



**Arinaldo Pereira da Silva**

**Caracterização molecular de *Bursaphelenchus cocophilus* e controle de *Meloidogyne incognita* por moléculas orgânicas voláteis.**

**Lavras-MG**

**2015**

**Arinaldo Pereira da Silva**

**Caracterização molecular de *Bursaphelenchus cocophilus* e controle de *Meloidogyne incognita* por moléculas orgânicas voláteis.**

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

Orientador

Dr. Vicente Paulo Campos

**Lavras-MG**

**2015**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados informados pelo (a) próprio(a) autor(a).

Silva, Arinaldo Pereira da.

Caracterização molecular de *Bursaphelenchus cocophilus* e controle de *Meloidogyne incognita* por moléculas orgânicas voláteis / Arinaldo Pereira da Silva. – Lavras : UFLA, 2015.

79 p. : il.

Tese(doutorado)–Universidade Federal de Lavras, 2015.

Orientador(a): Vicente Paulo Campos.

Bibliografia.

1. Nematóide-das-galhas. 2. Anel Vermelho do coqueiro. 3. Voláteis. 4. Primer espécie-específico. 5. Filogenia. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

**Arinaldo Pereira da Silva**

**Caracterização molecular de *Bursaphelenchus cocophilus* e controle de *Meloidogyne incognita* por moléculas orgânicas voláteis.**

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

APROVADA em 29 de Julho de 2015

Dr <sup>a</sup> Antonia dos Reis Figueira	UFLA
Dr. Denilson Ferreira de Oliveira	UFLA
Dr Jorge teodoro de Souza	UFLA
Dra <sup>a</sup> Renata Silva Canuto de Pinho	UNIPAMPA

Dr. Vicente Paulo Campos

Orientador

**Lavras-MG**

**2015**

*A Deus, pela compaixão e pelas grandes oportunidades concedidas,  
Aos meus pais, Evandro e Maria, que são meus exemplos e pelo amor  
incondicional,*

*A minha amada irmã, pelo carinho, amizade,*

*A minha tia Denise pelas palavras maternais e orações,*

*Aos meus sobrinhos, que me fazem ser uma pessoa melhor,*

**Ofereço**

*Aos amigos que fiz durante essa longa caminhada,*

*Aos meus tios pela motivação,*

*Aos meus primos que são como irmãos,*

**Dedico**

## AGRADECIMENTOS

Ao Senhor Deus, pelo dom da vida, pelos sonhos conquistados e por ser fiel.

Aos meus preciosos pais e irmã, que me deram o melhor que podiam e me dedicaram tanto amor.

À Universidade Federal de Lavras e ao Programa de Fitopatologia, pela oportunidade de realizar o doutorado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais – FAPEMIG, pela bolsa de estudo no Brasil, assim como a CAPES, pela concessão da bolsa de “Doutorado-sandwich”.

Ao professor Vicente Paulo Campos pela orientação, dedicação, confiança depositada e valiosos ensinamentos, que levarei comigo.

Aos demais professores do DFP/UFLA por todo conhecimento transmitido.

Aos meus Coorientadores, Sarah Guimarães e prof. Manuel Mota, pela paciência, ensinamentos e sugestões na tese.

Aos “nematodos” Ufla, Lílian, Ana Luiza, Willian, Júlio, Luma, Eduardo, Wendel, Larissa, Franciely, Ariana e Cleber pela amizade e por me permitir fazer parte dessa grande família. Em especial à Liliana, Jaqueline, Simone, Aline e Josimar, pelas melhores lembranças que levarei de Lavras, Viçosa, sítio, SJDR, Perdões...

Ao amigo Tarlei de Paula, pela paciência e pelas valiosas conversas.

Aos amigos Tiago, Gabriel, Willian e Alejandro, pelo companheirismo.

Aos prezados amigos lusitanos Pedro, Cláudia, Margarida, Francisco, Inácia, Ana, Patrícia, Marcos, Patrick, Ruben e Pedro Pablo que fizeram os meus dias em Évora mais leves, divertidos e sem dúvida memoráveis.

Aos amigos do DFP, em especial, Rayssa, Lívia, Thaissa, Gizeli, Nathalya, Sueny, Rose, Carol, Stefany, Brenda, Camila, Melina pelos bons momentos.

Aos meus amigos-irmãos, Ufranianos, Ana Claudia, Éder, João, Larissa, Marina, Maura e Selma, pela felicidade de tê-los comigo. E àqueles que eu fiz no decorrer dessa caminhada, Diene e a Edlene, pela amizade e companheiros.

A profa Rosany Lobão, por ser alguém capaz de inspirar sonhos em seus alunos.

Aos amigos LPPs1G, pois estiveram comigo no início da jornada, em especial à Jackeline, que é sem dúvida uma pessoa ímpar, durante os últimos anos. A todos aqueles que contribuíram ao longo dessa caminhada

*“Celebrai com júbilo ao SENHOR, todas as terras.*

*Servi ao Senhor com alegria; e entrai diante dele com canto.*

*Sabei que o Senhor é Deus; foi ele que nos fez, e não nós a nós mesmos; somos povo seu e ovelhas do seu pasto.*

*Entrai pelas portas dele com gratidão, e em seus átrios com louvor; louvai-o, e bendizei o seu nome.*

*Porque o Senhor é bom, e eterna a sua misericórdia; e a sua verdade dura de geração em geração.”*

**Salmos 100:1-5**



## Resumo

Os fitonematoides *Meloidogyne incognita* e *Bursaphelenchus cocophilus* causam sérios prejuízos na agricultura mundial. *M. incognita* é importante patógeno para as principais commodities agrícolas, e seu controle é de importância fundamental. Devido ao aumento da preocupação com o ambiente e a toxicidade a mamíferos causados pelos agroquímicos altamente tóxicos, que são utilizados no manejo de nematoides, tem-se buscado novas fontes e produtos menos impactantes ao ambiente. Os voláteis apresentam potencial para serem utilizados em substituição a produtos comercialmente utilizados, demonstrando alta capacidade nematicida e/ou nematostática. Foram selecionadas 30 moléculas para avaliar suas ações nematicidas a juvenil de segundo estágio (J2) e aos ovos de *M. incognita*. Nos testes de exposição por 24 horas aos voláteis, 19 moléculas apresentaram 80% de imobilidade aos J2 de *M. incognita*. Os ensaios de infectividade e reprodução dos J2, após exposição aos voláteis, comprovaram redução significativa no número de galhas e ovos.grama<sup>-1</sup> de raiz de tomateiro na mesma proporção que ocorreu a redução da imobilidade. As moléculas mais eficazes, benzaldehydo, hexyl alcohol e 3-octanol, foram utilizadas nos ensaios sobre tempo de exposição. Benzaldehydo com apenas uma hora de exposição já causou 100% de imobilidade e alta redução na infectividade e reprodução de *M. incognita*, o que só foi alcançado pelas outras moléculas a partir de 5 horas de exposição. *B. cocophilus* causa sérios danos e prejuízos em cultivos de Palmae, porém estudos de caracterização molecular são escassos. A correta identificação deste nematoide é necessária, uma vez que no gênero existem espécies quarentenárias no Brasil. As regiões ITS e 28S são as mais exploradas na identificação de espécies de *Bursaphelenchus*, e foram utilizadas para caracterizar populações do Brasil e Colômbia. Análise filogenética de ambas as regiões comprovaram que as populações aqui estudadas são de *B. cocophilus*. Análises da região do D2/3 segmento do 28S, levaram à formação de um grupo monofilético das sequências das populações do Brasil e Colômbia, mais as sequências de referência da Costa Rica e Honduras. No clado do *B. cocophilus* foram formados três sub-clados, o primeiro com apenas populações da Colômbia, o segundo com populações do Brasil e Costa Rica e finalmente o terceiro, clado basal, com a população de Honduras. A região ITS não foi satisfatória para discriminar as populações entre Brasil e Colômbia, mas gerou um clado separado dessas populações das demais espécies de *Bursaphelenchus* e como clado-irmão, *B. platzeri*. Um primer específico foi desenvolvido para detecção rápida de *B. cocophilus*. Nossos resultados sugerem que as populações de *B. cocophilus* do Brasil e da Colômbia foram possivelmente estabelecidas a partir de uma mesma população original, devido a baixa variabilidade encontrada.

Palavras-chaves: compostos voláteis, controle, nematoides das galhas, Anel vermelho, primer espécie específico e Filogenia

## Abstract

Plant parasitic nematodes, such as *Meloidogyne incognita* and *Bursaphelenchus cocophilus*, cause serious losses in the world agriculture. *M. incognita* is an important pathogenic nematode in various agricultural commodities and its control is required to improve profit. Due to increased worries to the environment contamination and the toxicity to mammals caused by highly toxic agrochemicals used in managing plant parasitic nematodes, new strategies and products, less damaging to the environment, have been searched. The volatiles present potential to be used substituting the currently commercialized pesticides since they have demonstrated high nematicidal capacity and/or nematostatic. Thirty molecules were gathered to be evaluated as volatile nematicide to second stage juveniles (J2) and eggs of *M. incognita*. In the J2 exposition test for 24 hours to the volatiles, nineteen molecules caused 80% J2 immobility of *M. incognita*. The J2 infectivity and reproduction after volatile exposure showed reduction of gall and number of eggs/gr of roots at the same proportion that occurred the reduction of J2 mobility. The most toxic molecules, benzaldehyde, hexyl alcohol and 3-octanol were used in the assay of time exposition to volatile molecules. When J2 was exposed by only one hour to the volatile of benzaldehyde occurred 100% J2 immobility and great reduction of infectivity and reproduction of exposed *M. incognita* J2 which was only reached by hexyl alcohol and 3-octanol after five hours the exposition. *B. cocophilus* causes severe damage and losses in Palmae crops, however studies on species molecular characterization are scarce. Nevertheless, a correct identification of this nematode is necessary since several species of this genus are in quarantine in Latin America. The genome regions ITS and 28S are most used for identification of *Bursaphelenchus* species. These regions were used herein to characterize brazilian and colombian populations of *B. cocophilus*. The phylogenetic analysis of those regions proved that the population studied belonged to *B. cocophilus* species. Studies on the region 28S segment D2/3 led to the formation of monophyletic group from the sequences of all populations of Brazil and Colombia including genbank sequences of the Costa Rica and Honduras populations. In the *B. cocophilus* clade, three subclades were formed: in the first one grouped the colombian populations only; in the second, grouped the brazilian and costa rican populations and in the third, based clade, stayed the honduras populations alone. The region ITS1/2 was not enough to separate brazilian and colombian populations, however generated one clade separating those populations from others *Bursaphelenchus* species and also, as sister clade, the *B. pratzeri*. A specific primer was developed for rapid detection of *B. cocophilus*. Our work indicates that *B. cocophilus* populations from Brazil and

Colombia were, possibly, originated from single introduction due to a low genome variability encountered.

Keyword: volatile compounds, control, root knot nematode, Red ring disease, species specific primers and Phylogeny

## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	13
1.1 <i>Meloidogyne incognita</i> e seu controle por compostos voláteis.....	13
1.2 <i>Bursaphelenchus cocophilus</i> (Cobb) Baujard, agente etiológico do anel-vermelho .....	15
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	18
Segunda Parte - Artigos .....	22
Artigo 1 - Molecular phylogeny and genetic structure of <i>Bursaphelenchus     cocophilus</i> , the causal agent of red ring disease in palms.....	22
Artigo 2: Atividade nematicida de moléculas voláteis de plantas e microorganismo .....	44

## **PRIMEIRA PARTE**

### **1. INTRODUÇÃO**

#### 1.1 *Meloidogyne incognita* e seu controle por compostos voláteis.

*Meloidogyne incognita* é a espécie do gênero *Meloidogyne* mais disseminada e encontrada em quase todos os países, sendo, provavelmente, a que mais causa danos e prejuízos às culturas de importância agrícola (TRUDGILL; BLOK, 2001). *M. incognita* é capaz de parasitar mais de 2.000 espécies de plantas (SASSER, 1980) que incluem a maioria das culturas de exploração agrícola e ornamentais. As perdas econômicas na agricultura mundial por fitonematoides são estimadas em cerca de US\$ 125 bilhões (SASSER; FRECKMAN, 1987).

Um bom manejo de fitonematoides pode ser conseguido por meio de medidas, como uso de nematicidas, rotação de cultura, incorporação de matéria orgânica, uso de variedades resistentes e controle biológico (FERRAZ et al., 2010). Porém, o potencial de contaminação ambiental e a necessidade de um manejo de fitonematóide de forma sustentável e eficiente direcionaram a busca por nematicidas naturais (CHITWOOD, 2002). As moléculas voláteis podem se inserir neste contexto, pois têm efeito tóxico rápido, sem deixar resíduos. Essas moléculas são abundantes na decomposição de qualquer material orgânico e são também emitidas por plantas vivas e por culturas fúngicas e bacterianas (BARROS et al., 2014; FREIRE et al., 2012; GU et al., 2007). É, possivelmente, extenso o número de moléculas que podem afetar deletoriamente o nematóide e sua interação com a planta (patogênese) e, portanto, se tornarem nematicidas de interesse agrícola.

Caso seja comprovada a ação nematicida da molécula volátil encontrada na natureza, ela poderá servir de esqueleto para a síntese de moléculas em laboratório. Só são voláteis moléculas com menos de 20 carbonos e com alta pressão de vapor (DUDAREVA et al., 2006).

A composição dos compostos orgânicos voláteis tóxicos a nematoides emitidas por cultura fúngica, bacteriana e também por plantas tem sido caracterizada por cromatografia gasosa (BARROS et al., 2014; FREIRE et al., 2012; GU et al., 2007). Muitos fungos da microbiota do solo são capazes de produzir COVs tóxicos a fitonematoides (FREIRE et al., 2012; KIMURA et al., 2007). Kimura et al. (2007) encontraram 86% de mortalidade de *B. xilophilus* e *Caenorhabditis elegans*, pelo ácido 5-hydroxymethyl-2-furoic oriundo de *Aspergillus* sp.

Bactérias também produzem COVs tóxicos a fitonematoides. Gu et al. (2007) caracterizaram algumas moléculas dos COVs emitidos por isolados de bactérias habitantes do solo tóxicos a *Panagrellus redivivus* e *Bursaphelenchus xylophilus* e também testaram, contra os nematoides, algumas moléculas comerciais análogas. Das 20 moléculas estudadas, nove causaram 100% atividade nematicida (phenol, 2-octanol, benzeneacetaldehyde, decanal, 2-nonanone, 2-undecanone, cyclohexene, benzaldehyde e dimethyl disulfide ).

As plantas e seus derivados também têm sido utilizados como fontes de COVs nematicidas. Barros et al. (2014) encontraram toxicidade a *M. incognita* em diferentes macerados de *Brassica juncea*, *Azadirachta indica*, *Canavalia ensiformis*, *Mucuna pruriens* e *Cajanus cajan*, diminuindo consideravelmente o número de galhas e ovos de *M. incognita* após exposição aos voláteis de *Azadirachta indica* e *Brassica juncea*.

Muitos compostos tóxicos a nematoides oriundos de plantas têm sido identificados, como:  $\alpha$ -tertienil, liberado no solo por *Taggets* sp., com atividade nematicida, monocrotalina presente em COVs de *Crotalaria*

*spectabilis* inibe a movimentação de *M. incognita* (FASSULIOTIS; SKUCAS, 1969). *Mucuna pruriens* tem como metabólitos dois álcoois com atividade na inibição da eclosão de J2 de *M. incognita* (NOGUEIRA, 1996). Trabalhos com moléculas sintéticas têm surgido, objetivando encontrar novos compostos com atividade nematicida (SRINIVAS; NAGARAJ; REDDY, 2010).

## 1.2 *Bursaphelenchus cocophilus* (Cobb) Baujard, agente etiológico do anel-vermelho

No gênero *Bursaphelenchus* Fuchs, 1937, encontram-se cerca de noventa a cem espécies (KANZAKI; GIBLIN-DAVIS, 2012). A maioria delas é micrófaga e está associada a insetos-vetores (HUNT, 1993). Segundo Jones et al. (2008), apenas as espécies *B. cocophilus* e *B. xylophilus* causam impacto econômico nos sistemas agrícolas e florestais do mundo. *B. cocophilus* é o agente etiológico da doença do anel-vermelho, em palmáceas (coco e dendê) plantadas nas Américas Central e do Sul (RYSS et al., 2005) e *B. xylophilus* é o agente etiológico da murcha-do-pinus, uma doença grave em plantios de coníferas, nos EUA (RUTHERFORD; MAMIYA; WEBSTER, 1990), na Europa (ABELLEIRA et al., 2011; MOTA et al., 1999) e na Ásia (ZHAO et al., 2003). *B. xylophilus* é considerada uma praga quarentenária A1 no Brasil (BRASIL, 2007) e, se introduzida no território brasileiro, pode causar grandes perdas aos cultivos de *Pinus* sp. Nos países em que há registro, *B. xylophilus* é responsável por grandes perdas econômicas e ambientais (MAMIYA, 2004).

A identificação de *B. cocophilus* tem sido feita mais frequentemente por meio das características morfológicas. Porém, recentemente, em amostras de fibra de coco oriundas do estado de Pará, foi encontrada a espécie *B.*



*fungivorus* (OLIVEIRA et al., 2011), mostrando que pode haver mais de uma espécie de *Bursaphelenchus* infectando palmáceas.

