve estar relacionado a nutrição, pois, estes apresentaram menos massa de ovos e galhas.

Tabela 8.4 - Ovos e juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* por grama de raiz, na qual as raízes das plantas de tomateiro foram tratadas com extrato de *Crambe abyssinica*, e as mesmas plantas receberam o extrato em diferentes vias e em épocas distintas de aplicação, sendo antes da inoculação (três dias após o transplante das mudas); na inoculação (sete dias após o transplante); após a inoculação (uma semana após a inoculação); e semanalmente até aos 45 dias após a inoculação (incluindo as demais aplicações), o tratamento adicional é representado pela testemunha inoculada e não tratada. Marechal Cândido Rondon, abril de 2014.*

Vias de aplicação do extrato	Épocas de aplicação			
	Antes da inoculação	Na inoculação	Após a inoculação	Semanalmente
Raiz +Solo	34,92 Aa α	13,76 Bb	15,98 ABb	25,77 ABab α
Raiz + Folha	51,63 Aa α	40,44 Aa α	37,89 Aa α	47,20 Aa α
Raiz + Solo + Folha	68,85 Aa α	49,35 ABa α	36,21 ABab α	19,75 Bb
Testemunha	44,66 α			
CV (%)	9,11	16,48	8,54	11,49

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

α Médias não diferem da testemunha pelo teste de Dunnett ao nível de 5% de probabilidade.

*Neste primeiro experimento foram utilizados quatro épocas de aplicação.

O pó de pequi moído foi testado em tomateiro, este foi incorporado ao solo sete dias antes do plantio e a inoculação de ovos de *M. javanica* foi após o plantio do tomateiro. Os

autores atribuíram a redução de massa de ovos e galhas, aos compostos químicos do pequi, que podem ter promovido menor eclosão de J2, ou conter atrativos ao J2 desorientando-os, dificultando a localização das raízes, com redução ou atraso na penetração de J2 (RIBEIRO et al., 2012).

Corroborando com o presente estudo para a época de aplicação após a inoculação com a via raiz+solo, Mateus et al. (2014), observaram que extratos vegetais de gervão e mulungu aplicados via solo uma única vez após a inoculação de tomateiro com ovos de *M. incognita*, reduziram o número de ovos por sistema radicular, interferindo na multiplicação do nematoide.

Rahman et al (2011) observaram que a população crescente de *M. javanica* em raízes de videira tratadas com farinha de sementes de brássicas por dois a três anos consecutivos, aumentou a suscetibilidade, que provavelmente foi devido a absorção de aleloquímicos pelas raízes ocasionando maior população de J2 nas raízes.

Ainda na Tabela 8.4, a aplicação via raiz+folha não diferiu da testemunha em nenhuma das épocas de aplicação estudadas. A aplicação via raiz+solo+folha diferiu da testemunha apenas para a época de aplicação semanal, inferior 20,73%. Este tratamento pode ter efeito na eclosão de ovos e/ou efeito inibitório da penetração, ocasionando menos J2 dentro da raiz, reduzindo a formação de sítios de alimentação e resultando em menor reprodução. A penetração de J2 de nematoides endoparasitas sedentários pode ocorrer, mas a planta não hospedar o nematoide, pois outros eventos precisam ocorrer para o sucesso do parasitismo (FARIA et al., 2003).

As vias de aplicação nas épocas da inoculação e após a inoculação diferiram da testemunha, com menos J2 e ovos por 100 cm³ de solo e não diferiram entre si (Tabela 8.5). As aplicações semanais via raiz+solo e raiz+solo+folha, reduziram J2 e ovos por 100 cm³ de solo em 25,93% e 34% em comparação com a testemunha, respectivamente. Talvez um efeito repelente e/ou nematicida seja o mecanismo envolvido, por efeito direto do extrato no nematoide ou por liberação de exsudatos radiculares. Modificações bioquímicas ocorridas em plantas após serem induzidas a resistência, podem acarretar em alterações na natureza dos exsudatos radiculares e podem atrair ou repelir o nematoide (SALGADO; SILVA, 2005).

