



**LILIANA ESTUPIÑAN LÓPEZ**

**FUNGI AND BACTERIA OF *Meloidogyne paranaensis* EGG  
MASSES FROM COFFEE CROPS ARE TOXIC TO  
*Meloidogyne incognita***

**LAVRAS – MG**

**2017**

**LILIANA ESTUPIÑAN LÓPEZ**

**FUNGI AND BACTERIA OF *Meloidogyne paranaensis* EGG MASSES FROM  
COFFEE CROPS ARE TOXIC TO *Meloidogyne incognita***

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

Prof. Dr. Vicente Paulo Campos

Orientador

**LAVRAS – MG**

**2017**

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

Estupiñan-López, Liliana .

Fungi and bacteria of *Meloidogyne paranaensis* egg masses  
from coffee crops are toxic to *Meloidogyne incognita* / Liliana  
Estupiñan-López. - 2017.

71 p. : il.

Orientador(a): Vicente Paulo Campos.

.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2017.

Bibliografia.

1. Nematóide de galhas. 2. Controle. 3. Cromatografia gasosa.

I. Campos, Vicente Paulo. . II. Título.

**LILIANA ESTUPIÑAN LÓPEZ**

**FUNGI AND BACTERIA OF *Meloidogyne paranaensis* EGG MASSES FROM  
COFFEE CROPS ARE TOXIC TO *Meloidogyne incognita***

**FUNGOS E BACTÉRIAS EM MASSAS DE OVOS DE *Meloidogyne paranaensis* DO  
CAFEEIRO E O EFEITO TÓXICO DE SUAS EMISSÕES VOLÁTEIS A *Meloidogyne  
incognita***

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

APROVADA em 19 de julho de 2017.

Dr. Eduardo Souza Freire - UniRV

Dr. Márcio Pozzobon Pedroso - UFLA

Dra. Antonia dos Reis Figueira - UFLA

Dra. Aline Ferreira Barros - UFLA

Prof. Dr. Vicente Paulo Campos

Orientador

**LAVRAS – MG**

**2017**

*A Deus e a Nossa Senhora,*

*Aos meus pais Mery e Alvaro, por todo o amor incondicional que, a pesar da distância, tem me dado a fortaleza para tomar as decisões que têm marcado minha vida.*

*Ao Júlio pelo amor e apoio constante que fazem me sentir forte em momentos de debilidade, pelo nosso Filho Thomás, fruto do nosso amor incondicional.*

*Aos meus irmãos Edinzon, Carolina e Santiago, pelo carinho e exemplo de vida.*

*À toda minha família e amigos.*

*DEDICO*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, proteção, amor e todas as bênçãos.

A Nossa Senhora por me proteger e guiar nos momentos difíceis.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico- CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Fitopatologia (DFP), pela realização do Doutorado. Aos professores do Departamento de Fitopatologia - DFP/UFLA, pelos ensinamentos

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

Aos colegas do trabalho Aline, Arinaldo, Eduardo, Julio, William, Luma, Ariana, Leticia e Ivan, e aos funcionários Cleber e Tarlei, por toda a dedicação, companheirismo e ajuda nos experimentos.

Aos meus amigos que sempre estão quando o coração chama, por serem mais que amigos, pelo acolhimento, ajuda e paciência e a pesar da distância, a amizade é forte, Ingris, Lena e Naldo.

A todos meus familiares, que na distância, sempre estão presentes, no coração, nos momentos importantes da minha vida e agora, minha própria família.

A minha família de Lavras, especialmente a vó Maria Delia e a minha sogra Hilda, por terem me acolhido e pelas demonstrações de carinho e amor constantes, que só quem é mãe, pode oferecer.

Ao meu Júlio, quem para minha sorte, foi cativado pelo sotaque estranho e teve a coragem de marcar um encontro que virou família, pelo nosso filho Thomás, e pela sua imensa paciência, amor e ajuda todos os dias.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

*Os sonhos se devem perseguir, lutar, chorar e conseguir, não se pode desistir enquanto continuam vivos no coração.*

## Resumo

Espécies de *Meloidogyne* produzem massas de ovos que contêm nutrientes que podem servir de substrato para alimentação de microrganismos da rizosfera. Neste trabalho foram isolados fungos e bactérias que colonizam massas de ovos de *M. paranaensis* presentes em raiz de cafeeiro e avaliados os efeitos tóxicos de suas emissões voláteis em juvenis de segundo estágio (J<sub>2</sub>) de *M. incognita*. Entre os fungos encontrados, 67% corresponderam ao gênero *Fusarium*, sendo que 52% corresponderam à espécie *F. oxysporum*. Entre as bactérias foram encontrados 7 gêneros diferentes, predominando o gênero *Pseudomonas*. Todos os isolados de *F. oxysporum* e *F. solani* causaram até 100% da imobilidade em testes *in vitro* e reduziram significativamente a infectividade e reprodução de *M. incognita in vivo*. Alguns isolados bacterianos causaram imobilidade e mortalidade dos J<sub>2</sub> de *M. incognita* e reduziram em até 99% a sua infectividade e reprodução em tomateiros quando os J<sub>2</sub> foram expostos aos vapores. A água que foi exposta aos vapores emitidos pelos isolados fúngicos e bacterianos causou toxicidade aos J<sub>2</sub> e reduziu a infectividade e reprodução de *M. incognita*, quando inoculados em tomateiro. Os compostos voláteis emitidos pelos isolados fúngicos e bacterianos foram identificados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) e agrupados em 8 classes principais, como ésteres, álcoois, fenóis, aldeídos, cetonas, ácidos carboxílicos, compostos sulfurados e sesquiterpenos. Na água que foi exposta vapores dos isolados fúngicos e bacterianos foram identificadas, pela primeira vez, moléculas de diversos grupos químicos. O número de moléculas encontradas na água tóxica foi menor do que nos vapores emitidos pelos fungos e as bactérias. Dentre os compostos identificados encontraram-se compostos já relatados com alta atividade nematicida. Portanto, os fungos e bactérias encontrados nas massas de ovos de *M. paranaensis* causam antagonismo a *M. incognita* pelos voláteis emitidos.