A identificação por morfologia de machos e fêmeas é dificultada pela falta de marcadores morfológicos, únicos à espécie e/ou a dificuldade de visualizá-los em microscopia de luz. Um possível marcador morfológico presente na família Aphelenchoidea é difícil de ser visto em *B. cocophilus*, devido à localização na região anterior do corpo, que apresenta um pequeno diâmetro. Além das variações encontradas entre as populações de diferentes locais de origem, e.g. foi descrito por Cobb, (1919) e Lordello e Zamith (1954) um par de papilas preanal, presentes em *B. cocophilus*, porém Giblin-Davis, Gerber e Griffith (1989) relataram apenas uma papila preanal. A distribuição e morfologia das papilas presentes na calda, bursa (caudal alae) nos machos, anulações ao longo do corpo, as linhas na lateral do corpo, em machos e fêmeas, e o flap da vulva, nas fêmeas, não são únicos de *B. cocophilus*, sendo comumente encontrada em outras espécies, como *B. xylophilus* (YIK; BIRCHFIELD, 1981) *B. seani* (GIBLIN; KAYA, 1983) e *B. kevinci* (GIBLIN; SWAN; KAYA, 1984).

A utilização de técnicas moleculares para diagnósticos de diferentes espécies de nematoides, seja por meio de análise de DNA (WANG et al., 2011) e/ou análises de proteínas (CARNEIRO; ALMEIDA, 2001), tem aumentado nos últimos anos, garantindo maior precisão na identificação de uma espécie (WAELE; ELSSEN, 2007). A identificação por meio do material genético é vantajosa por não ser influenciada pelo ambiente ou pelo estágio de desenvolvimento do nematoide (CURRAN, 1991), ou seja, a utilização de técnicas moleculares tem um grande potencial na identificação rotineira de nematoides (AL-BANNA et al., 2004; SAEKI et al., 2003).

Para a identificação de fitonematoides, especialmente no caso do gênero *Bursaphelenchus*, a região mais usada é a ITS, bem como nos estudos de filogenia, de população e o entendimento da distribuição deste patógeno pelo

mundo (BURGERMEISTER et al., 2005; 2009; POWERS et al., 1997). Todavia, há trabalhos que utilizam a região D2D3, do gene 28s, para estudos filogenéticos (TANAKA et al., 2014; YE et al., 2007).

Até o momento, pouco se sabe sobre a biologia e reprodução de *B. cocophilus*, sendo considerado um parasita obrigatório de espécies de Palmae (GIBLIN-DAVIS; GERBER; GRIFFITH, 1989), diferentemente das espécies *B. xylophilus* e *B. mucronatus*, que são micrófagas em uma parte de seu ciclo de vida (FUTAI, 2013). A dificuldade de cultivo *in vitro* tem dificultado a formação de um “banco de germoplasma” de *B. cocophilus*, assim como estudos e uma melhor caracterização molecular da espécie, que apresenta apenas quatro sequências depositadas no GenBank, por Ye et al. (2007).

Diante do exposto, o manejo de *M. incognita* por meio de COVs pode ser uma possibilidade menos agressiva ao ambiente e ao ser humano. A caracterização molecular de *B. cocophilus* se faz necessária para conhecer melhor a diversidade genética das populações brasileiras de *B. cocophilus* permitindo também a elaboração de ferramentas de diagnose mais precisa e rápida, o que não é obtido pela morfologia.

## REFERÊNCIAS

- ABELLEIRA, A. et al. Detection of *Bursaphelenchus Xylophilus*, causal agent of pine wilt disease on *Pinus pinaster* in northwestern Spain. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 95, n. 6, p. 776, June 2011.
- AL-BANNA, L. et al. Discrimination of six *Pratylenchus* species using PCR and species-specific primers. **Journal of Nematology**, College Park, v. 36, n. 2, p. 142–146, June 2004.
- BARROS, A. et al. Nematicidal activity of volatile organic compounds emitted by *Brassica juncea*, *Azadirachta indica*, *Canavalia ensiformis*, *Mucuna pruriens* and *Cajanus cajan* against *Meloidogyne incognita*. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 80, p. 34–43, Aug. 2014.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Instrução normativa N° 52**. Lista de pragas quarentenárias A1 e A2. 2007. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/servlet/VisualizarAnexo?id=14532>>. Acesso em: 17 set. 2015.
- BURGERMEISTER, W. et al. ITS-RFLP analysis, an efficient tool for differentiation of *Bursaphelenchus* species. **Nematology**, Leiden, v. 11, n. 5, p. 649–668, Aug. 2009.
- BURGERMEISTER, W. et al. ITS-RFLP patterns for differentiation of 26 *Bursaphelenchus* species (Nematoda: Parasitaphelenchidae) and observations on their distribution. **Russian Journal of Nematology**, v. 13, n. 1, p. 29–42, 2005.
- CARNEIRO, R. M. D. G.; ALMEIDA, M. R. A. Técnica de eletroforese usada no estudo de enzimas dos nematóides de galhas para identificação de espécies. **Nematologia Brasileira**, Campinas, v. 25, n. 1, p. 35–44, maio 2001.
- CHITWOOD, D. J. Phytochemical based strategies for nematode control. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 40, p. 221–49, Jan. 2002.
- CURRAN, J. Application of DNA analysis to nematode taxonomy. In: NICKLE, W. R. (Ed.). **Manual of agricultural nematology**. New York: M. Dekker, 1991. p. 125–143.

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

FASSULIOTIS, G.; SKUCAS, G. P. The effect of pyrrolizidine alkaloid ester and plants containing pyrrolizidine on *Meloidogyne incognita* acrita. **Journal of Nematology**, College Park, v. 1, p. 287–288, 1969.

FERRAZ, S. et al. **Manejo sustentável de fitonematoides**. Viçosa: Editora UFV, 2010. 304 p.

FREIRE, E. S. et al. Volatile substances produced by *Fusarium oxysporum* from coffee rhizosphere and other microbes affect *Meloidogyne incognita* and *Arthrobotrys conoides*. **Journal of Nematology**, College Park, v. 44, n. 4, p. 321–8, Dec. 2012.

FUTAI, K. Pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 51, p. 61–83, Jan. 2013.

GIBLIN-DAVIS, R. M. ; GERBER, K.; GRIFFITH, R. In vivo and in vitro culture of the red ring Nematode, *Rhadinaphelenchus cocophilus*. **Nematropica**, Bradenton, v. 19, n. 2, p. 135-142, Dec. 1989.

GIBLIN, R. M.; KAYA, H. K. *Bursaphelenchus seani* n. sp. (Nematoda: Aphelenchoididae), a phoretic associate of *Anthophora bomboidea stanfordiana* Cockerell, 1904 (Hymenoptera: Anthophoridae). **Revue de Nématology**, Montrouge Cedex, v. 6, p. 39-50, 1983.

GIBLIN, R. M.; SWAN, J. L.; KAYA, H. K. *Bursaphelenchus kevinci* n. sp. (Nematoda: Aphelenchoididae), an associate of bees in the genus *Halictus* (Hymenoptera: Halictidae). **Revue de Nématology**, Montrouge Cedex, v. 7, p. 177-187, 1984.

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

HUNT, D. Genus *Bursaphelenchus* Fuchs, (1973). In: HUNT, D. J. (Ed.). **Aphelenchida, Longidoridae and Trichodoridae, their systematics and bionomics**. Wallingford: CAB International, 1993. p. 129–142.

JONES, J. T. et al. *Bursaphelenchus xylophilus*: opportunities in comparative genomics and molecular host-parasite interactions. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 9, n. 3, p. 357–68, May 2008.

- KANZAKI, N.; GIBLIN-DAVIS, R. M. Aphelenchoidea. In: MENDOZA, N. M.; MANZANILLA-LOPEZ, R.; HUNT, D. (Ed.). **Practical plant nematology**. London: CABI International, 2012. p. 161–208.
- KIMURA, Y. et al. Nematicidal activity of 5-hydroxymethyl-2-furoic acid against plant-parasitic nematodes. **Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences**, Tubingen, v. 62, n. 3-4, p. 234–238, 2007.
- MAMIYA, Y. Pine wilt disease in Japan. In: MOTA, M.; VIEIRA, P. (Ed.). The pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. In: INTERNATIONAL WORKSHOP UNIVERSITY OF EVORA, 2001, Evora, Portugal. **Proceedings...** Leiden, Brill: University of Evora, 2004. p. 9–20. (Nematology Monographs and Perspectives, 1).
- MOTA, M. et al. First report of *Bursaphelenchus xylophilus* in Portugal and in Europe. **Nematology**, Leiden, v. 1, n. 7, p. 727–734, Nov. 1999.
- NOGUEIRA, M. A. et al. Nematicidal constituents in *Mucuna atterrima* and its activity on *Meloidogyne incognita* Race 3. **Nematologia Mediterranea**, p. 249-252, June 1996.
- OLIVEIRA, C. M. G. et al. Caracterizações morfológica e molecular de *Bursaphelenchus fungivorus* (Nematoda : Aphelenchida), detectado pela primeira vez no Brasil. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 35, n. 3/4, p. 63–70, out. 2011.
- POWERS, T. O. et al. The rDNA Internal Transcribed Spacer Region as a Taxonomic Marker for Nematodes. **Journal of Nematology**, College Park, v. 29, n. 4, p. 441–50, Dec. 1997.
- RUTHERFORD, T. A.; MAMIYA, Y.; WEBSTER, J. M. Nematode-induced pine wilt disease: factors influencing its occurrence and distribution. **Forest Science**, Bethesda, v. 36, n. 1, p. 145–155, Feb. 1990.
- RYSS, A. et al. A synopsis of the genus *Bursaphelenchus* Fuchs, 1937 (Aphelenchida: Parasitaphelenchidae) with keys to species. **Nematology**, Leiden, v. 7, n. 3, p. 393–458, May 2005.
- SAEKI, Y. et al. Detection of plant parasitic nematodes, *Meloidogyne incognita* and *Pratylenchus coffeae* by multiplex PCR using specific primers. **Soil Science and Plant Nutrition**, Tokyo, v. 49, n. 2, p. 291–295, Apr. 2003.

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

SASSER, J. N. Root-knot nematodes: a global menace to crop production. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 64, n. 1, p. 36–41, 1980.

SRINIVAS, A.; NAGARAJ, A.; REDDY, C. S. Synthesis and in vitro study of methylene-bis-tetrahydro[1,3]thiazolo[4,5-c]isoxazoles as potential nematicidal agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Paris, v. 45, n. 6, p. 2353–2358, June 2010.

TANAKA, S. E. et al. *Bursaphelenchus niphades* n. sp. (Tylenchina: Aphelenchoididae) amensally associated with *Niphades variegatus* (Roelofs) (Coleoptera: Curculionidae). **Nematology**, Leiden, v. 16, n. 3, p. 259–281, Jan. 2014.

TRUDGILL, 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, p. 53–77, Jan. 2001.

WAELE, D. DE; ELSSEN, A. Challenges in tropical plant nematology. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 45, p. 457–85, Jan. 2007.

WANG, X. R. et al. A rapid detection of the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* in stored *Monochamus alternatus* by rDNA amplification. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 135, n. 1-2, p. 156–159, Feb. 2011.

YE, W. et al. Phylogenetic relationships among *Bursaphelenchus* species (Nematoda: Parasitaphelenchidae) inferred from nuclear ribosomal and mitochondrial DNA sequence data. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando, v. 43, n. 3, p. 1185–1197, June 2007.

YIK, C-P.; BIRCHFIELD, W. Observations on the morphology of the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. **Journal Nematology**, College Park, v. 13, n. 3, p. 376–384, 1981.

ZHAO, B. G. et al. Distribution and pathogenicity of bacteria species carried by *Bursaphelenchus xylophilus* in China. **Nematology**, College Park, v. 5, n. 6, p. 899–906, Sept. 2003.

Segunda Parte - Artigos

**Artigo 1 - Molecular phylogeny and genetic structure of *Bursaphelenchus cocophilus*, the causal agent of red ring disease in palms**

A. P. Silva<sup>1,4</sup>, P. P. Parra<sup>2</sup>, V. P. Campos<sup>1\*</sup>, S. S. C. Guimarães<sup>1</sup>, C. Vicente<sup>4,5</sup>, L. G. Ferreira<sup>3</sup>, R. M. Souza<sup>3</sup> and M. Mota<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Department of Plant Pathology, Federal University of Lavras, Lavras - MG, Brazil.

<sup>2</sup> International Center for Tropical Agriculture (CIAT), Cali, Colombia.

<sup>3</sup> Lab. de Pesquisa em Nematologia, CCTA/LEF, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Rio de Janeiro, Brasil

<sup>4</sup> NemaLab/ ICAAM – Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas, Universidade de Évora, Évora, Portugal.

<sup>5</sup> Environmental Biology Department, Chubu University, Kasugai, Japan

\*Author correspondence: [vpcampos@dfp.ufla.br](mailto:vpcampos@dfp.ufla.br)

**Artigo preparado de acordo com as normas do periódico *Plant Pathology***

## ABSTRACT

The molecular characterization of *Bursaphelenchus cocophilus*, causal agent of the Red Ring Disease, is necessary for early detection and confident identification for control management procedures since quarantine species such as *B. xylophilus* and *B. mucronatus* are already listed in Brazil and Colombia. The DNA regions ITS1 and ITS2 and D2/3 fragment of LSU rDNA were used to characterize *B. cocophilus* isolated from both coconut and oil palm producing regions in Brazil and Colombia. Results from LSU rDNA regions show that all isolates from Brazil and Colombia formed a monophyletic group with *B. cocophilus*, however separately allocated to different subclades: first clade grouped Brazilian and Costa Rica populations; second included the Colombian isolates; and a third population of *B. cocophilus* isolated from Honduras. Nevertheless, using ITS regions, populations of *B. cocophilus* from Brazil and Colombia formed only one single monophyletic group. This is the first study on ITS for the characterization of *B. cocophilus* populations. *B. cocophilus* showed to be phylogenetic distant from other species of the genus *Bursaphelenchus*, setting the ground for future primer species-specific design.

Key words: *Bursaphelenchus cocophilus*, ITS, LSU, Red Ring Disease, *Rhynchophorus palmarum*



## INTRODUCTION

The genus *Bursaphelenchus* Fuchs, 1937 belongs to the family Aphelenchoididae, which includes more than 100 species worldwide (Kanzaki and Giblin-Davis, 2012). The most important species within this genus are the plant-parasitic nematodes *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner & Buhner, 1934) responsible for the pine wilt disease (PWD) in *Pinus* spp. forests (Mamiya, 1984; Mota and Vieira, 2008; Vicente et al., 2012); *B. sycophilus*, a parasitic species of *Ficus variegata* (Kanzaki et al., 2014); and *B. cocophilus* Baujard, 1989 (Cobb, 1919), responsible for causing the red ring disease (RRD) in coconut (*Cocos nucifera* L.) and other palm trees, e.g., African oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq) and Peach palm (*Bactris gasipaes* Kunth).

The RRD is of significant economic importance in coconut (losses up to 60% in plantations) and oil palm industry in Colombia, Brazil and other countries of Latin American (Costa Rica, Ecuador, México, Nicaragua, Panamá, Perú, Suriname and Venezuela) (FAO, 2011). South American countries should be in alert to the quarantine nematode species of *Bursaphelenchus* genus. For example, Brazil has *B. mucronatus* (saprofitic on *Pinus* sp.) and *B. xylophilus* as an A1 quarantine pest (MAPA, 2007), besides the mycophagous species *B. fungivorus* already found in the country (Oliveira et al., 2012).

Considered an obligate parasite, *Bursaphelenchus cocophilus* has not been yet successfully cultivated *in vitro*, similar to *B. sycophilus* (Kanzaki et al., 2014). In addition, the host range of this nematode is restricted to the family Arecaceae, parasitizing more than 17 species (Moens & Perry, 2009). The life cycle of *B. cocophilus* is completed within 9-10 days (Singh et al., 2013) and time of appearance of external symptoms can vary depending of the host. *B. cocophilus* is mainly vectored by the American palm weevil

*Rhynchophorus palmarum* L. (Moens & Perry, 2009), the sugarcane weevil *Metamasius* sp. (Silva, 1991) and palm weevil *Dynamis borassi* (F.) (Gerber et al., 1990). It can be also transmitted through oviposition on healthy plants, feces or direct contact of roots from a healthy to an infected plant (Araújo, 1990).

The uses of molecular techniques for identification of this nematode increase the diagnose accuracy on infected palms in Brazil and Colombia avoiding miss identification of other members of the *Bursaphelenchus* genus not yet present or reported in these countries. In recent years, much work has been done on the molecular characterization of different *Bursaphelenchus* species (Burgermeister et al., 2005, 2009; Cardoso; Fonseca; Abrantes, 2012; Li et al., 2009; Marek et al., 2014; Mota et al., 2006; Valadas et al., 2012, 2013; Ye et al., 2007; Zhang et al., 2008). Within this genus, the LSU (D2/ 3) and the ITS1 ribosomal regions have been targeted for diversity studies (Cardoso; Fonseca; Abrantes, 2012; Mota et al., 2006; Sultana; Han; Park, 2013; Ye et al., 2007) and for diagnosis purposes (Burguermeister et al, 2009). Both regions are used to provide a valuable tool in the identification of nematodes (Palomares-Rius et al., 2010, 2013) and reconstruction of phylogenetic relationships (Coomans et al., 2012; Kaplan et al., 2000; Ye et al., 2007).