Tabela 8.5 - Ovos e juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica* por 100 cm³ de solo, na qual as raízes das plantas de tomateiro foram tratadas com extrato de *Crambe abyssinica*, e as mesmas plantas receberam o extrato em diferentes vias e em épocas distintas de aplicação, sendo antes da inoculação (três dias após o transplante das mudas); na inoculação (sete dias após o transplante); após a inoculação (uma semana após a inoculação); e semanalmente até aos 45 dias após a inoculação (incluindo as demais aplicações), o tratamento adicional é representado pela testemunha inoculada e não tratada. Marechal Cândido Rondon, abril de 2014.*

Vias de aplicação do extrato	Épocas de aplicação			
	Antes da inoculação	Na inoculação	Após a inoculação	Semanalmente
Raiz + Solo	3228,00 Aa α	1716,00 Ba	1405,20 Ba	1632,00 Bb
Raiz + Folha	2376,00 Aab α	1984,80 Aa	1207,20 Ba	2430,00 Aa α
Raiz + Solo + Folha	2204,40 Ab α	1542,00 ABa	854,40 Ca	1305,60 BCb
Testemunha	2970,00 α			
CV (%)	9,34	11,28	11,69	11,93

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

^aMédias não diferem da testemunha pelo teste de Dunnett ao nível de 5% de probabilidade.

*Neste primeiro experimento foram utilizados quatro épocas de aplicação.

A aplicação via raiz+solo não apresentou diferença entre as épocas testadas, exceto para antes da inoculação que apresentou maior população no solo. Já, para a aplicação via raiz+folha, a única época de aplicação que diferiu com menos população no solo foi após a inoculação, e inferior 36,09% comparado à testemunha. Para a aplicação via raiz+solo+folha, as épocas que reduziram o número de J2 e ovos por 100 cm³ de solo foram, na inoculação inferior 28,10%, após a inoculação inferior 46,63% e semanalmente com 33,97% a menos comparado com a testemunha, porém semanalmente não diferiu estatisticamente da época após a inoculação.

No segundo experimento (Tabela 8.6), as únicas vias de aplicação que diferiram da testemunha para J2 e ovos por grama de raiz foram raiz+solo e raiz+solo+folha aplicados semanalmente. Sendo que, raiz+solo foi intermediário e inferior 14,57% em comparação à testemunha, enquanto que a via raiz+solo+folha apresentou menos J2 e ovos por grama de raiz e inferior 20,65% comparado à testemunha.

A população de J2 e ovos por 100 cm³ de solo foi inferior à testemunha somente na via raiz+solo+folha quando aplicados semanalmente, com redução de 11,82%.

Tabela 8.6 - Juvenis de segundo estágio (J2) e ovos de *Meloidogyne javanica* por grama de raiz e 100 cm³ de solo, na qual as raízes das plantas de tomateiro foram tratadas com extrato de *Crambe abyssinica*, e as mesmas plantas receberam o extrato em diferentes vias e em épocas distintas de aplicação, sendo após a inoculação (uma semana após a inoculação); e semanalmente até aos 45 dias após a inoculação, o tratamento adicional é representado pela testemunha inoculada e não tratada. Marechal Cândido Rondon, outubro de 2014.*

Vias de aplicação do extrato	J2 e ovos por grama de raiz		J2 e ovos por 100 cm ³ de solo	
	Épocas de aplicação			
	Após a inoculação	Semanalmente	Após a inoculação	Semanalmente
Raiz +Solo	253,40 Aa α	135,67 Bab	1104,00 Aa α	1478,40 Aa α
Raiz + Folha	339,94 Aa α	293,18 Aa α	1107,60 Aa α	1112,40 Aa α
Raiz + Solo + Folha	198,57 Aa α	92,83 Bb	1094,40 Aa α	562,60 Bb
Testemunha	317,18 α		1008,00 α	
CV (%)	9,54	5,36	4,62	5,85

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

^aMédias não diferem da testemunha pelo teste de Dunnett ao nível de 5% de probabilidade.

*Neste segundo experimento foram utilizadas apenas duas épocas.

A aplicação do extrato hidroalcoólico de crambe na via raiz+solo em ambas as épocas testadas, diferiram os resultados do primeiro (Tabela 8.4) para o segundo experimento (Tabela 8.6) para J2 e ovos por grama de raiz. No entanto, a redução de J2 e ovos por grama de raiz em aplicação via raiz+solo+folha semanalmente (Tabela 8.6), confirmou o resultado do primeiro experimento (Tabela 8.4).