**Palavras-chave:** Nematóide de galhas, controle, fitonematóides, tomateiro, cromatografia gasosa.



## Abstract

*Meloidogyne* species produce egg masses containing nutrients which may serve as feeding substrate for rhizospheric microorganisms. In the present work we isolated fungi and bacteria from *Meloidogyne paranaensis* egg masses. Amongst the fungi isolated 67% belonged to the *Fusarium* genus and within those 52% of the isolates were of the *F. oxysporum* species and were found seven different genera of bacteria, predominating *Pseudomonas* genus. Isolates from *F. oxysporum* and *F. solani* causing up to 100% immobility in *in vitro* tests and reduced *M. incognita* infectivity and reproduction in tomato when J<sub>2</sub> were exposed to fungal volatiles. Also, bacteria isolates reducing 99% infectivity and reproduction when exposed to bacterial vapors, compared to the control. Water exposed to vapors by fungi and bacteria and mixed to the J<sub>2</sub> suspension caused toxicity in *M. incognita* J<sub>2</sub> and reduced infectivity and reproduction of nematodes inoculated in tomato, when compared to the control. Using gas chromatography-mass spectrometry technique (GC-MS), the volatile compounds produced by fungi and bacteria were identified and gathered in 8 main categories: esters, alcohols, phenols, aldehydes, ketones, carboxylic acids, sulfur compounds and sesquiterpenes. For the first time, molecules from various chemical groups were identified in the water exposed to the volatiles from fungi and bacteria isolates. Within these molecules, various have been already reported as having high nematicidal activity, therefore, fungi and bacteria from *M. paranaensis* egg masses, produce volatile compounds with antagonistic activity to *M. incognita*.

**Key words:** Root-knot nematode, control, nematodes, tomato, gas chromatography

## SUMÁRIO

<b>PRIMEIRA PARTE .....</b>	<b>11</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>13</b>
<b>SEGUNDA PARTE- ARTIGOS .....</b>	<b>15</b>
<b>Article 1: Volatile compounds produced by <i>Fusarium</i> spp. isolated from <i>Meloidogyne paranaensis</i> egg masses from coffee crops are toxic to <i>Meloidogyne incognita</i>.....</b>	<b>15</b>
<b>Artigo 2: Incidência de bactérias em massas de ovos de <i>Meloidogyne paranaensis</i> do cafeeiro e a toxicidade de suas emissões voláteis a <i>Meloidogyne incognita</i>.....</b>	<b>45</b>

## PRIMEIRA PARTE

### 1. INTRODUÇÃO

Dentre os principais fatores que limitam o processo produtivo da cultura do café a nível nacional destacam-se os nematoides de galhas. Os nematoides do gênero *Meloidogyne*, principalmente *M. incognita* e *M. paranaensis*, causam queda na produção, inviabilizando economicamente a lavoura, além de obrigar o uso de mudas enxertadas que são de maior custo (LOPES et al., 2008; CAMPOS; VILLAIN 2005; SALGADO; CARNEIRO; PINHO, 2011; CARNEIRO; CARNEIRO; ABRANTES, 1996; CAMPOS; SIVAPALAN; GNANAPRAGASAM, 1990).

O estudo sobre o antagonismo dos voláteis emitidos por fungos e bactérias com fitonematoides tem sido enfatizado na última década (CAMPOS; PINHO; FREIRE, 2010). Por exemplo, isolados de *Fusarium oxysporum* emitem compostos orgânicos voláteis (COVs) tóxicos a fitonematoides (HALLMANN; SIKORA, 1994; FREIRE et al., 2012). Além dos fungos, isolados bacterianos têm atividade nematicida por emissões voláteis (GU et al., 2007).

A produção de ovos em grande quantidade constitui fator importante para a proliferação de *Meloidogyne*, no entanto, fungos e bactérias podem conviver e nutrir-se das massas de ovos (KOK; PAPERT; KOK-A-HIN, 2001; COSTA et al., 2015; HALLMANN; SIKORA, 1994). A microflora da matriz gelatinosa dos nematoides das galhas foi, por muito tempo, ignorada como um fator que pudesse influenciar o parasitismo dos nematoides (KOK; PAPERT; KOK-A-HIN, 2001). A partir dos estudos de Kok, Papert e Kok-a-Hin (2001), as avaliações dos efeitos danosos aos fitonematoides pelos compostos orgânicos voláteis (COVs) emitidos por fungos e bactérias residentes das massas de ovos foram intensificadas (GU et al., 2007; COSTA et al., 2015). As massas de ovos de *Meloidogyne* spp contêm uma substância gelatinosa que pode propiciar o crescimento ou inibição de alguns microrganismos (ORION et al., 2001), podendo emitir voláteis que podem ser antagonísticos ao próprio nematoide produtor da massa de ovos (FREIRE et al., 2012; COSTA et al., 2015).