Although molecular studies for identification of *B. xylophilus* are abundant (Cardoso; Fonseca; Abrantes, 2012; Jung et al, 2010; Kang et al, 2009; Lee et al, 2012; Mota et al, 2006 ; Valadas et al, 2012 ; Vieira et al, 2007 ; Ye et al, 2007 ; Zhou et al, 2007; Zhuo et al, 2011), they are scarce for *B. cocophilus*. To date, only four sequences (SSU, LSU and mtCOI regions) of *B. cocophilus* collected in Costa Rica and Honduras from coconut and African oil palm (Ye et al., 2007) are available in NCBI databases. Molecular characterization of the LSU and ITS regions of the plant-parasitic nematode *B. cocophilus* from different geographic populations was the main purpose of this study to further explore

intraspecific phylogenetic relationships of red ring nematode populations and specie specific primer designer for detection for *B. cocophilus*.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Sample collection and nematode extraction**

In total, thirteen coconut and oil palm plantations were visited in main producing regions of Brazil and Colombia for sample collection (Table 1). Transversal portions of infected coconut and oil palm stems were cut and carried to laboratory for nematode extraction. Stem fragments of red ring diseased palms were chopped into small pieces. Both colored and discolored red ring diseased tissues were mixed and approximately 30 g of tissue per sample was placed in a modified Baermann nematode extraction tray with a plastic net and paper tissue. Nematodes were allowed to migrate from tissue into the water overnight. Nematode suspension was sieved through 20- $\mu$ m-pore-size sieves, and individually handpicked to Eppendorf tubes with DESS (dimethyl sulphoxide, disodium EDTA, and saturated NaCl) preserving solution (Yoder et al, 2006) for DNA extraction and molecular analysis.

**Table 1:** Geographic locations and host origins of *Bursaphelenchus cocophilus* isolates used in the study.

Country	State	Collection locations	Host tree	GenBank accession no.	
				D2D3	ITS
Brazil	Pernambuco	Petrolina	Coconut	KT156771	-
Brazil	Pernambuco	Petrolina	Coconut	KT156770	KT156784
Brazil	Alagoas	Maceió	Coconut	KT156769	KT156782
Brazil	Alagoas	Maceió	Coconut	KT156774	KT156785
Brazil	Alagoas	Maceió	Coconut	KT156773	KT15678
Brazil	Espírito Santo	São	Coconut	KT156772	-
Colombia	Nariño	Aguaclara	Coconut	KT156778	-
Colombia	Nariño	Aguaclara	Coconut	KT156775	KT156787
Colombia	Nariño	Aguaclara	Coconut	KT156776	KT156788
Colombia	Nariño	Tumaco	Coconut	KT156777	KT156786
Colombia	Nariño	Tumaco	Coconut	KT156781	
Colombia	Nariño	Tumaco	Coconut	KT156779	-
Colombia	Nariño	Tumaco	Coconut	KT156780	-

### DNA sequencing

LSU rDNA amplification was done using LSU primers: forward D2A (5'-ACAAGTACCGTGAGGGAAAGT-3') and reverse primer D3B (5'-TGCGAAGGA ACCAGCTACTA-3') (Nunn, 1992). For amplification of ITS, the forward F194 (5'-CGTAACAAGGTAGCTGTA-3') (Ferris et al., 1993) and reverse primer 5368 (5'-TTTCACTCGCCGTTACTAAGG-3') (Vrain, 1993) were used. PCR reaction mixture (25µl) consisted in 2.5µl of 10x PCR Buffer (Fermentas), 0,5 µL of each primer (10mM), 0.25 units

Taq DNA polymerase (Fermentas), 2,0 µl of 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTPs (Fermentas) and 3 µl of DNA template. LSU amplification was carried out with an initial denaturation step at 95°C for 5 min, followed by 35 reaction cycles of 94°C for 30 sec, 55°C for 45 sec, and 72°C for 2 min, with a final extension at 72°C for 10 min. ITS amplification was carried out using an initial denaturation step at 94°C for 3 min, followed by 40 reaction cycles of 94°C for 1 min, 48°C for 1 min, and 72°C for 1 min, with a final extension at 72°C for 2 min. PCR products were electrophoresed in a 1% agarose gel stained with SYBR Safe DNA gel stain (Life technologies, Thermo Fisher Scientific Inc, USA), followed by purification with Exonuclease I (Exo I, Thermo Scientific) and FastAP (Thermosensitive Alkaline Phosphatase, Thermo Scientific). Purified LSU and ITS fragments were quantified and then sequenced by Macrogen (Netherlands).

### **Molecular phylogenetics**

Consensus sequences were assembled from forward and reverse sequences using SeqAssem version 07/2008 (SequentiX - Digital DNA Processing, Klein Raden, Germany). Additional sequences of species of the *Bursaphelenchus* genus were retrieved from Genbank (NCBI). *Aphelenchoides besseyi* (EU325682 and JF826519) was used as outgroup in both analyses. Phylogenetic analyses were performed using MEGA 5 (Tamura et al. 2011). Sequences were aligned using Clustal W (Thompson et al., 1994). Maximum Likelihood phylogenetic trees were constructed for D2/3 region of LSU rDNA and ITS region using the Kimura 2-parameter model. Clade support was inferred from 1000 bootstrap replications. All sequences reported in this study have been deposited in GenBank under accession numbers listed in Table 1.

### **Analysis of the genetic structure of populations**

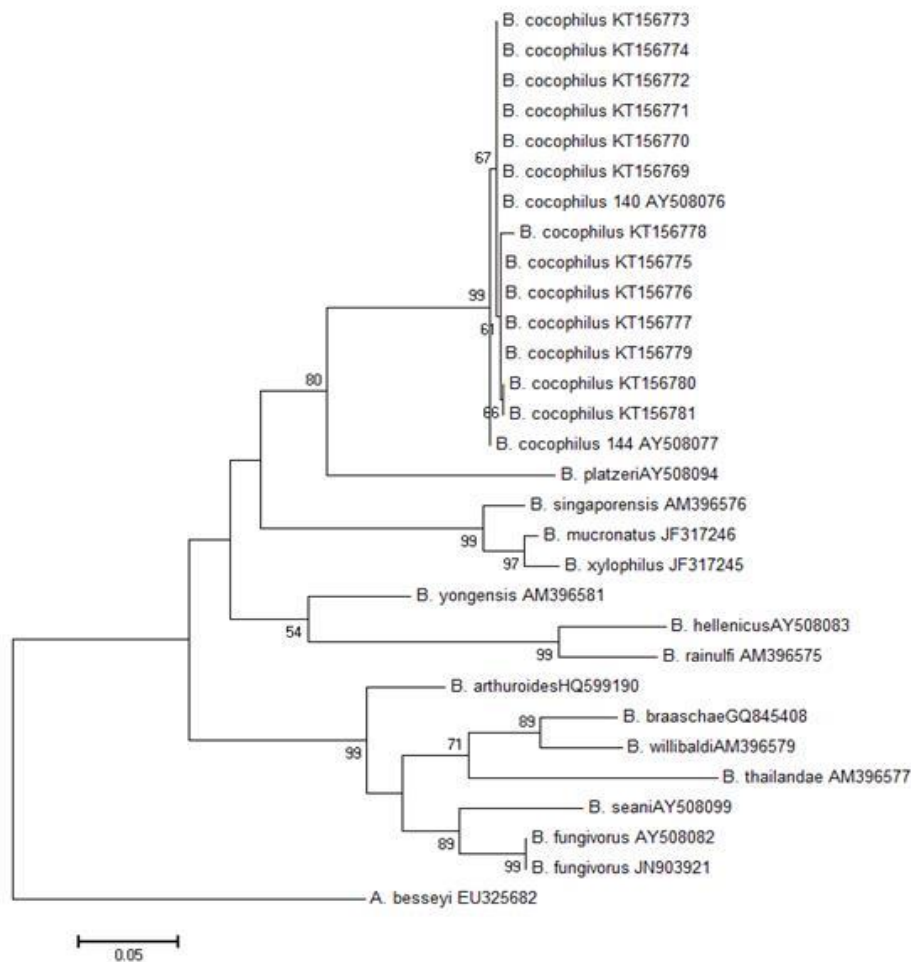
Genetic distances between populations were assessed by comparing the number of pairwise differences among those isolates using MEGA 5 (Tamura et al. 2011). Sequences of D2/3 region of 28S rDNA from phylogenetic analysis were used for the analysis of population genetic structure of *B. cocophilus*.

### **Species-specific PCR for the identification of *B. cocophilus*.**

Based on sequences rDNA ITS 1 /2 region alignment; unique regions for *B. cocophilus* were identified and selected for species-specific primers design. Primers were designed with PRIMER 3 software (Rozen & Skaletsky, 2000). NCBI blast was used to compare primers sequences and verify their homology with other previously deposited sequences in the GenBank (NCBI). Designed primers were used in PCR reactions with *B. cocophilus*, *B. xylophilus* and *B. fungivorus* DNA in order to validate specificity and sensibility of the designed primers. For the ITS1/2 forward primer BC1F (5'-AACTACCGTCTTCCGCTGTCG-3') and reverse BC1R (5'-TTGAGCACCAACACGCCGTCA-3') were used. PCR reaction (25µl) was performed by using 2.5µl of PCR Buffer (10x); 0,5 µl of each primer (10mM); 0.25 units of Taq DNA polymerase; 2,0 µl of MgCl<sub>2</sub> (10 mM); 0.5 µl of dNTPs (mM) and 3 µl of DNA template. Amplification was carried out according to the following program: initial denaturation at 92°C por 2 min, 30 reaction cycles at 94 °C for 1min, annealing 55 °C for 45s, extension 72°C for 2 min and a final extension at 72 °C for 5 min.

## RESULTS

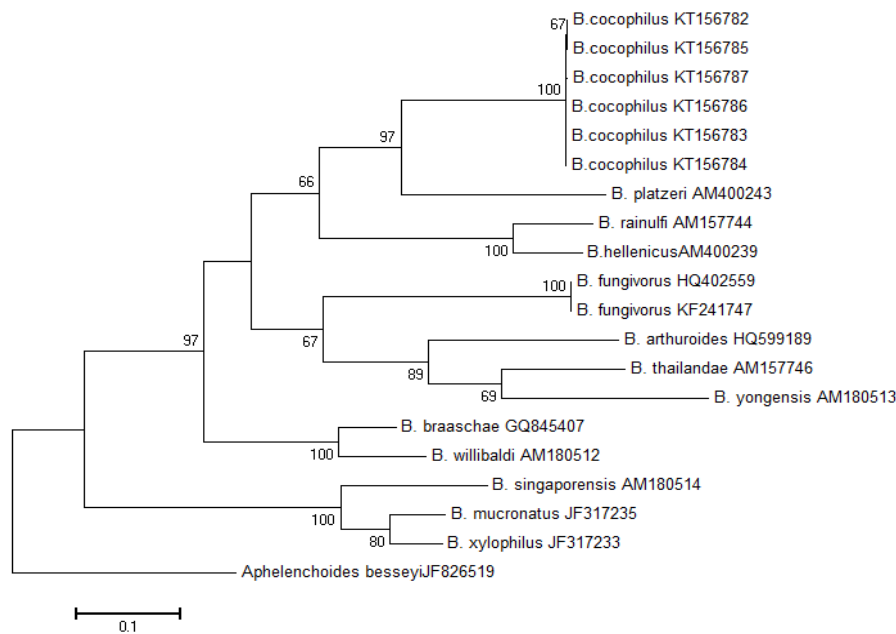
The D2/ 3 sequence alignment consisted of 612 aligned nucleotide positions with 329 variable sites, of which 264 were phylogenetically informative. The aligned ITS sequences consisted of 841bp aligned nucleotide positions with 607 variable sites, of which 546 were phylogenetically informative. Preliminary phylogenetic analyses of D2/3 region of 28S rDNA sequences, using maximum likelihood and a comprehensive data set of species within genus *Bursaphelenchus*, showed that populations from Brazil, Colombia, *B. cocophilus* AY508076 and AY508077 formed one monophyletic group, with 99% bootstrap support, and distinct from other species. Within this clade of *B. cocophilus*, three subclades were formed; first with Brazilian and Costa Rican populations, (AY508076); in the second subclade Colombian populations and then the Honduran population (AY508077) in a single subclade (Figure 2).



**Figure 2** - Maximum likelihood phylogenetic trees inferred from D2/3 region of 28S rDNA showing the relationships among *B. cocophilus* and others species of *Bursaphelenchus*. The Kimura 2-parameter was used as the model for nucleotide substitution. Bootstrap values over 50% (1000 replicates) are displayed on the nodes. All trees are rooted with *Aphelenchoides besseyi*.

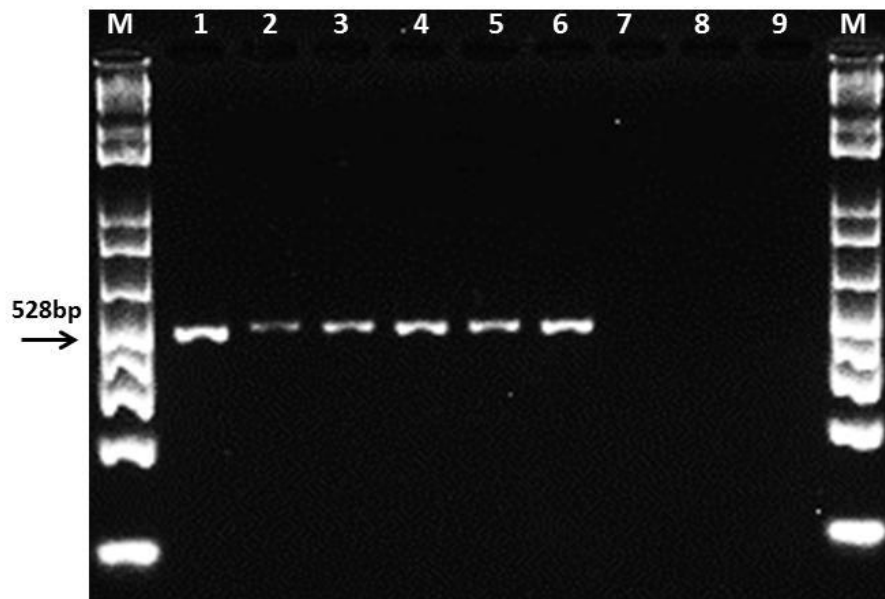
Populations of *B. cocophilus* from Brazil and Colombia formed one single monophyletic group, with 100% of bootstrap support, distinct from other species of the *Bursaphelenchus* in the ITS tree (Figure 3). Based upon the overall topologies of the trees, the sister species of *B. cocophilus* was *B. platzeri* AY508094. However, both regions, ITS 1/ 2 and D 2/ 3 of 28S rDNA, separated *B. cocophilus* from other species listed in the genBank.





**Figure 3** - Maximum likelihood phylogenetic trees inferred from ITS rDNA showing the relationships among *B. cocophilus* and other species of *Bursaphelenchus*. The Kimura 2-parameter was used as the model for nucleotide substitution. Bootstrap values over 50% (1000 replicates) are displayed on the nodes. All trees are rooted with *Aphelenchoides besseyi*.

From the alignment it was possible to identify conserved and non-conserved regions that could potentially be used to design specific PCR primers to *B. cocophilus*. Specific primer sets for detecting *B. cocophilus* were designed carefully via ITS 1/2 alignments, using sequence differences between other sequences *Bursaphelenchus* species. The DNA sequence of the *B. cocophilus* fragment does not have similarity to other sequences in Genbank. After optimizing annealing temperatures, optimum conditions were found suitable for amplification standardized. The BC1F and BC1R primers were able to detect the target species specifically, providing PCR products with the expected size, 528-bp fragment (Figure 4). Nonspecific amplifications did not occur in any of the *B. cocophilus*. PCR without DNA templates served as negative controls and did not generate products.



**Figure 4** - Agarose gel of PCR products using BC1F/R species-specific primers of *Bursaphelenchus cocophilus* populations. Lane order: Lanes 1 to 6: KT156771; KT156770; KT156769; KT156774; KT156773; KT156772; Lane 7: *B. xylophilus*; Lane 8: *B. fungivorus* and lane 9: negative control. Nematode codes are as abbreviated in Table 1. Lane M represents marker DNA of known molecular weights. The amplicon sizes are indicated by arrows.

## DISCUSSION

Although ITS region did not distinguish *B. cocophilus* isolates, this region has been used to analyze genetic diversity of worldwide *B. xylophilus* populations (Canada, China, Japan, Portugal, Russian and USA), allowing group discernment depending upon the country of origin. Also, this region has shown high polymorphism between *B. xylophilus* and *B. mucronatus* populations, inter- and intra-species (Kanzaki and Futai, 2002; Cardoso et al., 2012). Likewise, De Lucas et al. (2011) reported high variability of inter- and intra-populations of *Pratylenchus* spp. based on this molecular marker. In addition to the ITS region, the D 2/3 region of 28S rDNA has also been studied for plant-parasitic nematode taxonomy and species identification (Gu

et al., 2014; Kaplan et al., 2000; Oliveira et al. 2011; Tomalak and Filipiak., 2014 and Tanaka et al., 2014). Based on 28S region, we could clearly distinguish Brazilian and Colombian populations. Comprehensive sequence analysis identified a one-nucleotide (t) exchange specific to the Colombian populations and absent in Brazilian, Costa Rica and Honduras populations.