Os J2 e ovos por 100 cm³ de solo foram reduzidos na via raiz+solo+folha semanalmente, e ausência de controle foi observado na via raiz+folha em aplicações semanais (Tabela 8.6), no entanto estes resultados corroboram com os observados na Tabela 5, exceto para a via raiz+solo que no segundo experimento os J2 e ovos por 100 cm³ de solo não diferiram da testemunha, assim como para aplicações na época após a inoculação. Às diferenças observadas entre os experimentos, pode ser devido a diferença de temperatura entre o primeiro e segundo experimento. No segundo experimento as temperaturas estavam mais elevadas com média de 24,8 °C, favorecendo a reprodução. No primeiro experimento a temperatura média foi de 19,3 °C, estes dados da temperatura são da Estação Meteorológica de Observação de Superfície Automática (A820) da Estação Experimental Prof. Dr. Antônio Carlos dos Santos Pessoa, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná de Marechal Cândido Rondon.

8.4 CONCLUSÃO

Aplicações do extrato hidroalcoólico de crambe semanalmente em tomateiro via raiz+solo+folha reduzem massa de ovos, galhas totais, J2 e ovos por grama de raiz e por 100 cm³ de solo de *M. javanica*.

8.5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AISSANI, N.; TEDESCHI, P.; MAIETTI, A.; BRANDOLINI, V.; GARAU, V. L.; CABONI, P. Nematicidal activity of allylisothiocyanate from horseradish (*Armoracia rusticana*) roots against *Meloidogyne incognita*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 61, p. 4723-4727, 2013.

ALMEIDA, F.A.; PETTER, F.A.; SIQUEIRA, V.C.; ALCÂNTARA NETO, F.; A. U. ALVES, A.U.; LEITE, M.L.T. Modos de preparo de extratos vegetais sobre *Meloidogyne javanica* no tomateiro. **Nematropica Journal**, Flórida, v. 42, p. 9-15, 2012.

ATKINSON, H.J.; LILLEY, C.J.; URWIN, P.E. Strategies for transgenic nematode control in developed and developing world crops. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 23, p. 251-256, 2012.

BELAN, L.L.; ALVES, F.R.; COSTA, D.C.; DA FONSECA, S.O.; MORAES, W.B.; DE SOUZA, A.F.; DE JESUS JUNIOR, W.C. Efeitos de densidades crescentes de inóculo de *Meloidogyne javanica* no desenvolvimento vegetativo de genótipos de tomateiro cereja. **Revista Trópica**, Chapadinha, v. 5, n. 1, p. 22-30, 2011.

BONALDO, M.S.; PASCHOLATI, S.F.; ROMEIRO, R.S. Indução de resistência: noções básicas e perspectivas. In: CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO, R.M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S.F.; RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R.S. **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005. p. 11-27.

BOREK, V.; MORRA, M.J.; BROWN, P.D.; McCAFFREY, J.P. Transformation of the Glucosinolate-Derived Allelochemicals Allyl Isothiocyanate and Allylnitrile in Soil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 43, p. 1935-1940, 1995.

CAILLAUD, M.C.; DUBREUIL, G.; QUENTIN, M.; PERFUS-BARBEOCH, L.; LECOMTE, P.; ENGLER, J.A.; ABAD, P.; ROSSO, M.N.; FAVERY, B. Root-knot nematodes manipulate plant cell functions during a compatible interaction. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 165, p. 104-113, 2008.

CAMPOS, H.D.; SILVA, J.R.C.; CAMPOS, V.P.; SILVA, L.H.C.P.; COSTA, L.S.A.S.; SILVA, W.J.R. Effect of soil temperature on infectivity and reproduction of *Meloidogyne javanica* and *Heterodera glycines* in soybean cultivars. **Ciência Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 5, p. 900-907, 2011.

CARVALHO, C.R.F.; PONCIANO, N.J.; DE SOUZA, P.M.; DE SOUZA, C.L.M.; DE SOUZA, E.F. Viabilidade econômica e de risco da produção de tomate no município de Cambuci/RJ, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 12, p. 2293-2299, 2014.

CHAVES, A.; PEDROSA, E.M.R.; COELHO, R.S.B. GUIMARÃES, L.M.; MARANHÃO, S.R.V.L.; GAMA, M.A.S. Alternativas para o manejo integrado de fitonematoides em cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 7, n. 1, p. 73-80, 2012.

CHINNARSI, B.; SIPES, B.S.; SCHMITT, D.P. Effects of acibenzolar-S-methyl application to *Rotylenchulus reniformis* and *Meloidogyne javanica*. **Journal of Nematology**, Hanover, v. 35, n. 1, p. 110-114, 2003.

CRUZ, C.D. **Programa Genes**: Biometria. Viçosa: UFV, 2006. 382p.