Ainda são poucos os patossistemas em que se estudou a incidência de bactérias e fungos em massas de ovos (KOK; PAPERT; KOK-A-HIN, 2001; SILVA; SOUZA; CUTRIM, 2002; COSTA et al., 2015), e não se conhece sobre a microflora e o antagonismo de moléculas

voláteis emitidas por fungos e bactérias residentes em massas de ovos de *M. paranaensis*, importante patógeno do cafeeiro, além disso, são poucas as informações sobre as moléculas emitidas pelos fungos e bactérias residentes nas massas de ovos deste patógeno que podem ser dissolvidas em água tornando-a tóxica para os nematoides

Neste trabalho, buscou-se isolar fungos e bactérias presentes em massas de ovos de *M. paranaensis* e estudar os efeitos tóxicos *in vitro e in vivo* dos fungos e bactérias de ocorrência majoritária nas massas de ovos de *M. paranaensis*, avaliar a toxicidade em *M. incognita* da água quando exposta as emissões voláteis, além de identificar através de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) os COVs nos vapores produzidos e retidos em água.

**REFERÊNCIAS**

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

CAMPOS, V.P.; SIVAPALAN, P.; GNANAPRAGASAM, N.C. **Nematode parasites of coffee, cocoa, and tea.** Pp. 113-126 in Luc, M., Sikora, R.A., Bridge, J., eds. *Plant-parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture.* London: Cab International, 1990.

CAMPOS, V.P.; VILLAIN, L. **Nematode parasites of coffee and cocoa.** In: Luc, M., Sikora, R.A., Bridge, J. (Ed). *Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture.* 2.ed. Wallingford: CABI p.189-204, 2005.

CARNEIRO, R.M.D.G.; CARNEIRO, R.G.; ABRANTES, I.M.O. ***Meloidogyne paranaensis* n.sp., a root-knot nematode parasitizing coffee in Brazil.** *Journal of Nematology*, v.28, p.177-189, 1996.

COSTA, L.S.A.S. et al. **Microbiota from *Meloidogyne exigua* egg mass and evidence for the effect of volatiles on infective survival.** *Nematology*, p. 1-10, 2015.

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, p.321-328, 2012.

GU, YQ. et al. **Evaluation and identification of potential organic nematicidal volatiles from soil bacteria.** *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v.39, p.2567-2575, 2007.

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

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

LOPES E.A. et al. **Controle de *Meloidogyne javanica* com diferentes quantidades de torta de nim (*Azadirachta indica*).** *Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas*, Chapadinha, v.2, n.1, p.17-21, 2008.

ORION D. et al. **A role of the gelatinous matrix in the resistance of root-knot nematode (*Meloidogyne spp.*) eggs to microorganisms.** Journal of Nematology, v.33, n.4), p.203–207, 2001.

SALGADO, S.M.L. DE.; CARNEIRO, R.M.D.G.; PINHO, R.S.C. DE. **Aspectos técnicos dos nematóides parasitas do cafeeiro.** Boletim Técnico. v.98. Lavras: EPAMIG, p.60, 2011.

SILVA, G.S.; SOUZA, I.M.R.; CUTRIM, F. **Efeito da incorporação de sementes trituradas de feijão de porco ao solo sobre o parasitismo de *Meloidogyne incognita* em tomateiro.** Fitopatologia Brasileira v.27, p.412-413, 2002.

**SEGUNDA PARTE- ARTIGOS****ARTICLE 1: Volatile compounds produced by *Fusarium* spp. isolated from *Meloidogyne paranaensis* egg masses from coffee crops are toxic to *Meloidogyne incognita***

Liliana Estupiñan-López<sup>a</sup>, Vicente Paulo Campos<sup>\*a</sup>, Márcio Pozzobon Pedroso<sup>b</sup>, Júlio Carlos Pereira da Silva <sup>a</sup>, Willian César Terra <sup>a</sup>, Júlio Cesar da Silva Júnior<sup>c</sup>, Letícia Lopes de Paula <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Plant Pathology – Federal University of Lavras, POB 3037, 37200-000, Lavras - MG, Brazil.

<sup>b</sup> Department of Chemistry – Federal University of Lavras, POB 3037, 37200-000, Lavras - MG, Brazil.

<sup>c</sup> Department of Soil Science – Federal University of Lavras, POB 3037, 37200-000, Lavras - MG, Brazil.

Corresponding Author: Vicente P. Campos e-mail address: [ypcampos@dfp.ufla.br](mailto:ypcampos@dfp.ufla.br) Phone number: 55 - 35 - 38291469

Artigo submetido ao periódico Tropical Plant Pathology

## Abstract

*Meloidogyne* species produce egg masses containing nutrients which may serve as feeding substrate from rhizospheric fungi. In the present study we isolated fungi from *Meloidogyne paranaensis* egg masses from coffee crops. Amongst the fungi isolated 67% belonged to the *Fusarium* genus and within those 52% of the isolates were of the *F. oxysporum* species. Isolates from *F. oxysporum* and *F. solani* causing up to 100% immobility *in vitro* tests and significantly reduced *M. incognita* infectivity and reproduction in tomato when J<sub>2</sub> were exposed to fungal volatiles and. Water exposed to the volatile compounds produced by fungi and mixed to the J<sub>2</sub> suspension caused toxicity in *M. incognita* J<sub>2</sub> and reduced infectivity and reproduction of nematodes inoculated in tomato, when compared to the control. Using gas chromatography-mass spectrometry technique (GC-MS), the volatile compounds produced by *F. oxysporum* and *F. solani* were identified and gathered in seven main categories: esters, alcohols, phenols, aldehydes, ketones, carboxylic acids and sesquiterpenes, making up a total of 36 molecules. For the first time, 17 molecules from various chemical groups were identified in the water exposed to the volatiles from *F. oxysporum* and *F. solani*. A lower number of molecules were detected in the toxic water when compared with the vapors produced by fungi. Within these molecules various have been already reported as having high nematicidal activity. Therefore, *F. oxysporum* and *F. solani* fungi from *M. paranaensis* egg masses, produce volatile compounds with antagonistic activity to *M. incognita*.