Genetic diversity analysis of D2/3 region of 28s revealed that Brazilian populations are similarly, except KT156772 show one single nucleotide alteration (G). Colombian populations shows more diversity (tabela 2), isolated KT156778 that showed the most number of altered nucleotide. The low genetic diversity among Brazilian and Colombian populations of *B. cocophilus* suggest one single introduction of the pest in this countries, like observed by Zhang et al., (2008) about Asian and North American populations.

The variability of D 2/3 region and ITS 1/2 the *B. cocophilus* were in accordance with observed in *B. niphades*, where more number of variable sites, five nucleotide alteration, in D 2/3 than ITS, show one single alteration. Nevertheless this region are used as DNA markers to distinguish nematodes of intra- and inter-specific isolates of *B. xylophilus* and *B. mucronatus*, according Kanzaky and Futai (2002), because of their high sequence polymorphism

Another molecular markers such as 18S and COI (date not show) were used but it was not possible amplification, similar to that observed by Ye et al., (2007) for the population of Costa Rica, maybe because to low sequence homology at the primer annealing site (Vossen et al., 2014), in this case can be design degenerate primers.

**Table 2:** Genetic distances among *Bursaphelenchus cocophilus* population based on D2/3 28Sr RNA gene region sequence data.

	Brasil						Colômbia							Costa Rica	Honduras
	71	70	69	74	73	72	78	75	76	77	81	79	80	76	77
<b>KT156771</b>	—	0	0	0	0	1	6	2	2	3	4	2	4	1	3
<b>KT156770</b>	0,000	—	0	0	0	1	6	2	2	3	4	2	4	1	3
<b>KT156769</b>	0,000	0,000	—	0	0	1	6	2	2	3	4	2	4	1	3
<b>KT156774</b>	0,000	0,000	0,000	—	0	1	6	2	2	3	4	2	4	1	3
<b>KT156773</b>	0,000	0,000	0,000	0,000	—	1	6	2	2	3	4	2	4	1	3
<b>KT156772</b>	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	—	5	1	1	2	3	1	3	0	2
<b>KT156778</b>	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,008	—	1	0	2	3	1	3	2	4
<b>KT156775</b>	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,002	0,006	—	0	1	2	0	2	1	3
<b>KT156776</b>	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,002	0,006	0,000	—	1	2	0	2	1	3
<b>KT156777</b>	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,003	0,008	0,002	0,002	—	1	1	1	2	3
<b>KT156781</b>	0,006	0,006	0,006	0,006	0,006	0,005	0,010	0,003	0,003	0,002	—	1	0	3	5
<b>KT156779</b>	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,002	0,006	0,000	0,000	0,002	0,003	—	0	1	3
<b>KT156780</b>	0,006	0,006	0,006	0,006	0,006	0,005	0,010	0,003	0,003	0,002	0,000	0,003	—	3	5
<b>AY508076</b>	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,000	0,008	0,002	0,002	0,003	0,005	0,002	0,005	—	2
<b>AY508077</b>	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,003	0,011	0,005	0,005	0,006	0,008	0,005	0,008	0,003	—

\*Above diagonal shows the number of different sites and below diagonal genetic distances.

Moreover, we also showed that *B. cocophilus* and *B. platzeri* may have shared a common ancestor, grouping distantly from other plant-parasitic nematode species. This last observation corroborates the inferred phylogeny studies of Ye et al. (2007) and Kanzaki et al. (2014).

All the region of the genomes (nuclear and mitochondrial) show mutation over time, and some region are more accessible to nucleotide changes than others. ITS 1/2 sequence can provide useful genetic markers for species, once this region of the rDNA usually show intraspecific variation low (Gasser, 2001).

ITS 1/ 2 region, was also used for design specie-specific primer in the other species of nematode, *Xiphinema* conventional PCR (Oliveira et al., 2004) and real-time PCR (Van Ghelder et al., 2015); *B. xylophilus* nested PCR-based (Takeuchi et al., 2005) and Real-Time (Cao et al., 2005, Ye and Giblin-Davis, 2013); *Meloidogyne hapla*, *M. chitwoodi* and *M. falax* multiplex PCR (Zijlstra, 1997) and *Pratylenchus coffeae* (Saeki et al., 2003). Until now, *B. cocophilus* has been identified based only morphological characteristics or by using molecular marker (28s, 18S and mtCOI) (Ye et al., 2007).

According to Giblin-Davis et al., (1989), morphological markers of *B. cocophilus* such as the presence of preanal papillae, morphology of male bursa and vulva flap preciously described only in *B. cocophilus*, are also present in *B. xylophilus*, *B. seasi* and *B. kevinci*, which is agreed also by Yik; Birchfield, 1981; Giblin; Kaya, 1983; Giblin, Swan & Kaya, 1984. Accurate and quick detection of the plant pathogen, plant parasitic nematode in this case, is very important for prevent this pathogens introduction and is the basis for quarantine regulation (Van Ghelder et al., 2015; Ye and Giblin-Davis, 2013).

The present study was focused on the molecular characterization of *B. cocophilus* populations from Brazil and Colombia using the most

informative ribosomal RNA genetic loci currently used for nematode phylogeny (Marek et al., 2014; Gu et al., 2013; Fouly et al., 1997) and design specie-specific primer for accurate identification of the *B. cocophilus*. The phylogenetic results maybe suggest the spread of RRD in Latin American. Until now, little was known about genetic diversity of *B. cocophilus* populations from Brazil and other RRD-affected countries. The knowledge of intraspecific diversity of *B. cocophilus* will enable a better understanding dynamic population. More studies should be carried out with a larger number of isolates from different regions of Brazil and other countries using other genomic loci, which will generate more information about the genetic structure of *B. cocophilus*.

#### **Acknowledgements**

The authors would like to thank the following researchers for their support: José Mauro Castro, Dulce Warwick, José Inácio, Edilberto Sampaio and also to the company Agropalma, in the name Ricardo Tinoco for helping on sample collection. This work was supported by CAPES-PDSE (Proc. 99999.012780/2013-08) and FAPEMIG, PhD fellowship to first author, CNPq, and FEDER Funds through the Operational Programme for Competitiveness Factors - COMPETE and National Funds through FCT - Foundation for Science and Technology under the Strategic Project PEst-C/AGR/UI0115/2011 and ICAAM - Universidade de Évora.

## REFERENCES

- Araújo JC., 1990. O anel-vermelho do dendê. *Manaus: EMBRAPA, 1990. 21p. (Circular Técnica), 21.*
- Burgermeister W, Braasch H, Metge K, Gu J, Schröder T, Woldt E, 2009. ITS-RFLP analysis, an efficient tool for differentiation of *Bursaphelenchus* species. *Nematology* **11**, 649–668.
- Burgermeister W, Metge K, Braasch H, Buchbach E, 2005. ITS-RFLP patterns for differentiation of 26 *Bursaphelenchus* species ( Nematoda : Parasitaphelenchidae ) and observations on their distribution. **13**, 29–42.
- Cao AX, Liu XZ, Zhu SF, Lu BS, 2005. Detection of the Pinewood Nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, Using a Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay. *Phytopathology* **95**, 566–71.
- Cardoso JMS, Fonseca L, Abrantes I, 2012. Genetic diversity of ITS sequences of *Bursaphelenchus xylophilus* Nematode isolates. **11**, 4508–4515.
- Coomans A, Ley IT De, Jimenez LA, Ley P, 2012. Morphological, molecular characterisation and phylogenetic position of *Longidorus mindanaoensis* n. sp. (Nematoda: Longidoridae) from a Philippine *Avicennia* mangrove habitat. *Nematology* **14**, 285–307.
- Fao, 2011. *Guide to implementation of phytosanitary standards in forestry.*
- Ferris V., Ferris J, Faghihi J, 1993. Variations in spacer ribosomal DNA in some cyst forming species of plant parasitic nematodes. *Fundamental and Applied Nematology* **16**, 177–184.
- Fouly H., Wilkinson HT., Chen W, 1997. Restriction Analysis of Internal Transcribed Spacers and the Small Subunit Gene of Ribosomal DNA among Four *Gaeumannomyces* Species on JSTOR. *Mycologia* **89**, 590–598.
- Futai K, Kanzaki N, 2002. A PCR primer set for determination of phylogenetic relationships of *Bursaphelenchus* species within the *xylophilus* group. *Nematology* **4**, 35–41.
- Gasser RB, 2001. Identification of parasitic nematodes and study of genetic variability using PCR approaches. In: Kennedy M, Harnett W, eds.

*Parasitic Nematodes: Molecular Biology, Biochemistry, and Immunology*. Wallingford, UK: CABI, 53–82.

- Gerber K, Giblin-Davis RM, Escobar-Goyes J, 1990. Association of the red ring nematode, *Rhadinaphelenchus cocophilus*, with weevils from Ecuador and Trinidad. *Nematropica*.
- Van Ghelder C, Reid A, Kenyon D, Esmenjaud D, 2015. Development of a real-time PCR method for the detection of the dagger nematodes *Xiphinema index*, *X. diversicaudatum*, *X. vuittenezi* and *X. italiae*, and for the quantification of *X. index* numbers. *Plant Pathology* **64**, 489–500.
- Giblin-Davis RM., Mundo-Ocampo M., Baldwin JG., Gerber K., Griffith R, 1989. Observations on the morphology of the red ring nematode, *Rhadinaphelenchus cocophilus* (Nemata: Aphelenchoididae). *Revue de Nématologie* **12**.
- Jung J, Han H, Ryu SH, Kim W, 2010. Microsatellite variation in the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner and Bührer) Nickle in South Korea. *Genes & Genomics* **32**, 151–158.
- Kanzaki N, M G-DR, 2012. Aphelenchoidea. In: Mendoza NM, Manzanilla-Lopez R, Hunt D, eds. *Practical Plant Nematology*. London: CABI International, 161–208.
- Kanzaki N, Tanaka R, Giblin-Davis RM, Davies K a, 2014. New Plant-Parasitic Nematode from the Mostly Mycophagous Genus *Bursaphelenchus* Discovered inside Figs in Japan. *PLoS one* **9**, e99241.
- Kaplan DT, Thomas WK, Frisse LM *et al.*, 2000. Phylogenetic Analysis of Geographically Diverse *Radopholus similis* via rDNA Sequence Reveals a Monomorphic Motif. *Journal of nematology* **32**, 134–42.
- De la Peña E, Karssen G, Moens M, 2007. Distribution and diversity of root-lesion nematodes (*Pratylenchus* spp.) associated with *Ammophila arenaria* in coastal dunes of Western Europe. *Nematology* **9**, 881–901.
- Li H, Trinh PQ, Moens M, Waeyenberge L, 2009. Characterisation of *Bursaphelenchus* spp. isolated from packaging wood imported at Nanjing, China. *Nematology* **11**, 375–408.
- De Luca F, Reyes A, Troccoli A, Castillo P, 2011. Molecular variability and phylogenetic relationships among different species and populations of



- Pratylenchus (Nematoda: Pratylenchidae) as inferred from the analysis of the ITS rDNA. *European Journal of Plant Pathology* **130**, 415–426.
- Marek M, Zouhar M, Douda O, Gaar V, Ryšánek P, 2014. Comparative molecular analysis of *Bursaphelenchus vallesianus*, a wood-inhabiting nematode isolated from declining pine trees in the Czech Republic. *Plant Pathology* **63**, 232–242.
- Mekete T, Reynolds K, Lopez-Nicora H, Gray M, Niblack T, 2011. Distribution and diversity of root-lesion nematode (*Pratylenchus* spp.) associated with *Miscanthus × giganteus* and *Panicum virgatum* used for biofuels, and species identification in a multiplex polymerase chain reaction. *Nematology* **13**, 673–686.
- Moens M, Perry RN, 2009. Migratory Plant Endoparasitic Nematodes : A Group Rich in Contrasts and Divergence.
- Mota MM, Takemoto S, Takeuchi Y, Hara N, Futai K, 2006. Comparative Studies between Portuguese and Japanese Isolates of the Pinewood Nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *Journal of nematology* **38**, 429–33.
- Mota M, Vieira P, 2008. *Pine Wilt Disease: A Worldwide Threat to Forest Ecosystems*. The Netherlands: Springer.
- Múnera Uribe GE, Bert W, Vierstraete A, de la Peña E, Moens M, Decraemer W, 2010. Burrowing nematodes from Colombia and their relationship with *Radopholus similis* populations, *R. arabocoffeae* and *R. duriophilus*. *Nematology* **12**, 619–629.
- Oliveira CMG, Eulálio J, Bessi R, Harakava R, 2011. Caracterizações Morfológica e Molecular de *Bursaphelenchus fungivorus* ( Nematoda : Aphelenchida ), Detectado pela Primeira vez no Brasil. , 63–70.
- Oliveira CMG, Fenton B, Malloch G, Brown DJF, Neilson R, 2005. Development of species-specific primers for the ectoparasitic nematode species *Xiphinema brevicolle*, *X. diffusum*, *X. elongatum*, *X. ifacolum* and *X. longicaudatum* (Nematoda: Longidoridae) based on ribosomal DNA sequences. *Annals of Applied Biology* **146**, 281–288.
- Palomares-Rius JE, Cantalapiedra-Navarrete C, Gutiérrez-Gutiérrez C, Liébanas G, Castillo P, 2013. Morphological and molecular characterisation of *Paralongidorus plesioepimikis* n. sp. (Nematoda: Longidoridae) from southern Spain. *Nematology* **15**, 363–378.

- Palomares-Rius J, Landa B, Tanha Maafi Z, Hunt D, Castillo P, 2010. Comparative morphometrics and ribosomal DNA sequence analysis of *Longidorus orientalis* Loof, 1983 (Nematoda: Longidoridae) from Spain and Iran. *Nematology* **12**, 631–640.
- Rozen S, Skaletsky HJ, 2000. Primer3 on the WWW for General Users and for Biologist Programmers. In: Krawetz S, Misener S, eds. *Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology*. Totowa, 365–386.
- Saeki Y, Kawano E, Yamashita C, Akao S, Nagatomo Y, 2003. Detection of plant parasitic nematodes, *Meloidogyne incognita* and *Pratylenchus coffeae* by multiplex PCR using specific primers. *Soil Science and Plant Nutrition* **49**, 291–295.
- Silva HM, 1991. *Metamasius* sp. (Coleoptera, Curculionidae) vetor do *Rhadinaphelenchus cocophilus* agente causador do anel vermelho do dendezeiro. *Embrapa Amazônia Oriental - Séries anteriores (INFOTECA-E)*, 1–4.
- Singh SK, Hodda M, Ash GJ, Banks NC, 2013. Plant-parasitic nematodes as invasive species: characteristics, uncertainty and biosecurity implications. *Annals of Applied Biology*, n/a–n/a.
- Subbotin S a., Baldwin JG, Mundo-Ocampo M, Prado Vera IC Del, 2011. Identification, phylogeny and phylogeography of circumfenestrate cyst nematodes (Nematoda: Heteroderidae) as inferred from analysis of ITS-rDNA. *Nematology* **13**, 805–824.
- Sultana T, Han H, Park J, 2013. Comparison of complete mitochondrial genomes of pine wilt nematode *Bursaphelenchus xylophilus* and *Bursaphelenchus mucronatus* ( Nematoda : Aphelenchoidea ) and development of a molecular tool for species identification. **520**, 39–46.
- Takeuchi Y, Kanzaki N, Futai K, 2005. A nested PCR-based method for detecting the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, from pine wood. *Nematology* **7**, 775–782.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S, 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution* **28**, 2731–9.

- Tanaka SE, Takeuchi Y, Akiba M *et al.*, 2014. *Bursaphelenchus niphades* n. sp. (Tylenchina: Aphelenchoididae) amensally associated with *Niphades variegatus* (Roelofs) (Coleoptera: Curculionidae). *Nematology* **16**, 259–281.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG, 1997. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic acids research* **25**, 4876–82.
- Valadas V, Laranjo M, Mota M, Oliveira S, 2013. Molecular characterization of Portuguese populations of the pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* using cytochrome b and cellulase genes. Molecular characterization of Portuguese populations of the pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* using. *Journal of helminthology* **87**, 457–466.
- Valadas V, Oliveira S, Espada M, Laranjo M, Mota M, Barbosa P, 2012. The pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, in Portugal: possible introductions and spread routes of a serious biological invasion revealed by molecular methods. *Nematology* **14**, 899–911.
- Vicente C, Espada M, Vieira P, Mota M, 2011. Pine Wilt Disease: a threat to European forestry. *European Journal of Plant Pathology* **133**, 89–99.
- Vossen JH, Jo K-R, Vosman BJ, 2014. *Genomics of Plant Genetic Resources* (R Tuberosa, A Graner, E Frison, Eds.). Dordrecht: Springer Netherlands.
- Vrain TC, 1993. Restriction Fragment Length Polymorphism Separates Species of the *Xiphinema americanum* Group. *Journal of nematology* **25**, 361–4.
- Ye W, Giblin-Davis RM, 2013. Molecular characterization and development of real-time PCR assay for pine-wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Parasitaphelenchidae). *PloS one* **8**, e78804.
- Ye W, Giblin-Davis RM, Braasch H, Morris K, Thomas WK, 2007. Phylogenetic relationships among *Bursaphelenchus* species (Nematoda: Parasitaphelenchidae) inferred from nuclear ribosomal and mitochondrial DNA sequence data. *Molecular phylogenetics and evolution* **43**, 1185–97.