DIAS-ARIEIRA, C.R.; FERRAZ, S.; FREITAS, L.G.; DEMUNER, A.J. Efeitos de lixiviados de raízes de gramíneas forrageiras na eclosão de juvenis de *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* e *Heterodera glycines*. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 27, n. 1, p. 23-28, 2003.

DIAS-ARIEIRA, C.R.; SANTANA-GOMES, S.M.; PUERARI, H.H.; FONTANA, L.F.; RIBEIRO, L.M.; MATTEI, D. Induced resistance in the nematodes control. **African Journal of Agricultural Research**, Nairobi, v. 8, n. 20, p. 2312-2318, 2013.

ENGLER, J.A.; FAVERY, B.; ENGLER, G.; ABAD, P. Loss of susceptibility as an alternative for nematode resistance. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 16, p. 112-117, 2005.

FARIA, C.M.D.R.; SALGADO, S.M.L.; CAMPOS, H.D.; RESENDE, M.L.V.; CAMPOS, V.P.; COIMBRA, J.L. Mecanismos de ataque e defesa na interação nematoide-planta. **Revista Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 11, p. 373-410, 2003.

FERRAZ, L.C.C.B.; MONTEIRO, A.R. Nematoides. In: AMORIM, L.; RESENDE, J.A.M.; BERGAMIM FILHO, A. **Manual de Fitopatologia**: princípios e conceitos. 4 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2011, p. 277-305.

FRANZENER, G.; FRANZENER, A.S.M.; STANGARLIN, J.R.; FURLANETTO, C.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. Proteção de tomateiro a *Meloidogyne incognita* pelo extrato de *Tagetes patula*. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 31, n. 1, p. 27-36, 2007.

FREITAS, L. G.; NEVES, W. S.; OLIVEIRA, R. D. L. Métodos em nematologia vegetal. In: ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. **Métodos em fitopatologia**. 1. ed. Viçosa: UFV, 2007. p. 253-291.

GARDIANO, C.G.; MURAMOTO, S.P.; KRZYKANOWSKI, A.A.; ALMEIDA, W.P.; SAAB, O.J.G.A. Efeito de extratos aquosos de espécies vegetais sobre a multiplicação de *Rotylenchulus reniformis* Linford & Oliveira. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 78, n. 4, p. 553-556, 2011.

GUEYSEN, G.; FENOLL, C. Gene expression in nematode feeding sites. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 40, p. 191-219, 2002.

HARTMAN, K.M.; SASSER, J. N. Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential host test and perineal pattern morphology. In: BARKER, K.R.; CARTER, C.C.; SASSER, J.N. **An advanced treatise on *Meloidogyne***. Methodology, North Carolina: University Graphics, p. 69-77, 1985.

IBGE-Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Levantamento sistemático da produção agrícola: pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil**. Rio de Janeiro, v. 29, n. 4, p. 1-18, 2015.

JAVED, N.; GOWEN, S.R.; EL-HASSAN, S.A.; INAN-UL-HAQ, SHAHIMA, F.; PEMBROKE, B. Efficacy of neem (*Azadirachta indica*) formulations on biology of root-knot nematodes (*Meloidogyne javanica*) on tomato. **Crop Protection**, Amsterdam, v. 27, p. 36-43, 2008.

JENKINS, W.R. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. **Plant Disease Reporter**, St Paul, v. 48, p. 692, 1964.

LAZZERI, L.; LEONI, O.; CONTE, L.S.; PALMIERI, S. Some technological characteristics and potential uses of *Crambe abyssinica* products. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 3, p. 103-112, 1994.

LOGUERCIO, A. P.; BATTISTIN, A.; VARGAS, A. C.; HENZEL, A.; WITT, N. M. Atividade antibacteriana de extrato hidroalcoólico de folhas de jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skells). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, p. 371-376, 2005.

LOPES, E.A.; FERRAZ, S.; FREITAS, L.G.; FERREIRA, P.F.; AMORA, D.X. Efeito dos extratos aquosos de mucuna preta e de manjeriço sobre *Meloidogyne incognita* e *M. javanica*. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 29, p. 67-74, 2005.

MATEUS, M.A.F; FARIAM C.M.D.R.; BOTELHO, R.V.; DALLEMOLE-GIARETTA, R.; FERREIRA, S.G.M.; ZALUSKI, W.L. Extratos aquosos de plantas medicinais no controle de *Meloidogyne incognita* (Kofoid e White, 1919) Chitwood, 1949. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 30, n. 3, p. 730-736, 2014.