**Keywords:** Root-knot nematodes, control, plant parasitic nematodes, tomato.



## Introduction

*Meloidogyne incognita* and *M. paranaensis* are the most harmful nematodes in coffee plantations, decimating many Arabic coffee (*Coffea arabica*) crops in Brazil. Symptoms of parasitism by *M. paranaensis* include severe damages to the root's integrity, surface scaling with corkwood appearance, root debarking, radicular fissures and cracks and necrotic lesions. However, with no galls, as it happens in other typical root-knot nematodes interactions. The aerial portion may show chlorosis, shedding, growth reduction and plant decease that may occur in extensive areas (Lopes et al. 2008; Campos & Villain 2005; Salgado et al. 2011; Carneiro et al. 1996).

A large-scale production of eggs constitutes one important factor to aid *Meloidogyne* proliferation, however, fungi and bacteria may coexist and nourish on egg masses (Kok et al. 2001; Costa et al. 2015; Hallmann & Sikora 1994). The microflora in the gelatinous matrix of egg masses from root-knot nematodes was, for a long time, ignored as an element that may influence nematode's parasitism (Kok et al. 2001). From the studies of Kok et al. (2001), evaluations of the damaging effects to plant parasitic nematode by volatile organic compounds (VOC) produced by resident fungi and bacteria in the egg masses increased (Gu et al. 2007; Costa et al. 2015). Egg masses of *Meloidogyne* spp. contain a gelatinous substance that may promote growth or inhibition of some microorganisms (Orion et al. 2001), which may produce volatile compounds that may be antagonistic towards the nematode that produces the egg masses (Freire et al. 2012; Costa et al. 2015).

On the other side, resident microorganisms from the *Meloidogyne* egg masses may inhibit the growth of organisms responsible for the biologic control of nematodes, like fungi that parasite eggs and female nematodes, thus reducing the natural biologic control (Kerry 1984; Kerry & Evans 1996; Freire et al. 2012). Microflora in egg masses from *M. paranaensis*, a key plant pathogen in coffee crops, is still unknown as well as the antagonism of volatile

molecules produced by resident fungi from the egg masses. The toxicity of water after being exposed to volatile emissions from fungi in the eggs masses is also unknown.

In this work we isolated fungi from *M. paranaensis* egg masses from coffee crops, studied the *in vitro* and *in vivo* toxic effects of the commonly fungi of major occurrence (*Fusarium oxysporum* and *F. solani*) in *M. paranaensis* egg masses, evaluated the toxicity of water after being exposed to fungal volatiles to *M. incognita* and identified VOC from gaseous emissions and from the toxic water using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) technique.

## **Materials and Methods**

### **Sampling, isolation and identification of fungi from egg masses and coffee tissues.**

Samples were obtained in coffee crops planted with Catuai variety and showing natural incidence of *M. paranaensis*, in the county of Piumhi (Minas Gerais), Brazil. Roots showing symptoms of scaling were collected from sites where plants exhibited pronounced decline and dead, as well as from sites where the presence of nematodes was suspected but showing no evident symptoms in the plants. Egg masses were obtained from infected tissues and from small segments of corticous root tissues. Fungi were isolated from the egg masses and from the corticous roots.

In order to obtain the fungal suspension, 20 *M. paranaensis* egg masses and portions of corticous tissues were detached from roots. Two egg masses and two corticous segments were dissected in sterile saline solution (8,5 g NaCl L<sup>-1</sup>), using sterilized concavity slides. Then, all the content was inoculated, separately, in Petri dishes containing PDA medium (Dextrose: 20 g L<sup>-1</sup>; Agar: 15 g L<sup>-1</sup>; Potato infusion: 4 g L<sup>-1</sup>) and 50 mg L<sup>-1</sup> chloramphenicol. Ten petri dishes were prepared for each sample (two egg masses/plate and two fragments of corticous tissue). Plates were incubated at 25°C in the darkness. After fungal growth the number of

isolates was counted. Isolates that were recognized as different by means of visual observation were transferred into Malt Agar medium (Malt Extract: 20 g L<sup>-1</sup>; Agar: 20 g L<sup>-1</sup>).

The identification of fungi species was achieved based on the morphology of conidia, hyphae and conidiophores, with the aid of classification keys from the Mycology sector at the Federal University of Lavras (UFLA). Isolates were preserved according to the method Castellani until were used in the experiments and later included in the mycological collection from the Phytopathology Department at UFLA (MG), Brazil.

After verifying the dominant occurrence of the genus *Fusarium* spp., it was decided to study its volatile compounds in detail. In order to proceed with *in vitro* and *in vivo* tests a preliminary evaluation of J<sub>2</sub> mobility and mortality was performed after the juveniles being exposed to the fungal VOC. Then, 13 isolates which caused higher *in vitro* toxicity were selected for a detailed evaluation.

#### **Acquisition of second stage juveniles (J<sub>2</sub>) of *M. incognita***

Second stage juvenile nematodes of *M. incognita*, which also infects coffee plants, were used for *in vitro* and *in vivo* experiments due to the accessibility to the inoculum. The inoculum was obtained from *M. incognita* populations reproduced in tomato plants (*Solanum lycopersicum* L., cv. Santa Clara), in pots filled with Multiplant© substrate and then growth in greenhouse. A suspension of *M. incognita* eggs was obtained according Hussey and Barker (1973). Tomato roots were carefully washed in tap water in order to remove soil residues, sliced in pieces of approximately 1 to 2 cm and milled in blender with a solution of NaOCl 0.5% for about 20 seconds. The mixture of eggs and roots in suspension was poured through a 0.074 mm sieve (200 mesh) attached to another sieve with 0.025 mm (500 mesh), where the eggs were retained. Eggs were counted with the aid of Peters slides and a light microscope.