- Yoder M, De Ley IT, King IW *et al.*, 2006. DESS : a versatile solution for preserving morphology and extractable DNA of nematodes. *Nematology* **8**, 367–376.
- Zhang K, Liu H, Sun J *et al.*, 2008. Molecular Phylogeny of Geographical Isolates of *Bursaphelenchus xylophilus*: Implications on the Origin and Spread of this Species in China and Worldwide. *Journal of nematology* **40**, 127–37.
- Zhou Z, Sakaue D, Wu B, Hogetsu T, 2007. Genetic Structure of Populations of the Pinewood Nematode *Bursaphelenchus xylophilus*, the Pathogen of Pine Wilt Disease, Between and Within Pine Forests. *Phytopathology* **97**, 304–10.
- Zijlstra C, 1997. A fast PCR assay to identify *Meloidogyne* hapla, *M. chitwoodi* and *M. fallax*, and to sensitively differentiate them from each other and from *M. incognita* in mixtures. *Fundam Appl Nematol* **20**, 505–511.

**Artigo 2: Atividade nematicida de moléculas orgânicas a *Meloidogyne incognita***

A. P. Silva<sup>1</sup>; V. P. Campos<sup>1</sup>; L. E. Lopez<sup>1</sup>; A. F. Barros<sup>1</sup>; E. A. Pozza<sup>1</sup>; D. F. Oliveira<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Fitopatologia–Universidade Federal de Lavras, POB 3037, 37200-000, Lavras - MG, Brazil.

<sup>2</sup> Departamento de Química- Universidade Federal de Lavras, POB 3037, 37200-000, Lavras - MG, Brazil.

**Artigo preparado de acordo com as normas do periódico *Phyto Pathology***

## Resumo

Moléculas voláteis alteram os ecossistemas e podem ser usadas no desenvolvimento de produtos comerciais, como nematicidas. Testes *in vitro* com 30 moléculas foram feitos colocando o composto puro sobre tira de papel de filtro esterilizada em um dos compartimentos da placa de petri bipartida. No lado contíguo, foi colocada uma suspensão de juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita*, possibilitando ao composto chegar à suspensão aquosa do nematoide apenas pelo ar. A exposição aos vapores de 13 moléculas, dentre as 30 testadas, por 24 horas causou imobilidade dos J2 superior a 90%. E quando esses J2 foram inoculados em tomateiros, ocorreu redução de suas infectividades chegando a zero para a maioria das moléculas com a reprodução diretamente proporcional à infectividade. Entre os mais tóxicos aos J2 ficaram os compostos benzaldeído, hexyl alcohol e octan-3-ol. Todos os J2 expostos aos vapores de benzaldeído por 1 hora ficaram imóveis. Valores semelhantes só foram alcançados quando os J2 foram expostos por 10 horas aos vapores de hexyl alcohol e de octan-3-ol. Também a infectividade e reprodução de *M. incognita* foram mais reduzidas por períodos curtos de exposição dos J2 ao vapor de benzaldeído em comparação com o hexyl alcohol e octan-3-ol. Portanto, períodos mais breves de exposição aos vapores podem diferenciar ainda mais os graus de toxicidade de moléculas a nematoide.

## Introdução

Os fitonematoides em geral causam perdas estimadas em cerca de \$ 125 bilhões de dólares à agricultura mundial (SASSER; FRECKMAN, 1987). Dentre as espécies mais patogênicas, destaca-se *Meloidogyne incognita* que é encontrada em quase todos os países, sendo, provavelmente, a que mais causa danos e prejuízos às culturas (TRUDGILL; BLOK, 2001). Ela é capaz de parasitar mais de 2.000 espécies de plantas (SASSER, 1980) englobando a maioria das culturas de exploração agrícola e ornamentais. Por sua importância para o agronegócio, essa espécie foi escolhida para ser o organismo teste em ensaios de toxicidade com compostos voláteis emitidos por plantas, fungos e bactérias em fitonematoide (BARROS et al., 2014a; CAMPOS; PINHO; FREIRE, 2010; FREIRE et al., 2012).

Os compostos voláteis desempenham funções diversificadas na natureza, com destaques para os efeitos na interação e competição entre plantas e na atração de predadores e insetos polinizadores (DUDAREVA; PICHERSKY; GERSHENZON, 2004; DUDAREVA et al., 2006; MAFFEI, 2010), além de causar efeitos tóxicos a diversos componentes do ecossistema, entre eles aos herbívoros (DICKE; VAN LOON, 2000; VANCANNEYT et al., 2001) e aos fitopatógenos (BARROS et al., 2014b; CAMPOS; PINHO; FREIRE, 2010; FERNANDO et al., 2005; FREIRE et al., 2012; GU et al., 2007; HUANG et al., 2010; RIGA; LACEY; GUERRA, 2008; WAN et al., 2008; ZOU et al., 2007).

Antes mesmo da ciência se aprofundar no conhecimento sobre as moléculas gasosas da natureza, já se pensou no uso delas no controle de fitonematoide. As moléculas vapores constituíram-se nos primeiros nematicidas comerciais, conhecidos como fumigantes de solo (CHRISTIE, 1959) e que não deixavam resíduos tóxicos nos produtos comercializados. A substituição dos fumigantes por moléculas não voláteis como os

organofosforados e organocarbamatos, que deixam por mais tempo resíduos nos produtos agrícolas, contaminam o ambiente e o homem e elevam a preocupação da sociedade com a ecologia e a saúde humana (HAYDOCK et al., 2013) levando muitos deles à proibição de comercialização ultimamente. Os nematicidas voláteis (fumigantes), que comprovaram mais tarde, periculosidade à saúde humana, como o nemagon (1,2-Dibromo-3-chloropropane) e o agressor da camada de ozônio como o brometo de metila foram retirados do mercado (NYCZEPIR; TOMAS, 2010).

No entanto, com a vantagem de permanecer por pouco tempo exercendo seu efeito tóxico no ambiente e nos alimentos, o produto orgânico volátil pode ressurgir como opção para produção comercial de molécula nematicida menos tóxica ao homem e menos ameaçadora à camada de ozônio, protetora da vida na terra.

Os compostos voláteis são abundantes na decomposição de qualquer material orgânico e são também emitidos por plantas e por culturas fúngicas e bacterianas (BARROS et al., 2014a; CAMPOS; PINHO; FREIRE, 2010; FREIRE et al., 2012; GU et al., 2007; HUANG et al., 2010; RIGA; LACEY; GUERRA, 2008). A produção de moléculas voláteis por plantas e microrganismos trouxe a possibilidade de seu uso no controle de fitonematoides por meio da biofumigação (BARROS et al., 2014a; GRIMME et al., 2007; MERCIER et al., 2007; RIGA; LACEY; GUERRA, 2008). Assim, a biofumigação com produtos orgânicos emissores de voláteis tóxicos a fitonematoides expôs à visão prática do uso deles na agricultura (GRIMME et al., 2007). Em adição, cresceu também a curiosidade em buscar alternativas baseadas na síntese de moléculas a partir daquelas encontradas na natureza (CABONI et al., 2012a).

Como ocorre na prospecção de moléculas não voláteis tóxicas a fitopatógenos (AISSANI et al., 2013; CABONI et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2014), surgiu nas últimas décadas, o desenvolvimento de técnicas para a



prospecção de moléculas vapores tóxicas a fitonematoides (BARROS et al., 2014b; FERNANDO et al., 2005). Nesta busca por moléculas tóxicas a nematoides entre os compostos orgânicos vapores (COVs) emitidos sempre em misturas pelas plantas e microrganismos, a cromatografia gasosa constitui ferramenta bastante útil (BARBOSA et al., 2010; BARROS et al., 2014b; CHUANKUN et al., 2004; FREIRE et al., 2012; GU et al., 2007; HUANG et al., 2010; LIU et al., 2008; NTALLI et al., 2010, 2011). Assim, com o conhecimento da natureza de cada molécula da mistura de COVs emitidos por plantas e microrganismos surgiu, também, a necessidade de investigar sobre o efeito tóxico de cada componente dessa mistura a fitopatógenos (AISSANI et al., 2013; CABONI et al., 2012a, 2012b; FERNANDO et al., 2005; LI et al., 2012). Embora já se conheça, há algum tempo, que vários COVs (em mistura) emitidos por plantas e microrganismos são tóxicos a fitonematoides (Barros et al., 2014b; Caboni et al., 2013; Campos et al., 2010; Freire et al., 2012; Gu et al., 2007), ainda são poucos os estudos sobre o efeito tóxico isolado das moléculas que entram na composição dessas emissões (AISSANI et al., 2013; CABONI et al., 2012a; KIMURA et al., 2007).

Ênfase tem sido dada ao estudo de toxicidade de moléculas gasosas *in vitro* afetando a mobilidade e causando morte dos fitonematoides (CABONI et al., 2012b; FERNANDO et al., 2005; GU et al., 2007; LI et al., 2012), com poucos estudos *in vivo* sobre a infectividade e reprodução dos nematoides em hospedeiro após exposição às moléculas gasosas (Barros et al., 2014b; Freire et al., 2012; Huang et al., 2010). Ainda bem menos estudados são os efeitos no fitonematoide por exposição aos vapores em períodos curtos de tempo (Barros et al., 2014a).

Desta forma, objetivou-se neste trabalho: i) avaliar os efeitos tóxicos a *M. incognita* de moléculas orgânicas, comercialmente disponíveis, mas com relatos anteriores de emissões por plantas e microrganismos; ii) estudar o efeito delas na infectividade e reprodução de *M. incognita* em tomateiros

infestados por juvenis de segundo estágio (J2) após exposição aos vapores das moléculas; iii) definir, para alguns, algumas moléculas, o menor período de tempo de exposição dos J2 que ainda causa toxicidade e redução da infectividade e reprodução do nematoide.

## **Material e Métodos**

### **Obtenção de ovos e juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne incognita***

O inóculo para os ensaios foi obtido de populações puras de *M. incognita*, caracterizadas através de análises eletroforéticas de fêmeas e pelo DNA extraído de J2. A população de *M. incognita* foi multiplicada durante 3 meses em plantas de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L. cv. 'Santa Cruz'), em vasos de 1, 5l com substrato Multiplant© em casa de vegetação. Ao final desse período, as raízes foram separadas do solo em água parada e lavadas, cuidadosamente, e extraídos os ovos conforme técnica de (HUSSEY; BARKER, 1973). Os ovos obtidos foram usados para a montagem do ensaio de exposição aos vapores. Parte deles foram colocados em câmara de eclosão e deixados em incubadora a 28°C. Os J2 eclodidos no segundo e no terceiro dia após a montagem da câmara foram utilizados nos ensaios.

### **Compostos orgânicos vapores empregados nos ensaios.**

Para os testes *in vitro* foram usados 30 moléculas puras encontradas no comércio (sigma-aldrich), mas que são emitidas por microrganismos e plantas, segundo dados da literatura. As moléculas puras adquiridas no comércio foram utilizadas conforme recebidas (Tabela 1).

**Tabela1:** Moléculas orgânicas voláteis emitidas por fungo (F), bactéria (B) e planta (P), que foram adquiridas no comércio.

Nº	Moléculas	Organism o emissor	Referências
1	(±)-linalool	P, B	Ntalli et al.,2010; Zhang et al.,2012
2	1,3-dimethoxybenzene	*	
3	2,4,4-trimethylpent-1-ene	*	
4	2,6-dimethylheptan-4-one	*	
5	2-ethylhexan-1-ol	P	Barros et al., 2014
6	3,3,5-trimethylcyclohexanone	*	
7	4-hydroxybutan-2-one	*	
8	Alcool Iso-Amílico	P	
9	Benzaldeido	P, B, F	Fernando; Gu et al., 2007; Barros et al., 2014; Zou et al., 2004; Chuankun et al., 2004 Kudalkar et al., 2012
10	Butane-1,2-diol	*	
11	Butane-1,3-diol	P	Jerkovic&Marijanovic, 2009
12	Butane-1,4-diol	*	

13	Butane-2,3-diol	P, B	Effmert et al., 2012; Jerkovic&Marijanovic, 2009
14	<i>Cis</i> -2-hexen-1-ol	*	
15	Cyclohexene	B	Gu et al., 2007; Li et al., 2012
16	Decan-2-one	B	Liu et al., 2008
17	Decanal	B	Chuankun et al., 2004; Fernando et al., 2005; Gu et al., 2007; Li et al., 2008; Barbosa et al., 2010
18	Dodecan-2-one	B	Li et al., 2008
19	Hexyl alcohol / 1Hexanol	P, B	Fernando et al., 2005; Vaughny, 1993; Splivallo et al., 2007
20	Hexyl acetate	P	Barros et al., 2014; Silva et al., 2013
21	Linalyl acetate	P	Nahiba et al., 2010; Ntalli et al., 2010; Barbosa et al, 2010
22	Nerolidol	P	Ntalli et al.,2010
23	Nonan-2-one	B	Gu et al., 2007; Huang et al., 2010; Liu et al., 2008; Barbosa et al., 2010
24	Nonane	B	Fernando et al., 2005; Gu et al., 2007; Huang et al., 2010
25	Octan-1-ol	F	Effmert et al., 2012
26	Octan-2-ol	B	Gu et al., 2007; Li et al., 2012
27	Octan-3-ol	P, F	Barbosa et al., 2010; Splivallo et al., 2007

28	Undecan-2-one	B	Gu et al, 2007; Huang et al, 2010; Li et al., 2012; Liu et al., 2008
29	Undecan-6-one	B	Fernando et al., 2005; Li et al., 2012
30	$\alpha$ -Terpineol	P, B	Gu et al., 2007; Ntalli et al., 2010

\*moléculas com potencial nematocida/nematostática, porém ainda não constatadas em COVs emitidos por plantas e microorganismos.

### **Seleção de moléculas puras quanto à toxicidade pela exposição de J2 de *Meloidogyne incognita* aos vapores.**

Previamente, foi feito um teste com dois processos para colocação da molécula, em um compartimento da placa bipartida foi usado tira de papel filtro ou um recipiente de 1,5cm de diâmetro. Melhores resultados foram obtidos colocando a molécula sobre tiras de papel, conforme descrito por Gu et al., 2007, sendo este método empregado em todos os ensaios.

Assim, este ensaio foi realizado com 30 moléculas puras em placas bipartidas (Tabela 1), empregando a metodologia desenvolvida por Fernando et al., 2005 e Gu et al., 2007, com adaptações. Brevemente, em um compartimento da placa bipartida foi vertido meio TSA. Após solidificação, foi depositada sobre o meio uma tira de papel filtro de 2x2 cm esterilizada. Sobre o papel, foram pipetados 100  $\mu$ l do composto a ser testado. No compartimento contíguo foram colocados 100 J2 de *M. incognita* em uma suspensão aquosa de 1ml. As placas foram vedadas com filme plástico PVC e incubadas a 25°C. a seguir, foram avaliadas a mobilidade e imobilidade, imediatamente, após a retirada do filme plástico e também 24 horas após a primeira avaliação, na ausência dos vapores. Quatorze moléculas foram selecionadas, dentre as 30 testadas, para o teste a seguir sobre infectividade e reprodução, sendo 11 delas que causaram elevada imobilidade e 3 que causaram baixa imobilidade.

### **Infectividade e reprodução de Juvenis de segundo estágio e ovos de *Meloidogyne incognita* após exposição aos vapores**

Juvenis de segundo estágio (J2) de *M. incognita* foram expostos aos vapores das 14 moléculas puras selecionadas anteriormente, empregando a mesma metodologia já usada no ensaio anterior. Assim, 600 J2 de *M. incognita* em uma suspensão de 1ml foram expostos aos vapores dessas moléculas por 24 horas, em placas vedadas e deixadas em incubadora no escuro a 25°C. A seguir, os J2 foram inoculados em tomateiros (cv. ‘Santa Cruz’) com 30 dias após semeadura e crescidos em substrato agrícola (Multiplant<sup>®</sup>), em bandejas de isopor com 120 células.

Usando o mesmo procedimento, ovos de *M. incognita* foram expostos aos vapores das mesmas moléculas. Assim, 1ml de uma suspensão aquosa contendo 2000 ovos foi colocado em um dos compartimentos da placa bipartida. No compartimento contíguo, foram colocados 100µl do composto a ser testado, seguindo a metodologia já descrita. Como controle, a água substituiu o composto, em um dos compartimentos e no compartimento contíguo foram colocados os ovos em suspensão aquosa. As placas foram fechadas, vedando-as com filme plástico PVC<sup>®</sup> e colocadas por 24 horas em incubadoras no escuro a 25°C. Após exposição, os ovos foram inoculados em tomateiros (cv. ‘Santa Cruz’) com 30 dias após semeadura e crescidos em substrato agrícola (Multiplant<sup>®</sup>), em bandejas de isopor com 96 células.