MELILLO, M.T.; LEONETTI, P.; BONGIOVANNI, M.; CASTAGNONE-SERENO, P.; BLEVE-ZACHEO, T. Modulation of reactive oxygen species activities and H₂O₂ accumulation during compatible and incompatible tomato–root-knot nematode interactions. **New Phytologist**, Oxford, v. 170, p. 501-512, 2006.

MOLINARI, S. Molecular aspects of plant-nematode interaction. **Nematologia Mediterrânea**, Cabo, v. 24, p. 139-154, 1996.

MOLINARI, S.; LOFFREDO, E. The role of salicylic acid in defense response of tomato to root-knot nematodes. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, Malden, v. 68, p. 69-78, 2006.

NTALLI, N.G.; CABONI, P. Botanical nematicides: a review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 60, p. 9929-9940, 2012.

OKA, Y.; COHEN, Y. Induced resistance to cyst and root-knot nematodes in cereals by DL- β -amino-*n*-butyric acid. **European Journal of Plant Pathology**, London, v. 107, p. 219-227, 2001.

OKA, Y.; BEM-DANIEL, B-H.; COHEN, Y. Control of *Meloidogyne javanica* by formulations of *Inula viscosa* leaf extracts. **Journal of Nematology**, Hanover, v. 38, n. 1, p. 46-51, 2006.

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

RAHMAN, L.; WHITELAW-WECKERT, M.A.; ORCHARD, B. Consecutive applications of brassica green manures and seed meal enhances suppression of *Meloidogyne javanica* and increases yield of *Vitis vinifera* cv Semillon. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 47, p. 195-203, 2011.

REDDIGARI, S.R.; SUNDERMANN, C.A.; HUSSEY, R.S. Isolation of subcellular granules from second-stage juveniles of *Meloidogyne incognita*. **Journal of Nematology**, Hanover, v. 17, n. 4, p. 482-488, 1985.

RIBEIRO, H.B.; RIBEIRO, R.C.F.; XAVIER, A.A.; CAMPOS, V.P.; DIAS-ARIEIRA, C.R.; MIZOBUTSI, E.H. Resíduos de frutos de pequi no controle do nematóide das galhas em tomateiro. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 30, p. 453-458, 2012.

ROCHA, M.R.; CASTRO, R.M.; PINA, R.C.; MARTINI, A.L. Efeito do acibenzolar-S-metil (benzothiadiazole), como indutor de resistência sistêmica em soja (*Glycine max* cv. FTCRISTALINA), sobre *Heterodera glycines*. **Revista Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 30, n. 2, p. 35-38, 2000.

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

SALGADO, S.M.L.; SILVA, L.H.C.P. Potencial da indução de resistência no controle de fitonematóides. In: CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO, R.M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S.F.; RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R.S. **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, v. 13, 2005. p. 155-165.

SALGADO, S.M.L.; RESENDE, M.L.V.; CAMPOS, V.P. Efeito de indutores de resistência sobre *Meloidogyne exigua* do cafeeiro. **Ciência agrotecnológica**. Lavras, v. 31, n. 4, p. 1007-1013, 2007.

SCHWAN-ESTRADA, K.R.F. Extratos vegetais no controle de doenças de plantas. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 4038-4045, 2009.

SILVA, L. H. C. P.; CAMPOS, J. R.; CAMPOS, V. P.; DUTRA, M. R. Efeito do acibenzolar-S-metil (ASM) e da abamectina na proteção de cultivares de tomateiro contra *Meloidogyne* sp. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 195, 2002.

SILVA, L.H.C.P.; CAMPOS, J.R.; DUTRA, M.R.; CAMPOS, V.P. Aumento da resistência de cultivares de tomate a *Meloidogyne incognita* com aplicações de acibenzolar-S-metil. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 28, n. 2, p. 199-206, 2004.

STANGARLIN, J.R.; KUHN, O.J.; TOLEDO, M.V.; PORTZ, R.L.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; PASCHOLATI, S.F. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**, Cascavel, v. 10, p. 18-46, 2011.

TAYLOR, A.L.; SASSER, J.N. **Biology, identification and control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* sp.)**. Raleigh, North Carolina State University, 1978. 111 p.

TRANI, P.E.; NAGAI, H.; PASSOS, F.A. Tomate (estaqueado). In: RAI, J. B.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A.; FURLANI, A. M. C. **Recomendação de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**. Campinas: IAC, 1997. p. 183. (Boletim técnico, 100).