Then, eggs were incubated in hatching chamber at 28 °C. Second stage juvenile nematodes which eclosed during the second and third days of incubation were used in the experiments.

### **Immobility and mortality of *M. incognita* J<sub>2</sub> due to fungal VOC**

Nematicidal activity of VOC produced by 11 isolates of *F. oxysporum* and 2 isolates of *F. solani* obtained from *M. paranaensis* egg masses was evaluated according to the methodology proposed Fernando et al. (2005), with modifications. A portion of each fungal isolate was transferred into YES medium (Yeast extract: 20 g L<sup>-1</sup>; Sucrose: 150 g L<sup>-1</sup>; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,5 g L<sup>-1</sup>; Ágar: 20 g L<sup>-1</sup>) and placed in one compartment of a split plastic Petri dish. In the second compartment a sterilized rounded plastic vessel was used. Plates were sealed with film PVC in order to prevent the scape of volatile compounds and then plates were incubated at 25 °C in the darkness. Once the fungal isolate reached 4.5 cm in diameter, the cover of the plastic plate was perforated with the aid of a hot stylet. Then, with the aid of a syringe (Figure 1), 1 mL of aqueous suspension containing 100 *M. incognita* J<sub>2</sub> was injected into the internal plastic vessel through the previously prepared perforation. The perforation was immediately sealed with adhesive tape after removal of the syringe, in order to avoid losing VOC produced during the first days of fungal growth. As a control treatment, the same quantity of YES medium was added in one compartment of the plate without adding any fungal isolate and 100 J<sub>2</sub> were added into the next compartment. Five replicates were prepared for each fungal isolate, as well as for the control treatment. Plates were incubated at 25 °C for 72 hours in the darkness. Then, the content of each plastic vessel was transferred into ELISA plates to calculate the number of immobile (immobility) and mobile J<sub>2</sub> with the aid of a microscope with an inverted objective. Plates were set at 25 °C for 24 hours and then J<sub>2</sub> that remained immobile were counted and considered as dead (mortality).

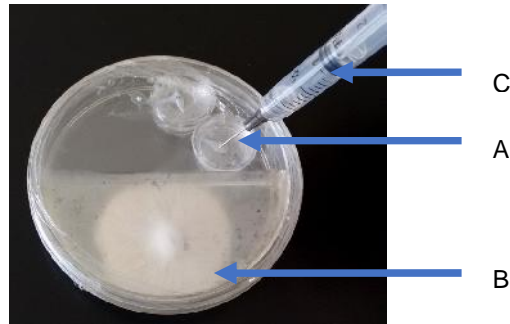


Figure 1: Method used to study the volatile organic compounds (VOC) produced by isolates of *Fusarium oxysporum* and *F. solani* in split Petri plates sealed with plastic film. A) Plastic vessel for the test organism (suspension of *Meloidogyne incognita* second stage juveniles - J<sub>2</sub>) placed in the compartment before sealing the plates, B) culture of *Fusarium* spp producing VOC in a closed environment and C) syringe used to inject the test organism (J<sub>2</sub>) into the sealed plastic container.

After verifying the occurrence of toxicity by VOC produced by *F. oxysporum* and *F. solani* against *M. incognita* J<sub>2</sub>, it was decided to study the contamination of water and consequently its toxicity against the J<sub>2</sub>, once water is always present in agricultural soils.

### **Immobility and mortality of *M. incognita* J<sub>2</sub> in water exposed to fungal VOC**

Each *F. oxysporum* and *F. solani* isolate was grown in YES medium in one of the compartments of the split Petri plate. A sterilized plastic vessel was placed in the neighboring compartment. Plates were sealed with film of PVC to prevent leakage of volatiles before being incubated at 25 °C in the darkness. Once the fungal isolate reached 4.5 cm in diameter, the cover of the plastic plate was perforated with the aid of a hot stylet. Then, with the aid of a syringe 1 mL of sterilized water was injected into the internal plastic vessel through the previously prepared perforation (Figure 1). The perforation was immediately sealed with adhesive tape after removing the syringe, in order to avoid losing VOC produced during the first days of fungal growth. As control treatment the same quantity of YES medium was added in one of the split plate compartments without fungus and 1 mL distilled water in the

other compartment, as previously described. Five replicates were prepared for each isolate and for the control.

Plates were incubated at 25 °C in the darkness for five days. After this period of exposition to the VOC, the toxicity of water against *M. incognita* J<sub>2</sub> was evaluated. To that, water exposed to the VOC plus 1 mL of a suspension containing 100 *M. incognita* J<sub>2</sub> were transferred to a 2 mL volume plastic tube. The tube was closed and incubated for 24 hours at 25°C in the darkness. Then, the tube was opened and the J<sub>2</sub> were transferred into ELISA plates. Mobile and immobile (mobility) J<sub>2</sub> were counted with the aid of a microscope with an inverted objective. Finally, plates were set without sealing at 25 °C for 24 hours. Then, J<sub>2</sub> that remained immobile were evaluated and considered as dead (mortality).