Após 45 dias da inoculação, a parte aérea das plantas inoculadas, tanto com J2 ou como ovos, foram cortadas. As raízes foram separadas do solo em água parada contida em baldes. A seguir, elas foram colocadas sobre papel absorvente para eliminação do excesso de água e posteriormente pesadas. Foram, então, contadas as galhas por sistema radicular. A seguir, as raízes foram cortadas em pedaços de 0,5 cm e os ovos extraídos como descrito por Hussey and Barker, 1973. A suspensão aquosa de ovos foi colocada em

lâmina de Peters, para contagem do número de ovos por sistema radicular. Foram então calculados o número de galhas e de ovos por grama de raiz de tomateiro.

### **Tempo de exposição de *Meloidogyne incognita* aos vapores**

Para este ensaio foram utilizados os três compostos, benzaldeído, hexan-1-ol e octan-3-ol, que causaram imobilidade superior a 90% e alta redução no número de galhas e ovos após inoculação dos J2 expostos aos vapores em tomateiros (Figuras 2 e 3). Assim, 500µl de uma suspensão aquosa com, aproximadamente, 100 J2 de *M. incognita* foram colocados em um dos compartimentos. No compartimento contíguo foi colocado o composto a testar. Os J2 foram expostos por 1, 3, 5, 10 ou 24 horas ao vapor emitido por cada molécula. Como controle, a água substituiu a molécula. As placas foram fechadas e vedadas com filme plástico PVC® e colocadas em incubadora no escuro a 25°C. Ao final de cada período de exposição dos J2 ao vapor, a placa foi aberta e realizada a contagem dos J2 móveis e imóveis.

Seguindo procedimento semelhante 600 J2 de *M. incognita* foram expostos por 1, 3, 5, 10 e 24 horas ao vapor de cada uma das 3 moléculas selecionadas para o ensaio. Após cada período de exposição, os J2 foram inoculados em tomateiro com 30 dias após semeadura. Aos 45 dias após inoculação foram avaliados os números de galhas e de ovos por grama de raiz de tomateiro.

### **Análise dos dados e estatística**

Os ensaios foram montados em delineamento inteiramente casualizado com 4 repetições dos tratamentos e todos os ensaios foram repetidos uma vez. O cálculo do percentual de imobilidade em cada método testado, foi feito pela subtração da imobilidade ocorrida na testemunha, de

acordo com a fórmula de Schneider Orelli (1981):  $\{[(\% \text{ imobilidade no método empregado}) - (\% \text{ imobilidade no controle})] / (100 - (\% \text{ imobilidade no controle}))\} \times 100$ . A percentagem da imobilidade no controle, para equação acima, foi considerada a média das repetições no controle - água. A atividade nematicida/nematostática (AN), avaliada pela imobilidade dos J2, foi calculada pela média das quatro repetições. A categoria dos vapores, quanto à toxicidade, foi baseada na análise de agrupamento feita pelo teste de Scott and Knott (1974) a 5% de probabilidade, definindo então para imobilidade logo após a retirada do filme plástico, as seguintes categorias:  $100 \leq AN \leq 96$  (I);  $90 \leq AN \leq 88$  (II);  $87 \leq AN \leq 80$  (III);  $79 \leq AN \leq 27$  (IV);  $29 \leq AN \leq 26$  (V);  $20 \leq AN \leq 22$  (VI) e  $13 \leq AN \leq 4$  (VII). Assim as categorias definidas foram caracterizadas como: muito alta AN (I), alta (II), moderadamente alta (III), moderada (IV), moderadamente baixa (V), baixa (VI) e sem atividade (VII). Para imobilidade 24 horas após a retirada da vedação, foram definidos os seguintes grupos:  $99 \leq AN \leq 100$  (I);  $88 \leq AN \leq 97$  (II);  $84 \leq AN \leq 86$  (III);  $83 \leq AN \leq 34$  (IV);  $33 \leq AN \leq 28$  (V);  $29 \leq AN \leq 21$  (VI) e  $20 \leq AN \leq 3$  (VII). A categoria VII englobou três grupos estatisticamente distintos maiores que o controle, aqui considerados sem atividade. Assim os grupos definidos foram caracterizados como: muito alta NA (I), alta (II), moderadamente alta (III), moderada (IV), moderadamente baixa (V), baixa (VI) e sem atividade (VII). O experimento sobre infectividade e reprodução de J2 após exposição aos vapores foi montado em esquema fatorial. Foi realizado teste de normalidade (Shapiro-wilk) de todos dados. Quando não atenderam aos pressupostos da normalidade, esses dados foram transformados em  $\arcsen(x+10)$  (ovos/g.raiz) e  $\log(x+10)$  (nº galhas/g.raiz). Após as transformações, fez-se a análise de variância utilizando-se o programa estatístico SISVAR. As médias de cada tratamento foram agrupadas pelo teste de Scott e Knott (1974) a  $P \leq 0,05$ . O ensaio sobre tempo de exposição foi realizado em esquema fatorial e analisado por regressão ajustando aos modelos mais adequados.





## Resultados

### Seleção de moléculas puras quanto à toxicidade pela exposição de J2 de *Meloidogyne incognita* aos vapores

Os vapores das 30 moléculas demonstraram diferentes efeitos (muito alta, alta, moderadamente alta, moderada, baixa, muito baixa e sem atividade nematicida/nematostática) em J2 de *M. incognita*. Em um extremo, a maioria das moléculas (17) demonstrou alta e muito alta atividade nematicida (AN acima de 90%) de imobilidade de J2. No extremo oposto, cerca de 10 moléculas causaram 5 a 35 % de imobilidade nos J2 (Tabela 2).

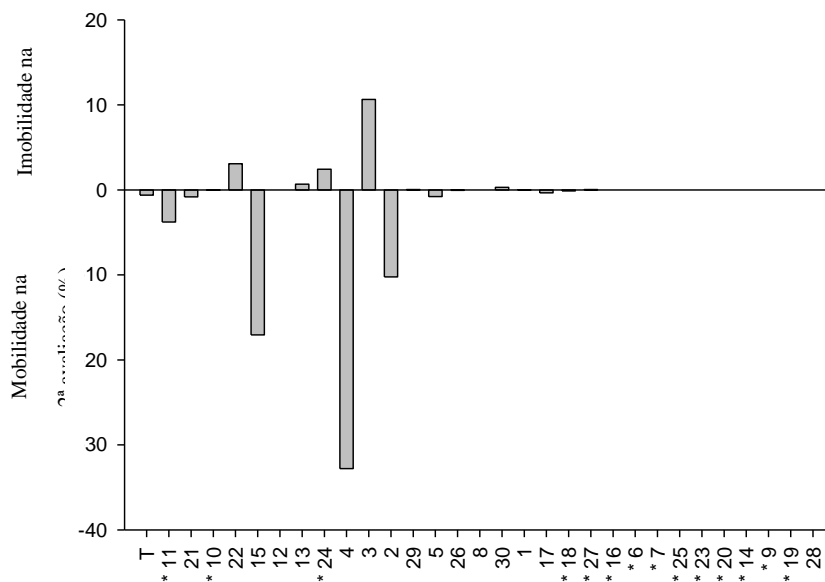
Foram observados poucas variações entre as avaliações de imobilidade de J2, no momento e 24 após a primeira avaliação entre as moléculas que causaram acima de 80% de imobilidade. Mais variações ocorreram entre aquelas que causaram menos de 35 % de imobilidade de J2. As moléculas pertencentes às categorias de AN muito alta e alta são as mesma nas duas avaliações. Em geral, foram poucas moléculas que apresentaram diferenças entre as duas avaliações de atividade nematicida com destaque para as menos ativas. A imobilidade aumentou significativamente na segunda avaliação quando os J2 foram expostos aos vapores da molécula 3 (2,4,4-trimethylpent-1-ene). As maiores reversões de imobilidade para mobilidade ocorreram em J2 expostos aos vapores das moléculas 2, 4 e 8 (2,6-dimethylheptan-4-one, cyclohexene e 1,3-dimethoxybenzene) (Figura 1). Das 14 moléculas selecionadas para os testes sobre infectividade e reprodução à frente, butane-1,3-diol, butane-1,2-diol e nonane causaram neste ensaio, respectivamente, imobilidades de 7,0%, 10,1% e 28,9% nos dois períodos de avaliação. As demais 11 moléculas escolhidas causaram imobilidade entre 99,2% a 100% (Tabelas 1 e 2).

**Tabela 2: Moléculas identificadas por números equivalentes às descritas na tabela anterior, com atividades nematocidas (AN) a *Meloidogyne incognita***

Imobilidade de juvenis de segundo estágio	Moléculas com NA enquadrada em cada categoria						
	I	II	III	IV	V	VI	VII
Logo após a retirada do filme plástico	6, 7, 9, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 23, 25, 27, 28	1, 8, 2, 26, 30	5, 2, 29	4	15, 24	3, 13	10, 11, 12, 22, 21
<b>Total</b>	<b>13</b>	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>5</b>
24 horas após retirada do filme plástico	6, 7, 9, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 23, 25, 27, 28	1, 8, 26, 30	5, 29	2	3	4, 24	10, 11, 12, 13, 15, 21, 22
<b>Total</b>	<b>13</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>7</b>

I a VII= categoria de AN definidas de acordo com o teste de Scott e Knott, 1974.

I = muito alta; II = alta; III = moderadamente alta; IV = moderada; V = baixa; VI = muito baixa e VII = sem AN



**Figura 1:** Diferença percentual entre a imobilidade 24 horas após exposição aos vapores (segunda avaliação) e imediatamente após exposição (primeira avaliação) de juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita*. Os números referem-se as moléculas listadas na Tabela1. \*moléculas selecionadas para os ensaios de infectividade e reprodução (14 compostos). T: Testemunha.

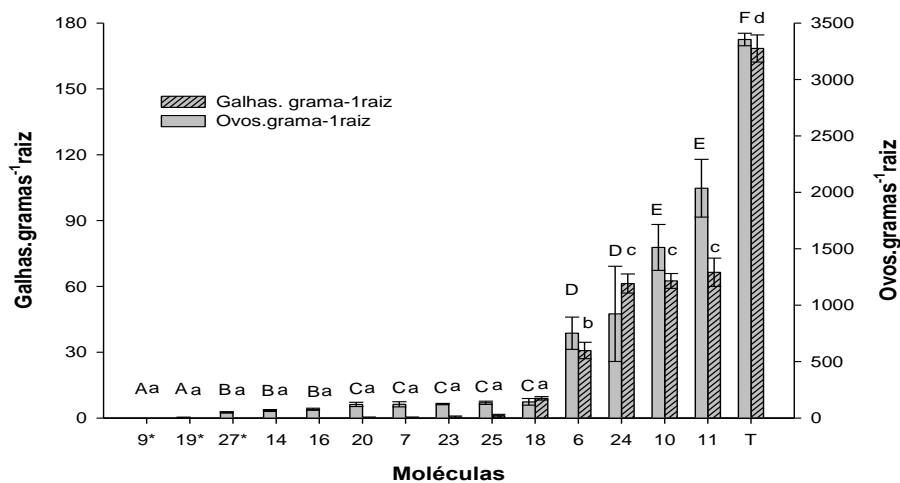
Das moléculas que causaram muito alta imobilidade, nos dois períodos de avaliação foram escolhidas octan-1-ol, octan-3-ol e benzaldeído para utilização nos ensaios sobre período de exposição dos J2 a seus vapores (Tabela 2).

### **Infectividade e reprodução de Juvenis de segundo estágio e ovos de *Meloidogyne incognita* após exposição aos vapores**

A infectividade, avaliada pelo número de galhas, foi mais elevada ( $P \leq 0,05$ ) quando os J2 foram expostos aos vapores das moléculas 24, 10 e 11 (nonane, butane-1,2-diol e butane-1,3-diol), que correspondem àquelas que apresentaram J2 com as menores imobilidades (Tabela 2), porém ainda maiores ( $P \leq 0,05$ ) do que no controle. Quando os J2 foram expostos aos

vapores das moléculas 9, 19, 27, 14, 16, 20, 7, 23, 25 e 18 (benzaldeído, hexyl alcohol, octan-3-ol, cis-2-hexen-1-ol, decan-2-one, hexyl acetate, 4-hydroxybutan-2-one, dodecan-2-one, nonan-2-one e octan-1-ol) e inoculados em tomateiros, resultaram em valores nulos de galhas, ou próximo delas. Entre esses dois grupos, a molécula nº 6 (3,3,5-trimethylcyclohexanone) diferiu deles estatisticamente (Figura 2).

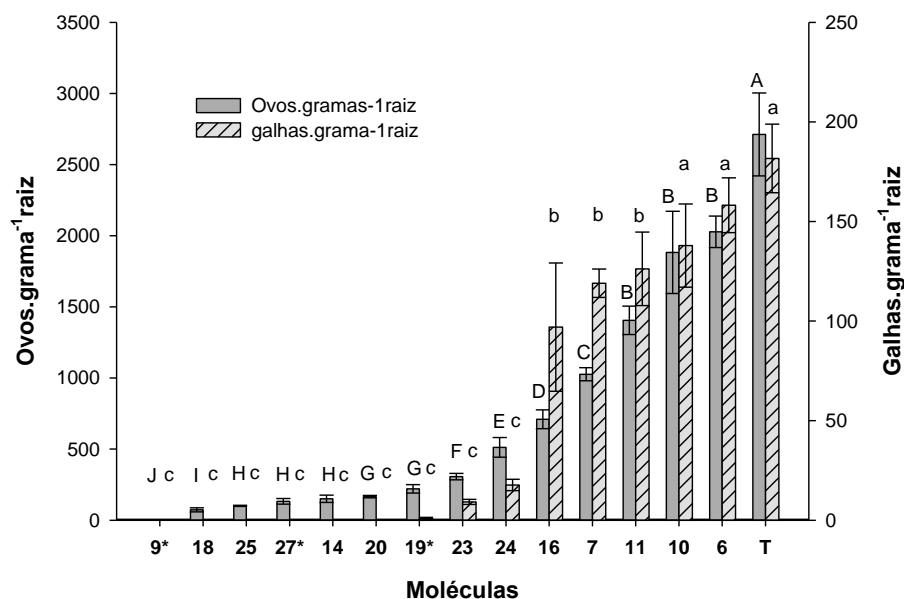
A reprodução, avaliada pelo número de ovos, ocorreu em maior quantidade, porém ainda inferiores à testemunha ( $P \leq 0,05$ ), quando os J2 foram expostos aos vapores das mesmas moléculas que induziram aos J2 a causar os maiores valores de galhas. A maioria das moléculas após vapores reduziram a infectividade dos J2 a elas expostos, também reduziram a reprodução. As moléculas nº 9, 19 e 27 (benzaldeído, hexyl alcohol, octan-3-ol) escolhidas para os testes sobre tempo de exposição dos J2 aos seus vapores, causaram nos J2 redução significativa no número de galhas e ovos (Figura 2).



**Figura 2:** Infectividade (nº de galhas) e reprodução (nº de ovos) de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne incognita* em tomateiro após exposição por 24 horas aos gases dos compostos orgânicos. Os números referem-se às moléculas listadas na Tabela 1. T: testemunha. \*Moléculas escolhidas para o teste sobre tempo de exposição. As barras representam o erro padrão da média. Letras maiúsculas (ovos.grama<sup>-1</sup>raiz) e minúsculas (galhas.grama<sup>-1</sup>raiz)

<sup>1</sup>raiz) diferentes indicam diferença estatística significativa a nível de 5% de probabilidade pelo teste de Scott-knott, 1974.

A infectividade dos J2 eclodidos de ovos expostos aos vapores, avaliada pelo número de galhas, resultante dos ovos expostos aos vapores das moléculas nº 6 e 10 (3,3,5-trimethylcyclohexanone e butane-1,2-diol) foi semelhante ( $P \leq 0,05$ ) a testemunha. Valores altos do número de galhas, porém, ainda menores que a testemunha ( $P \leq 0,05$ ), ocorreram quando os ovos foram expostos aos vapores das moléculas 11, 7 e 16 (Butane-1,3-diol, 4-hydroxybutan-2-one e decan-2-one), sem diferença entre eles. A reprodução de *M. incognita* a partir de ovos expostos aos vapores de qualquer molécula foi reduzida significativamente em relação à testemunha. Valores mais altos e diferentes dos demais no número de ovos.grama de raiz do tomateiro, resultaram da exposição dos ovos aos vapores das moléculas 6 e 10 (3,3,5-trimethylcyclohexanone e butane-1,2-diol). Valores ainda altos de reprodução foram observados quando os ovos foram expostos as vapores das moléculas 11, 7, 16 e 24 (butane-1,3-diol, 4-hydroxybutan-2-one, decan-2-one e nonane). A exposição dos ovos de *M. incognita* aos vapores das moléculas 23, 19, 20, 14, 27, 25, 18 e 9 (nonan-2-one, 1hexanol, hexyl acetate, cis-2-hexen-1-ol, octan-3-ol, octan-1-ol, dodecan-2-one e benzaldehyde) resultaram no número baixo da reprodutividade deste nematoide no tomateiro (Figura 3). As moléculas 6 e 7 (3,3,5-trimethylcyclohexanone e 4-hydroxybutan-2-one) causaram menores efeitos danosos em ovos do que em J2 do mesmo nematoide (Figura 2 e 3).