TRUDGIL, D.L.; BLOK, V.C. Apomictic, polyphagous root-knot nematodes: exceptionally successful and damaging biotrophic root pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 39, n. 1, p. 53-77, 2001.

WALKER, J. T. Crambe and rapeseed meal as soil amendments: nematicidal potential and phytotoxic effects. **Crop Protection**, Amsterdam, v. 15, n. 5, p. 433-437, 1996.

WILLIAMSON, V.M.; KUMAR, A. Nematode resistance in plants: the battle underground. **Trends in Genetics**, Cambridge, v. 22, n. 7, p. 398-403, 2006.

WU, H.; WANG, C.J.; BIAN, X.W. B.; ZENG, S.Y.; LIN, K.C.; WU, B.; ZHANG, G.A.; ZHANG, X. Nematicidal efficacy of isothiocyanates against root-knot nematode *Meloidogyne javanica* in cucumber. **Crop Protection**, Amsterdam, v. 30, p. 33-37, 2011.

ZANELLA, C.S.; GAVASSONI, W.L.; BACCHI, L.M.A.; CARVALHO, F.C. Resistência de cultivares de algodoeiro ao nematoide das galhas. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 27, n. 4, p. 655-659, 2005.

ZHANG, W.; RUAN, W.; DENG, Y.; GAO, Y. Potential antagonistic effects of nine natural fatty acids against *Meloidogyne incognita*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 60, p. 11631-11637, 2012.

9 CONCLUSÕES GERAIS

O extrato hidroalcoólico de crambe apresentou elevado efeito inibitório da eclosão de ovos, além de efeito nematostático e nematicida para *M. incognita* e *M. javanica*, seguido pelo extrato metanólico e o obtido por trituração. O extrato hidroalcoólico na dose calculada de 250 mg L⁻¹ apresentou-se efetivo no controle, e somente os extratos metanólico e hidroalcoólico apresentaram alil isotiocianato, com destaque para o metanólico. Nesse sentido, os efeitos promovidos em *M. incognita* e *M. javanica* não podem ser atribuídos somente à presença de alil isotiocianato, sugerindo assim, que outras moléculas com efeito sobre os nematoides estejam presentes em folhas de *C. abyssinica*, instigando estudos posteriores para identificação das mesmas.

Para *M. incognita*, na época de aplicação após a inoculação, o efeito principal foram aplicações via foliar, atribuindo-se a redução da massa de ovos, galhas totais e J2 e ovos por 100 cm³ de solo ao efeito indutor de resistência em tomateiro. Na época de aplicação semanal, pode ter ocorrido maior efeito nematicida e/ou nematostático, pois, aplicações via solo apresentaram menos massa de ovos, menos galhas totais e J2 e ovos por grama de raiz comparado a via foliar. Quando adicionada a imersão das raízes do tomateiro nas vias de aplicação, *M. incognita* foi controlado por aplicações semanais via raiz+solo+folha. Neste, efeito nematicida e/ou nematostático, assim como indução de resistência podem ser os responsáveis pelos resultados encontrados.

Para *M. javanica*, aplicações via solo+folha semanalmente se destacaram no controle por contemplar o maior número de variáveis reduzidas. Quando o tratamento (imersão) da raiz foi adicionada às outras vias de aplicação, a época semanal se destacou com a via raiz+solo+folha, pois apresentou baixo número de massa de ovos, galhas totais, J2 e ovos por grama de raiz e por 100 cm³ de solo. Apesar de outros tratamentos também demonstrarem eficiência, alguns não foram confirmadas com a repetição do experimento.

Portanto, o extrato de crambe apresenta efeito nematicida, nematostático e inibidor de eclosão, porém, quando levados para casa de vegetação, foi observado que além destes, podem estar ocorrendo outros meios de controle, como mecanismos indutores de resistência no tomateiro. Porém, para tais efeitos, a eficiência do extrato depende de época e via de aplicação, por isso que, aplicações sucessivas e que contemplem o solo e a folha, pode oferecer um efeito conjunto de mecanismos relacionados a indução de resistência e efeito direto ao nematoide. Portanto, o extrato de crambe tem potencial para controle de fitonematoides na agricultura, sem

prejuízos ao homem e ao meio ambiente, sendo uma fonte de referência para novas pesquisas a fim de esclarecer os mecanismos de ação do extrato e quais os compostos envolvidos.