#### **Infectivity and reproduction of *M. incognita* after exposition to VOC or in water exposed to VOC from *F. oxysporum* and *F. solani***

In plastic trays with cells of 75 cm<sup>3</sup> filled with artificial substrate, 2 to 4 tomato seeds (*S. lycopersicum* L. from the Santa Clara group) were planted. After germination only one plant per cell was preserved. Once seedlings had produced 3 to 4 pairs of leaves they were transplanted to 300 mL plastic cups containing artificial substrate and were fertilized according recommendations for tomato crops. Ten days after transplantation, 800 J<sub>2</sub> that were exposed for 72 hours to the volatile compounds or in suspension in the water exposed for five days to the volatiles produced by *F. oxysporum* and *F. solani*, were inoculated in each seedling by distributing the suspension in four holes made in the substrate surrounding the stem of the plants and at a radial distance of 2 cm. Five replicates were prepared for each isolate of *F. oxysporum* or *F. solani* as well as for the control. After inoculation, seedlings were held for 30 days in greenhouse with irrigation and fertilization. After 30 days the weight of the radicular system was evaluated and the number of galls and eggs were determined.

### **Characterization of volatile molecules produced by fungal isolates or retained in water exposed to volatiles from these fungi by means of SPME GC-MS**

The VOC produced by the isolate F12 of *F. solani* and by the isolates F36 and F63 of *F. oxysporum* were identified in the vapors and in the water exposed to the vapors. These isolates caused high mortality rates of *M. incognita* J<sub>2</sub> in previous tests. To proceed with gas chromatography analysis, the selected isolates were transferred to YES medium in 20 ml Supelco® tubes. Isolates developed for 5 days before proceeding with the gas chromatography analysis. As a control treatment, YES medium without any fungal isolate was transferred to Supelco® tube. Sample and control treatments were prepared in 3 replicates.

To analyze the VOC produced by the isolate F12 of *F. solani* and isolates F36 and F63 of *F. oxysporum* that were retained in water, a similar procedure to the previously described essay for immobility and mortality of *M. incognita* J<sub>2</sub> in suspension in water exposed to the fungal VOC, was performed with a modification. The modification consisted in that, five days after inoculation, the water was transferred to 20 mL Supelco® tubes and as control, a Supelco® tube was filled only with water exposed to YES culture medium.

The technique of Solid-phase Microextraction (SPME) in headspace mode (Valente, Augusto 2000) was used to extract the VOC, using the following parameters: 2 cm (Supelco®) fiber assembly DVB/CAR/PDMS Divinylbenzene/ Carboxen/ Polydimethylsiloxane); extraction temperature of 55 °C, extraction time of 35 minutes and desorption time in the GC injector of 1 minute. To separate and identify the VOC a Gas Chromatographer coupled to a Mass Spectrometer GC-MS QP 2010 Ultra (Shimadzu, Japan) supplied with an automatic injector for liquids and gases AOC-5000 (Shimadzu, Japan) and column HP-5 (5% Phenyl-95% dimethylpolyisiloxane) with 30 m × 0.25 mm × 0.25 µm, was

used. The injector's temperature was of 250 °C, the interphase was set at 240 °C and the ionic source of the detector was at 200 °C. The injector was operated in the splitless mode. Helium grade 5.0 was used as the carrier gas and its flow rate was of 1.0 mL min<sup>-1</sup>. The GC temperature was programmed from 40 °C until 160 °C at 3°C min<sup>-1</sup> and then until 240 °C at 10 °C min<sup>-1</sup>. To verify if the compounds were produced only by the fungi isolates the control (culture medium without isolates) and the samples' chromatograms were overlapped and only peaks exclusively produced from the sample were selected for identification. The identification of VOC was achieved by comparative analysis of the mass spectra and the retention indices. Mass spectra of each chromatogram peak was obtained with the aid of the software Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System (AMDIS) v. 2.63 and were compared to the spectra from the NIST library using the software Mass Spectral Search Program v. 1.7 (NIST, Washington - DC, USA), considering only peaks where the similarity between spectra were higher than 80%. The experimental retention indices (RI Exp.) were obtained by injecting a homologous series of alkanes and comparing them with the retention indices in the literature (RI Lit.) (Adams 2007; NIST 2017).

### **Statistical analysis**

All essays were organized under a completely random design with five replicates per treatment. Results were previously submitted to a normality test (Shapiro -Wilk) and the homogeneity of the error variance (Bartlett). Once these conditions were satisfied an F test was applied, by means of a variance analysis (ANOVA). When the F tests were significant ( $P < 0.05$ ), means were compared by the Tukey test ( $P < 0.05$ ). The essays with fungal VOC *in vitro* and *in vivo* were repeated two times.

### **Results**



### **Isolation and identification of fungi from *M. paranaensis* egg masses and coffee tissues**

A total of 48 fungal isolates were obtained from the *M. paranaensis* egg masses and coffee corticous root tissues. Both sample areas, that is, with severe symptoms of *M. paranaensis* incidence and with not evident symptoms, showed qualitatively the same species and genera of fungi in the egg masses and corticous tissues. Thus, all the species and genera observed were gathered in Table 1. From all the isolates obtained, 67% of them belonged to the genus *Fusarium* such as *F. solani*, *F. oxysporum* and *F. semitectum*, whit 52% corresponding to *F. oxysporum*. Amongst the other fungi observed, 23% of the isolates were identified as *Paecilomyces lilacinus* and 10% belonging to various species and genera such as *Penicillium sp.*, *Drechslera sp.*, *Epicoccum sp.*, *Sordaria fimicola* and *Aspergillus ochraceus* (Table 1).

### **Immobility and mortality of *M. incognita* J<sub>2</sub> due to fungal VOC**

*M. incognita* J<sub>2</sub> exposed to the volatiles produced by isolates of *F. oxysporum* showed 100% of immobility (P<0.001), while volatile emissions produced by isolates of *F. solani* caused immobility of J<sub>2</sub> varying from 40% to 70%. Thus, immobility of the J<sub>2</sub> exposed to VOC produced by *F. oxysporum* was higher when compared to that produced by emissions from *F. solani*. Immobility caused by VOC from *F. solani* isolate F12 was similar (P > 0.05) to the control. However, all other fungal isolates caused higher immobility rates (P<0.001) when compared with the control. Mortality, thought, was always lower when compared to immobility for any given isolate, varying from 5% to 11% (P >0.05), similar to the control (Figure 2).