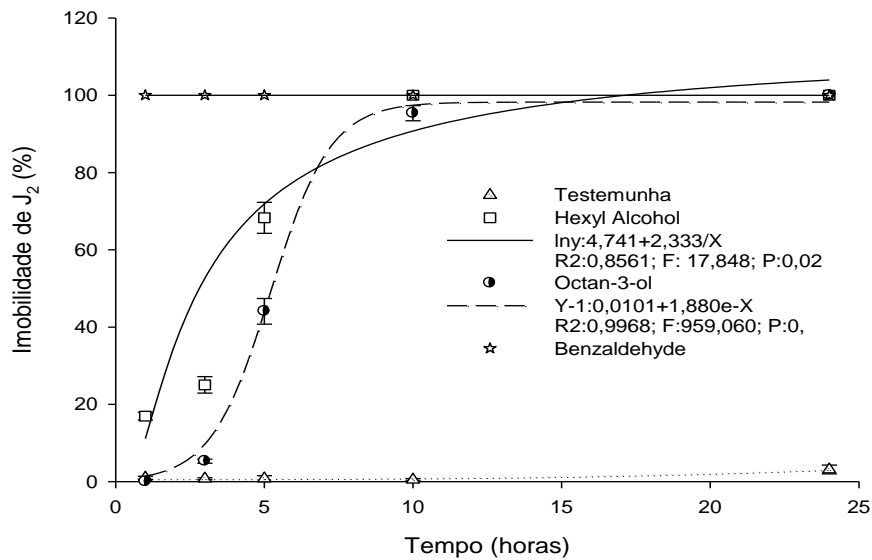


**Figura 3:** Infectividade (nº de galhas) e reprodução (nº de ovos) de *Meloidogyne incognita* a partir de ovos expostos por 24 horas aos gases dos compostos orgânicos. Os números referem-se às moléculas listadas na Tabela 1. T: testemunha. \*Moléculas escolhidas para o teste sobre tempo de exposição. As barras representam o erro padrão da média. Letras maiúsculas (ovos.grama<sup>-1</sup>raiz) e minúsculas (galhas.grama<sup>-1</sup>raiz) diferentes indicam diferença estatística significativa a nível de 5% de probabilidade pelo teste de Scott-knott.

### Tempo de exposição de *Meloidogyne incognita* aos vapores.

Houve interação significativa entre as moléculas testadas (hexyl alcohol, octan-3-ol, benzaldeído e testemunha) e tempo de exposição de J2 em relação à imobilidade ( $P < 0,001$ ), infecção (nº de galhas) e reprodução (nº de ovos) ( $P < 0,001$ ) de *M. incognita*. A exposição dos J2 aos vapores das moléculas por tempos inferiores a 24 horas, resultou em efeitos diferentes. O vapor do benzaldeído causou 100% de imobilidade a partir de 1 hora de exposição dos J2. Valores mais baixos na imobilidade ocorreram por exposição dos J2 por períodos inferiores a 10 horas aos vapores dos compostos hexyl alcohol e octan-3-ol. Em 5 horas de exposição dos J2 ao vapor de hexyl alcohol, a imobilidade foi superior a 65%. A partir de 10 horas de exposição dos J2 aos vapores, tanto de hexyl alcohol como octan-3-

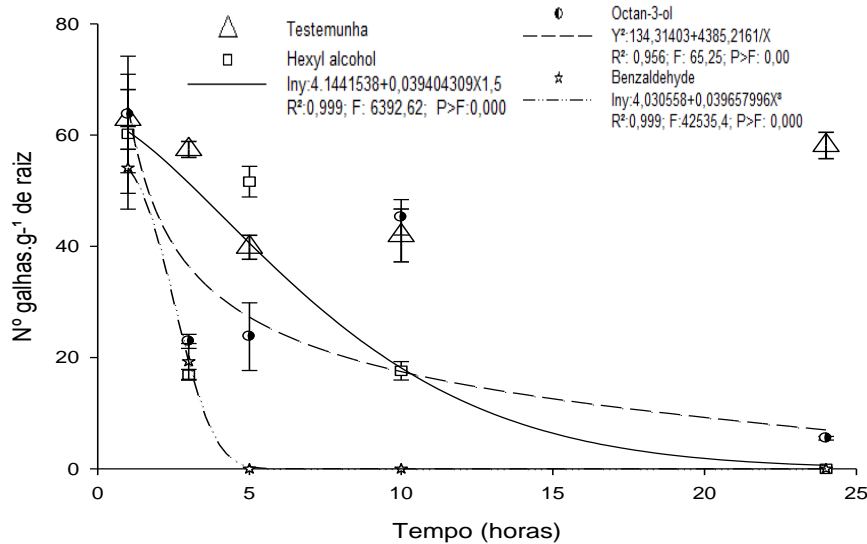
ol, a imobilidade foi superior a 95%, aproximando-se dos valores causados pelo benzaldeído (Figura 4).



**Figura 4:** Alterações na mobilidade de juvenis de segundo estágio (J<sub>2</sub>) de *Meloidogyne incognita* por períodos de exposição inferiores a 24 horas aos vapores de três moléculas.

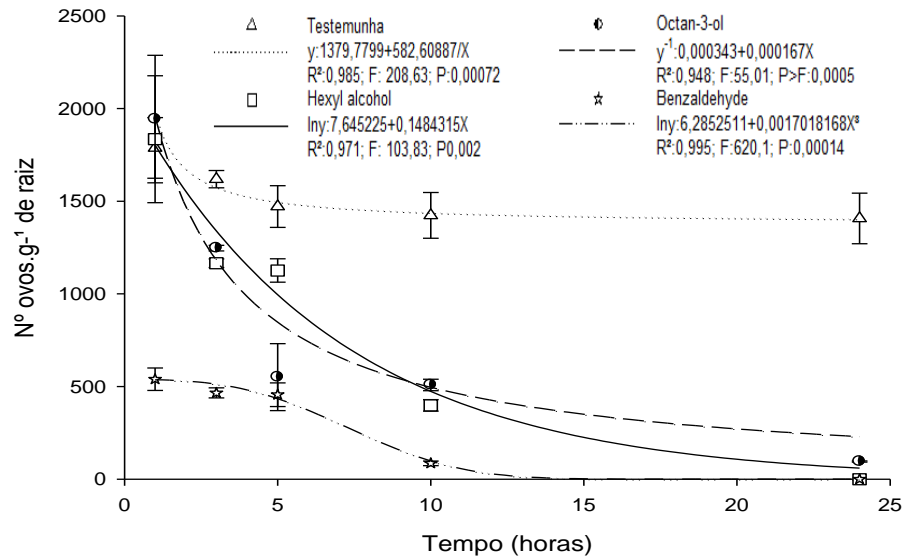
A infectividade expressa em número de galhas, causada pelo J<sub>2</sub> de *M. incognita* após exposição ao vapor de benzaldeído, foi nula a partir de 5 horas de exposição. Já os efeitos redutores da infectividade dos J<sub>2</sub> expostos às moléculas Hexyl alcohol e Octan-3-ol foram menos intensos do que o benzaldeído, mas progrediram com o aumento do tempo de exposição chegando a zero na exposição por 24 horas (Figura 5).





**Figura 5:** Alterações no número de galhas pelos juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne incognita* inoculados em tomateiros após exposição aos vapores de três moléculas por períodos inferiores à 24 horas.

O número de ovos de *M. incognita* em tomateiro pelos J2 expostos ao vapor de benzaldeído por 1 hora foi reduzido em 72%, aproximadamente, comparado ao mesmo período de exposição dos J2 aos vapores de hexyl alcohol e octan-3-ol. Continuou baixo, o número de ovos, nos períodos superiores de exposição ao vapor de benzaldeído, chegando a quase zero quando os J2 foram expostos por 10 horas. Embora a reprodução dos J2 expostos aos vapores das moléculas hexyl alcohol e octan-3-ol tenha sido pouco afetado em 1 hora de exposição, a partir de 3 horas até o final do ensaio, a redução no número de ovos foi elevada, chegando a zero com 24 horas de exposição dos J2 aos vapores (Figura 6). Vapor emitido por benzaldeído foi mais tóxico a *M. incognita* comparado a hexyl alcohol e octan-3-ol em todos os ensaios realizados.



**Figura 6:** Alterações no número de ovos de *Meloidogyne incognita* pelos juvenis de segundo estágio inoculados em tomateiros após exposição aos vapores de três moléculas por períodos de tempo inferiores a 24 horas.

## Discussão

As 11 moléculas com os menores efeitos tóxicos (entre 0 e 75% de imobilidade) comprovados neste trabalho, estão presentes em emissões voláteis de diversos organismos. Em COVs de bactérias foram encontrados os compostos butane-2,3-diol (*Streptomyces* spp.), nonane, cyclohexene (*B. simplex*, *B. subtilis*) (EFFMERT et al., 2012; FERNANDO et al., 2005; GU et al., 2007; HUANG et al., 2010). Em COVs vegetais foram encontrados os compostos butane-1,3-diol e butane-2,3-diol (*Lavandula hybrida*), linalyl acetate (*Citrus bergamia risso*) (JERKOVIĆ; MARIJANOVIĆ, 2009; NABIHA et al., 2010). Misturas com moléculas mais tóxicas encontram-se naturalmente nos COVs bacterianos (FERNANDO et al., 2005; GU et al., 2007; HUANG et al., 2010). Misturas artificiais de moléculas voláteis tem elevada eficácia na toxicidade a fitopatógenos (GRIMME et al., 2007). Portanto a mistura de moléculas individualmente pouco tóxica como constatada neste trabalho pode elevar a toxicidade final, o que ainda precisa ser investigado.

As 19 moléculas com as maiores toxicidades (>90% de imobilidade) a J2 de *M. incognita*, como constatadas neste trabalho, já foram encontradas em emissões de fungos, bactérias e plantas. Em COVs de bactérias foram encontradas as moléculas undecan-6-one, octan-2-ol, decanal (*B. simplex*, *B. subtilis*, *B. weihenstephanensis*, *B. megaterium* YFM3.25),  $\alpha$ -terpineol (*B. simplex*, *B. weihenstephanensis*, *Serratia marcescens*), dodecan-2-one e decan-2-one (*B. subtilis*), nonan-2-one (*B. simplex*, *B. subtilis*, *B. weihenstephanensis*, *B. megaterium* YFM3.25), undecan-2-one (*B. simplex*, *B. subtilis*, *B. weihenstephanensis*, *S. marcescens*, *S. maltophilia*, *B. megaterium* YFM3.25) (Chuankun et al., 2004; Fernando et al., 2005; Gu et al., 2007; Huang et al., 2010; Li et al., 2012; Liu et al., 2008.). Nos COVs

fúngicos, foram encontradas as moléculas octan-1-ol (*Aspergillus flavus*) e octan-3-ol (*Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Fusarium* sp. e *Alternaria* sp.) (EFFMERT et al., 2012; HERRERA et al., 2015). Nos COVs vegetais já encontraram as moléculas: 2-ethylhexan-1-ol e hexyl acetate (*Azadirachta indica* e *Brassica juncea*),  $\alpha$ -terpineol e ( $\pm$ )-linalool (*Artemisia frigida*, *Salvia officinalis*, *Origanum vulgare*, *Sideritis clandestina*, *O. dictamnus*, *Melissa officinalis*, *Vitex agnus castus*, *Ocimum basilicum*), hexyl alcohol ou 1-hexanol (*Rubus idaeus* e *Fragaria ananassa*), 3,3,5-trimethylcyclohexanone (*Lactarius trivialis*), octan-3-ol (*O. vulgare*) (Barbosa et al., 2010; Barros et al., 2014b; Ntalli et al., 2010; Pyysalo, 1976; Vaughn et al., 1993; Zhang et al., 2012). A molécula benzaldeído foi encontrada em COVs de bactérias (*B. simplex*, *B. subtilis*, *B. weihenstephanensis*, *S. marcescens*, *Stenotrophomonas maltophilia*), planta (*Brassica juncea*), fungo (*Muscodora sutura*) e organismo do solo (Barros et al., 2014b; Chuankun et al., 2004; Fernando et al., 2005; Gu et al., 2007; Kudalkar et al., 2012; Zou et al., 2007), com amplo espectro de ocorrência.

A toxicidade elevada em J2 de *M. incognita* das moléculas enquadradas nas categorias de muita alta e alta (Tabela 2). Neste trabalho, também foi constatada em outros fitonematoides, além de fungos e plantas, em que os testes com nematoides envolveram, na maioria, apenas estudos *in vitro* (mortalidade e imobilidade). O benzaldeído causou mortalidade (100%) em *Panagrellus redivivus* e *Bursaphelenchus xylophilus* (GU et al., 2007), inibiu a germinação de esporos e crescimento micelial de *Paecilomyces lilacinus* e de *Pochonia chlamydosporica* (ZOU et al., 2007) e a formação de escleródio em *Sclerotinia sclerotiorum* (FERNANDO et al., 2005). Os vapores de hexyl alcohol reduziram o crescimento micelial de *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea* e *Colletotrichum gloeosporioides* (VAUGHN; SPENCER; SHASHA, 1993). Os vapores de octan-2-ol e terpineol causaram 100% de mortalidade em *P. redivivus* e *B. xylophilus* (GU et al., 2007). Os vapores de 3-octanol e 1-hexanol reduziram o crescimento de raízes e folhas

e causaram branqueamento das folhas de *Arabidopsis thaliana* (SPLIVALLO et al., 2007). O 3-octanol causou morte de *Drosophila melanogaster* (INAMDAR; MASUREKAR; BENNETT, 2010). Efeito fungicida sinérgico entre  $\alpha$ -terpinene e 3-octanol foi observado com os fungos fitopatogênicos *Pythium irregulare*, *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum acutatum*, *Fusarium oxysporum* e *S. sclerotiorum* (PEREZ-SANCHEZ et al., 2007).

No entanto a toxicidade de mais moléculas nas categorias muito alta e alta (Tabela 2) ainda não foi estudada por outros pesquisadores. Apesar de existirem estudos *in vitro* com algumas moléculas causando toxicidade a fitonematoides, os estudos *in vivo* são ainda mais escassos. A incorporação ao solo das moléculas 2-undecanone, 2-octanol, cyclohexene e decanal reduziram o índice de galhas em tomateiros (LI et al., 2012). No presente trabalho, os J2 expostos aos vapores das moléculas 6, 7, 9, 10, 11, 14, 16, 18, 19, 20, 23, 24, 25 e 27 (3,3,5-trimethylcyclohexanone, 4-hydroxybutan-2-one, benzaldehyde, butane-1,2-diol, butane-1,3-diol, cis-2-hexen-1-ol, decan-2-one, dodecan-2-one, 1hexanol, nonan-2-one, nonane, octan-1-ol e octan-3-ol) tiveram a infectividade e reprodução em tomateiro reduzidas, confirmando os teste de imobilidade *in vitro*.

As pesquisas iniciadas recentemente com períodos de exposição de nematoide inferiores à 24 horas, comumente usados, como empregados neste trabalho, comprovam o efeito tóxico mais rápido da molécula, como o benzaldeido que causou, nos J2 expostos a seus vapores por apenas 1 hora, drástica redução da infectividade e reprodução em tomateiro. Pequenos períodos de exposição aos vapores ocorrem comumente na natureza, além de demonstrar maior eficácia tóxica contra o nematoide *M. incognita*. Barros et al., (2014a) observaram efeitos na imobilidade, infectividade e reprodução quando os J2 de *M. incognita* foram expostos a períodos, a partir de 5 horas, aos COVs de *Azadirachta indica* e *Brassica juncea*.

Estudos sobre o efeito de vapores de compostos em ovos de *M. incognita*, neste trabalho, demonstram que a toxicidade da maioria das moléculas é semelhante nos ovos e no J2, porém o 4-hydroxybutan-2-one e 3,3,5-trimethylcyclohexanone causaram menores efeitos danosos em ovos do que em J2 do mesmo nematoide (Figuras 2 e 3). A casca do ovo constitui uma barreira natural de resistência à penetração de molécula no ovo, incluindo os nematicidas não fumigantes (PERRY; MOENS, 2011). Possivelmente ocorreu impedimento à translocação do vapor, apenas dessas moléculas pela camada glicolipídica que ocorre após a camada quitínica (casca do ovo) e que protege o interior do ovo, onde está o embrião ou juvenil (EISENBACK; HUNT, 2010). Ou, possivelmente, a retenção dessas moléculas nesse meio, evitou que uma concentração maior chegasse ao interior do ovo onde se encontra o embrião ou juvenil, o que precisa ser investigado.

Valores de imobilidade semelhantes entre a avaliação no momento e 24 horas após a retirada do filme plástico de vedação indicam que o efeito letal do gás no corpo do J2 é rápido (Figura 1). Fato este comprovado pela inversa proporcionalidade entre a taxa de imobilidade e infectividade e reprodução do J2 exposto aos vapores e inoculados em tomateiros (Tabela 2 e Figura 2). Assim a imobilidade no momento da retirada do filme plástico de vedação constitui então expressão de morte dos J2 pelos gases. Outro suporte para se afirmar que os J2 estavam mortos, baseia-se no fato de que a alta imobilidade pela exposição aos gases de onze das 14 moléculas correspondem às maiores perdas de infectividade e reprodução quando inoculadas em tomateiros (Tabela 2 e Figura 2). No entanto, em outras condições, nem sempre a imobilidade do J2 define sua morte. Exposições de J2 a solução aquosa de organofosforado e organocarbamato causam imobilidade reversível (HAYDOCK et al., 2013). Também exposição de J2 a temperaturas baixas levam à imobilidade que é reversível quando retorna à temperatura adequada (CAMPOS; CAMPOS; POZZA, 2008).