### **Immobility and mortality of *M. incognita* J<sub>2</sub> in water exposed to fungal VOC**

Second stage juveniles of *M. incognita* that were in suspension in water exposed to volatiles produced by isolates of *F. oxysporum* showed immobility (P <0.001) significantly

higher than the control. Isolate F42 showed lower immobility ( $P < 0.001$ ) than other isolates, but still higher than the control ( $P > 0.05$ ). The isolates of *F. solani* caused low immobility, varying from 17% to 41%, however, was always higher when compared with the control, with the exception of isolate F15, that was similar to control. Mortality caused by any of the isolates was always lower than immobility, varying from 5% to 14%, without difference when compared with the control (Figure 3).

### **Infectivity and reproduction of *M. incognita* after exposition to fungal VOC**

Infectivity and reproduction of *M. incognita* in tomato after exposing  $J_2$  to volatile compounds produced by isolates *F. oxysporum* and *F. solani*, expressed as number of galls and eggs, were significantly reduced when compared to the control. The reduction in number of galls and eggs varied from 44% to 94% and 56% to 86%, respectively, when compared with the control. Isolates F12 of *F. solani* and F16 and F42 of *F. oxysporum* caused the lowest reductions in the number of galls when compared to other isolates. The reduction in the number of eggs was slighter when  $J_2$  were exposed to VOC from isolates F10 and F20 of *F. oxysporum*, when compared to other isolates (Figure 4).

### **Infectivity and reproduction of *M. incognita* when $J_2$ were suspended in water exposed to fungal VOC**

Infectivity and reproduction of  $J_2$  were expressed as number of galls and eggs, respectively. The reduction in the number of galls varied from 11% to 57%, while the number of eggs varied from 20% to 38%, when compared with the control. Highest reduction in the number of eggs and galls was observed while evaluating VOC from isolate F52 of *F. oxysporum* in water. Isolates F15 of *F. solani* and F63 of *F. oxysporum* also reduced

prominently the number of galls, but not the number of eggs, when compared with the control. Isolates F10 and F43 of *F. oxysporum* also reduced significantly the number of galls, but only isolate F10 reduced the number of eggs (Figure 5).

In a general manner, volatiles retained in water after exposition to the VOC from fungal isolates resulted in lower reduction of J<sub>2</sub> infectivity and reproduction in tomato plants when compared to J<sub>2</sub> exposed to vapors (Figures 4 and 5).

### **Characterization of volatile molecules produced by fungal isolates or retained in water exposed to volatiles from these fungi by means of SPME GC-MS**

A total of 36 volatile compound produced by isolates of *F. oxysporum* and *F. solani* were identified (Table 2). With the exception of 2,4,5-Trimethyl-1,3-dioxolane all compounds were identified in main categories for the vapors produced by the fungal isolates. Thus, these occurred in larger numbers when compared with those molecules retained in water, and comprehended 7 groups: esters (ethyl acetate, 2-methylpropyl acetate, 3-methylbutyl acetate, 2-methylbutyl acetate, ethyl 3-(methylthio)butanoate, ethyl hexanoate, hexyl acetate, ethyl 2-hexenoate, ethyl octanoate, ethyl benzoylacetate, phenethyl acetate, ethyl 3-acetoxylhexanoate), alcohol and phenols (ethanol, 2-methylpropanol, 3-methyl-1-butanol, 2-methyl-1-butanol, 2,3-butanediol, hexanol, 2-heptanol, 3-methylthio propanol, p-ethyl-anisole, octanol, phenethyl alcohol, nonanol), aldehydes (hexanal, 2-heptenal, 2-octenal), ketones (2-heptanone), carboxylic acids (acetic acid, 2-methyl-propanoic acid, 2-methylbutanoic acid), sesquiterpenes (α-cedrene, α-bergamotene, oxygenated sesquiterpene, β-acorenenol). Amongst the compounds retained in water exposed to the vapors produced by fungal isolates, 17 molecules were identified, thus, occurring in fewer numbers when compared with those identified in the vapors, constituting 4 groups: esters (ethyl acetate, 2-methylpropyl acetate, 2-methylbutyl acetate, ethyl 3-(methylthio)butanoate, hexyl acetate,

ethyl 2-hexenoate, phenethyl acetate, ethyl 3-acetoxyhexanoate ), alcohols and phenols (ethanol, 2-methylpropanol, 3-methyl-1-butanol, 2-methyl-1-butanol, phenethyl alcohol, hexanol), sesquiterpenes (a-bergamotene, oxygenated sesquiterpene, b-acorenenol) and 2,4,5-trimethyl-1,3-dioxolane.

The compounds 3-methylbutyl acetate, 2-methylbutyl acetate, ethyl hexanoate, ethyl octanoate, ethyl benzoylacetate, phenethyl acetate, 2,3-butanediol, 2-heptanol, 3-methyl thio propanol, p-ethyl-anisole, octanol, nonanol, hexanal, 2-heptenal, 2-octenal, 2-heptanone, acetic acid, 2-methyl-propanoic acid, 2-methylbutanoic acid and a-cedrene were not detected in the water exposed to fungal volatiles. From the 36 identified molecules in fungal emissions, 17 were found in emissions from *F. solani* and 28 in emissions from *F. oxysporum*. It is remarkable the occurrence of aldehydes in the emissions from *F. solani* and their absence in emissions from *F. oxysporum*. Also ketones, sesquiterpenes, 2,4,5-trimethyl-1,3-dioxolane, 3-methylbutyl acetate, ethyl 3-(methylthio)butanoate, ethyl hexanoate, hexyl acetate, ethyl 2-hexenoate, ethyl octanoate, ethyl benzoylacetate, ethyl 3-acetoxyhexanoate, ethanol, 2,3-butanediol, 2-heptanol, p-ethyl-anisole and 2-methyl-propanoic acid were absent in emissions from *F. solani* but detected in emissions from *F. oxysporum*.