## **Conclusão**

Moléculas voláteis emitidas por plantas e microrganismos têm toxicidades diferenciadas em *M. incognita*.

Os juvenis de segundo estágio expostos às moléculas estudadas tiveram a infectividade e reprodução em tomateiro reduzidas e inversamente proporcionais ao percentual de imobilidade.

A maioria dos vapores das moléculas causou toxicidade em J2 na mesma intensidade nas avaliações no momento da retirada da vedação, como 24 horas após a primeira avaliação (sem pressão de vapor).

A maioria das moléculas estudadas causou igual toxicidade em ovos e J2 de *M. incognita*.

O benzaldeído causou elevada toxicidade a j2 de *M. incognita* mesmo com 1 hora de exposição aos seus vapores.

A maioria das moléculas testadas demonstrou grande efeito nematicida e poderá ser usado como esqueleto para elaboração de produtos comerciais.

## Bibliografia

ABELLEIRA, A. et al. Detection of *Bursaphelenchus Xylophilus*, Causal Agent of Pine Wilt Disease on *Pinus pinaster* in Northwestern Spain. **Plant Disease**, v. 95, n. 6, p. 776, 2011.

AISSANI, N. et al. Nematicidal activity of allylthiocyanate from horseradish (*Armoracia rusticana*) roots against *Meloidogyne incognita*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 20, p. 4723–4727, 2013.

AL-BANNA, L. et al. Discrimination of six *pratylenchus* species using PCR and species-specific primers. **Journal of nematology**, v. 36, n. 2, p. 142–6, jun. 2004.

BARBOSA, P. et al. Nematicidal activity of essential oils and volatiles derived from Portuguese aromatic flora against the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. **Journal of nematology**, v. 42, n. 1, p. 8–16, 2010.

BARROS, A. et al. Tempo de exposição de juvenis de segundo estágio a voláteis emitidos por macerados de nim e de mostarda e biofumigação contra *Meloidogyne incognita*. **Nematropica**, 2 fev. 2014a.

BARROS, A. et al. Nematicidal activity of volatile organic compounds emitted by *Brassica juncea*, *Azadirachta indica*, *Canavalia ensiformis*, *Mucuna pruriens* and *Cajanus cajan* against *Meloidogyne incognita*. **Applied Soil Ecology**, v. 80, p. 34–43, ago. 2014b.

BURGERMEISTER, W. et al. ITS-RFLP patterns for differentiation of 26 *Bursaphelenchus* species ( Nematoda : Parasitaphelenchidae ) and observations on their distribution. v. 13, n. 1, p. 29–42, 2005.

BURGERMEISTER, W. et al. ITS-RFLP analysis, an efficient tool for differentiation of *Bursaphelenchus* species. **Nematology**, v. 11, n. 5, p. 649–668, 1 ago. 2009.

CABONI, P. et al. Nematicidal activity of 2-thiophenecarboxaldehyde and methylthiocyanate from caper (*Capparis spinosa*) against *Meloidogyne incognita*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 30, p. 7345–7351, 2012a.



CABONI, P. et al. Nematicidal activity of (E, E)-2,4-decadienal and (E)-2-decenal from *Ailanthus altissima* against *Meloidogyne javanica*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 4, p. 1146–1151, 2012b.

CABONI, P. et al. Potent nematicidal activity of phthalaldehyde, salicylaldehyde, and cinnamic aldehyde against *Meloidogyne incognita*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 8, p. 1794–1803, 2013.

CAMPOS, H. D.; CAMPOS, V. P.; POZZA, E. A. Efeito da temperatura na multiplicação celular, no desenvolvimento embrionário e na eclosão de juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne javanica*. **Summa Phytopathologica**, v. 34, n. 1, p. 29–33, 2008.

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

CARNEIRO, R. M. D. G.; ALMEIDA, M. R. A. Técnica de eletroforese usada no estudo de enzimas dos nematóides de galhas para identificação de espécies. **Nematologia Brasileira**, v. 25, n. 1, p. 35–44, 2001.

CHITWOOD, D. J. Phytochemical based strategies for nematode control. **Annual review of phytopathology**, v. 40, p. 221–49, jan. 2002.

CHRISTIE, J. R. controlling the nemtic diseases of plant. In: **Plant nematodes : their bionomics and control**. [s.l: s.n.]. p. 26–53.

CHUANKUN, X. et al. Soil volatile fungistasis and volatile fungistatic compounds. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 36, n. 12, p. 1997–2004, 2004.

CURRAN, J. Application of DNA analysis to nematode taxonomy. In: NICKLE, W. R. (Ed.). **Manual of Agricultural Nematology**. New York: Marcel Dekker Inc., 1991. p. 125–143.

DE WAELE, D.; ELSSEN, A. Challenges in tropical plant nematology. **Annual review of phytopathology**, v. 45, p. 457–85, jan. 2007.

DICKE, M.; VAN LOON, J. J. A. Multitrophic effects of herbivore-induced plant volatiles in an evolutionary context. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 97, n. 3, p. 237–249, 6 dez. 2000.

- DUDAREVA, N. et al. Plant Volatiles: Recent Advances and Future Perspectives. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 25, n. 5, p. 417–440, 2006.
- DUDAREVA, N.; PICHERSKY, E.; GERSHENZON, J. Biochemistry of Plant Volatiles 1. **Plant physiology**, v. 135, n. August, p. 1893–1902, 2004.
- EFFMERT, U. et al. Volatile Mediated Interactions Between Bacteria and Fungi in the Soil. **Journal of Chemical Ecology**, v. 38, n. 6, p. 665–703, 2012.
- EISENBACK, J. D.; HUNT, D. General morphology. In: PERRY, R. N.; MOENS, M.; STARR, J. L. (Eds.). . **Root-Knot Nematodes**. [s.l: s.n.]. p. 18–55.
- FAO. **Guide to implementation of phytosanitary standards in forestry**. [s.l: s.n.].
- FASSULIOTIS, G. .; SKUCAS, G. P. The effect of pyrrolizidine alkaloid ester and plants containing pyrrolizidine on *Meloidogyne incognita* acrita. **Journal of Nematology**, v. 1, p. 287–288, 1969.
- FERNANDO, W. G. D. et al. Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 37, n. 5, p. 955–964, 2005.
- FERRAZ, S. et al. **Manejo Sustentável de Fitonematoides**. Viçosa: Editora UFV, 2010.
- FREIRE, E. S. et al. Volatile Substances Produced by *Fusarium oxysporum* from Coffee Rhizosphere and Other Microbes affect *Meloidogyne incognita* and *Arthrobotrys conoides*. **Journal of nematology**, v. 44, n. 4, p. 321–8, 2012.
- FUTAI, K. Pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. **Annual review of phytopathology**, v. 51, p. 61–83, jan. 2013.
- GIBLIN-DAVIS, R. M. . G. K. G. R. **In vivo and In vitro Culture of the Red Ring Nematode, *Rhadinaphelenchus cocophilus*** *Nematopica*, 1 dez. 1989.
- GRIMME, E. et al. Volatiles with a Biorational Mixture for Control of Seedling Diseases of Sugar Beet and Root-Knot Nematode on Tomato. **Plant Disease**, v. 91, n. 2, p. 220–225, 2007.

- GU, Y. Q. et al. Evaluation and identification of potential organic nematicidal volatiles from soil bacteria. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 39, n. 10, p. 2567–2575, 2007.
- HAYDOCK, P. P. J. et al. Chemical control of nematodes. In: PERRY, R. N.; MOENS, M. (Eds.). . **Plant Nematology, 2<sup>a</sup> Edition**. 2<sup>a</sup> Edition ed.[s.l: s.n.]. p. 459–481.
- HERRERA, J. M. et al. Effect of fungal volatile organic compounds on a fungus and an insect that damage stored maize. v. 62, p. 74–80, 2015.
- HUANG, Y. et al. Characterisation of volatiles produced from *Bacillus megaterium* YFM3.25 and their nematicidal activity against *Meloidogyne incognita*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 126, n. 3, p. 417–422, 2010.
- HUNT, D. Genus *Bursaphelenchus* Fuchs, (1973). In: HUNT, D. J. (Ed.). . **Aphelenchida, Longidoridae and Trichodoridae, their Systematics and Bionomics**. Wallingford: CAB International, 1993. p. 129–142.
- HUSSEY, R.; BARKER, K. Comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. **Plant disease reporter**, p. 1025–1028, 1973.
- INAMDAR, A. A.; MASUREKAR, P.; BENNETT, J. W. Neurotoxicity of fungal volatile organic compounds in *Drosophila melanogaster*. **Toxicological Sciences**, v. 117, n. 2, p. 418–426, 2010.
- JERKOVIĆ, I.; MARIJANOVIĆ, Z. Screening of volatile composition of *Lavandula hybrida* Reverchon II honey using headspace solid-phase microextraction and ultrasonic solvent extraction. **Chemistry and Biodiversity**, v. 6, n. 3, p. 421–430, 2009.
- JONES, J. T. et al. *Bursaphelenchus xylophilus*: opportunities in comparative genomics and molecular host-parasite interactions. **Molecular plant pathology**, v. 9, n. 3, p. 357–68, maio 2008.
- KANZAKI, N.; GIBLIN-DAVIS, R. M. Aphelenchoidea. In: MENDOZA, N. M.; MANZANILLA-LOPEZ, R.; HUNT, D. (Eds.). . **Practical Plant Nematology**. London: CABI International, 2012. p. 161–208.
- KIMURA, Y. et al. Nematicidal activity of 5-hydroxymethyl-2-furoic acid against plant-parasitic nematodes. **Zeitschrift für Naturforschung - Section C Journal of Biosciences**, v. 62, n. 3-4, p. 234–238, 2007.

- KUDALKAR, P. et al. *Muscodor sutura*, a novel endophytic fungus with volatile antibiotic activities. **Mycoscience**, v. 53, n. 4, p. 319–325, 2012.
- LI, M. et al. A strategy to discover potential nematicidal fumigants based on toxic volatiles from nematicidal bacteria. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, n. 32, p. 6106–6113, 2012.
- LIU, W. W. et al. Antagonistic Activities of Volatiles from Four Strains of *Bacillus* spp. and *Paenibacillus* spp. Against Soil-Borne Plant Pathogens. **Agricultural Sciences in China**, v. 7, n. 9, p. 1104–1114, 2008.
- MAFFEI, M. E. Sites of synthesis, biochemistry and functional role of plant volatiles. **South African Journal of Botany**, v. 76, n. 4, p. 612–631, 2010.
- MAMIYA. Pine wilt disease in Japan. In: MOTA, M.; VIEIRA, P. (Eds.). . **The pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus***. [s.l.] Nematology Monographs and Perspectives, 2004. p. 9–20.
- MAPA. **Instrução normativa Nº 52. Lista de pragas quarentenárias A1 e A2**. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/servlet/VisualizarAnexo?id=14532>>. Acesso em: 17 set. 2015.
- MERCIER, J. et al. Development of the Volatile-Producing Fungus *Muscodor albus* Worapong, Strobel, and Hess as a Novel Antimicrobial Biofumigant. **Revista Mexicana de Fitopatologia**, v. 25, n. 2, p. 173–179, 2007.
- MOTA, M. et al. First report of *Bursaphelenchus xylophilus* in Portugal and in Europe. **Nematology**, v. 1, n. 7, p. 727–734, 1 nov. 1999.
- NABIHA, B. et al. Chemical Composition of Bergamot ( *Citrus Bergamia* Risso ) Essential Oil Obtained by Hydrodistillation. v. 4, n. 4, 2010.
- NOGUEIRA, M. A. . O. J. S. D. F. S. . S. M. A. DOS. Nematicidal constituents in *Mucuna aterrima* and its activity on *Meloidogyne incognita* race 3. **Nematologia Mediterranea**, 1 dez. 1996.
- NTALLI, N. G. et al. Phytochemistry and nematicidal activity of the essential oils from 8 greek lamiaceae aromatic plants and 13 terpene components. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 13, p. 7856–7863, 2010.
- NTALLI, N. G. et al. Aliphatic ketones from *Ruta chalepensis* (Rutaceae) induce paralysis on root knot nematodes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 13, p. 7098–7103, 2011.

NYCZEPIR, A. .; TOMAS, S. . Current and future management strategies in intensive crop production systems. In: PERRY, R. N.; MOENS, M.; STARR, J. L. (Eds.). . **Root-Knot Nematodes**. 1º Edition ed.[s.l: s.n.]. p. 412–435.

OLIVEIRA, C. M. G. et al. Caracterizações Morfológica e Molecular de *Bursaphelenchus fungivorus* ( Nematoda : Aphelenchida ), Detectado pela Primeira vez no Brasil. p. 63–70, 2011.

OLIVEIRA, D. F. et al. Purification and identification of metabolites produced by *Bacillus cereus* and *B. subtilis* active against *Meloidogyne exigua*, and their in silico interaction with a putative phosphoribosyltransferase from *M. incognita*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 86, n. 2, p. 525–538, 2014.

PEREZ-SANCHEZ, R. et al. Fungitoxic Activity Against Phytopathogenic Fungi and the Chemical Composition of *Thymus zygis* Essential Oils. **Food Science and Technology International**, v. 13, n. 5, p. 341–347, 2007.

PERRY, R. N.; MOENS, M. Introduction to plant parasitic nematodes; modes of parasitism. In: JONES, J.; GHEYSEN, G.; FENOLL, C. (Eds.). . **Genomics and Molecular Genetics of Plant-Nematode Interactions**. [s.l: s.n.]. p. 3–22.

POWERS, T. O. et al. The rDNA Internal Transcribed Spacer Region as a Taxonomic Marker for Nematodes. **Journal of nematology**, v. 29, n. 4, p. 441–50, dez. 1997.

PYYSAALO, H. Identification of volatile compounds in seven edible fresh mushrooms. **Acta Chemica Scandinavica**, v. 30, p. 235–244, 1976.

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

RUTHERFORD, T. A.; MAMIYA, Y.; WEBSTER, J. M. Nematode-Induced Pine Wilt Disease: Factors Influencing Its Occurrence and Distribution. **Forest Science**, v. 36, n. 1, p. 145–155, 28 fev. 1990.

RYSS, A. et al. A synopsis of the genus *Bursaphelenchus* Fuchs, 1937 (Aphelenchida: Parasitaphelenchidae) with keys to species. **Nematology**, v. 7, n. 3, p. 393–458, 1 maio 2005.

SAEKI, Y. et al. Detection of plant parasitic nematodes, *Meloidogyne incognita* and *Pratylenchus coffeae* by multiplex PCR using specific primers. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 49, n. 2, p. 291–295, 22 abr. 2003.

SASSER, J. N. . Root-knot nematodes: a global menace to crop production. **Plant Disease**, v. 64, n. 1, p. 36–41, 1980.

SASSER, J. N. .; FRECKMAN, D. W. A world perspective on nematology the role of the society. In: VEECH, J. A. .; DICKSON, D. W. (Eds.). . **Vistas on nematology**. Maryland: Society of Nematologists, [s.n.]. p. 7–14.

SPLIVALLO, R. et al. Truffle volatiles inhibit growth and induce an oxidative burst in *Arabidopsis thaliana*. **New Phytologist**, v. 175, n. 3, p. 417–424, 2007.

SRINIVAS, A.; NAGARAJ, A.; REDDY, C. S. Synthesis and in vitro study of methylene-bis-tetrahydro[1,3]thiazolo[4,5-c]isoxazoles as potential nematicidal agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 6, p. 2353–2358, 2010.

TANAKA, S. E. et al. *Bursaphelenchus niphades* n. sp. (Tylenchina: Aphelenchoididae) amensally associated with *Niphades variegatus* (Roelofs) (Coleoptera: Curculionidae). **Nematology**, v. 16, n. 3, p. 259–281, 1 jan. 2014.

TRUDGILL, D. L.; BLOK, V. C. Apomictic, polyphagous root-knot nematodes: exceptionally successful and damaging biotrophic root pathogens. **Annual review of phytopathology**, v. 39, p. 53–77, 28 jan. 2001.

VANCANNEYT, G. et al. Hydroperoxide lyase depletion in transgenic potato plants leads to an increase in aphid performance. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 14, p. 8139–44, 3 jul. 2001.

VAUGHN, S. F.; SPENCER, G. F.; SHASHA, B. S. Volatile compounds from raspberry and strawberry fruit inhibit postharvest decay fungi. **Journal of Food Science**, v. 58, n. 4, p. 793–796, 1993.

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

WANG, X. R. et al. A rapid detection of the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* in stored *Monochamus alternatus* by rDNA

amplification. **Journal of Applied Entomology**, v. 135, n. 1-2, p. 156–159, 10 fev. 2011.

YE, W. et al. Phylogenetic relationships among *Bursaphelenchus* species (Nematoda: Parasitaphelenchidae) inferred from nuclear ribosomal and mitochondrial DNA sequence data. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 43, n. 3, p. 1185–97, jun. 2007.

ZHANG, R. M. et al. Allelopathic effects of VOCs of *Artemisia frigida* Willd. On the regeneration of pasture grasses in Inner Mongolia. **Journal of Arid Environments**, v. 87, p. 212–218, 2012.

ZHAO, B. G. et al. Distribution and pathogenicity of bacteria species carried by *Bursaphelenchus xylophilus* in China. **Nematology**, v. 5, n. 6, p. 899–906, 1 set. 2003.

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