## Discussion

Fungal species found in *M. paranaensis* egg masses and coffee corticous tissues in the present work were previously observed in different plant hosts (Gu et al. 2007; Costa et al. 2015). Fungal species such as *Paecilomyces lilacinus*, *Fusarium spp*, *Aspergillus spp*, *Drechslera sp* may parasite eggs and females of plant parasitic nematodes, reducing populations of these nematodes (Atkins et al. 2005; Kiewnick & Sikora 2006; Hallmann & Sikora 2008; Eapen et al. 2005). *Aspergillus spp* and *Fusarium spp* produce substances that promote disintegration of the vitelline layer and the chitin in nematode's eggs, causing its

disintegration *in vitro* (Eapen et al. 2005) and therefore increasing penetration of opportunistic fungi such as *Fusarium spp*, *Paecilomyces sp*, *Penicillium sp* (Rodriguez-Kabana & Morgan-Jones 1988).

The genus *Fusarium* represented by the main species in this work, *F. oxysporum* and *F. solani*, produce toxic substances *in vitro* against nematodes in liquid medium and its associated with plant roots. Endophytic isolates of *F. oxysporum* reduce disease severity caused by plant parasitic nematodes such as *Radopholus similis* in banana (*Musa spp*), *M. incognita* in tomato (*Solanum lycopersicum*), *M. graminicola* in rice (*Oryza sativa*) (Eapen et al. 2005; Niere 2001; Martinuz et al. 2013; Le 2006).

Egg masses of *Meloidogyne spp.* contains a gelatinous enveloping substance that may serve as protection against predators and soil microorganisms, but may also serve as a rich carbohydrate source for nourishment that may promote growth or inhibition of some microorganisms in this substrate (Orion et al. 2001). In the present work, various fungal species have benefited of the substrate produced by *M. paranaensis* and grew on it (Table 1). However, emissions from fungal cultures in the egg masses may hold nematicidal activity such as the intermediary metabolic products, peptides or toxic proteins, as well as extracellular hydrolytic enzymes (Anke & Sterner 1997; Griffiths et al. 2001; Luo et al. 2006). Also molecules with small carbon chains, volatiles, have been reported as toxic against nematodes (Campos et al. 2010). In the present work, high immobility of *M. incognita* was observed when J<sub>2</sub> were exposed to volatiles from *F. oxysporum* and *F. solani* isolated from *M. paranaensis* egg masses from coffee crops. These compounds have been reported in volatile emissions from other fungal isolates besides *F. oxysporum* and *F. solani* (Freire et al. 2012; Riga et al. 2008). However, it is remarkable the great reduction of *M. incognita* J<sub>2</sub> infectivity and reproduction in tomato plants after exposition to the volatiles from *F. oxysporum* and *F.*

*solani* verified in the present work. Barros et al. (2014) reported reduction in the number of galls per gram of tomato root up to 79% and up to 96% in the number of eggs when J<sub>2</sub> were exposed to VOC from diverse plants. Freire et al. (2012) confirmed that exposition of *M. incognita* J<sub>2</sub> to VOC produced by the fungus *F. oxysporum* (isolate 21), reduced infectivity of the nematode in tomato, when compared to control.

Reduction of infectivity and reproduction of *M. incognita* J<sub>2</sub> in tomato plants when suspended in water exposed to volatile emissions from some isolates of *F. oxysporum* and reduction of infectivity from some isolates of *F. solani*, reveals the toxicity of the molecules dissolved in water. In the soil, volatile molecules travel through the empty porous, reaching nematodes in aqueous suspension which may be distant from the source producing volatiles. Previous research confirmed that water becomes toxic to nematodes due to emissions from the fungus *Muscodor albus* (Grimme et al. 2007). Molecular characterization of nematode antagonist compounds originated from plants and microorganisms is very important, once these natural compounds may be used as an alternative to control nematodes and due to its potential as substitutes for highly toxic chemical nematicides, besides its importance due to their natural role in the interactions between fungi and plant parasitic nematodes (Dong et al. 2001; Abdelnabby et al. 2011; Jardim et al. 2017; Estupiñan-López et al. 2017).

In the present work, the majority of 36 volatile molecules originated from emissions of *F. oxysporum* and *F. solani* and characterized by CG-MS were previously reported as showing fungicidal or nematicidal effects, as for example: ethyl acetate (Fialho et al. 2010, 2012), 2-methylpropyl acetate (Basseto et al. 2012), ethanol (Fialho et al. 2010, 2012; Basseto et al. 2012, Silva et al. 2017), 3-methyl-1-butanol (Grimme et al. 2007; Fialho et al. 2010, 2012; Arrebola et al. 2010; Xu et al. 2015), 2-methyl-1-butanol (Fialho et al. 2010, 2012; Basseto et al. 2012), phenethyl alcohol (Grimme et al. 2007; Fialho et al. 2010, 2012), 2-octanal (Gu et

al. 2007), 2-heptanone (Basseto et al. 2012; Arrebola et al. 2010; Xu et al. 2015), acetic acid (Arrebola et al. 2010); 2-methyl-propanoic acid (Basseto et al. 2012); 2-methylbutanoic acid (Basseto et al. 2012).

The 17 molecules retained in the water exposed to emissions of volatiles from *F. oxysporum* and *F. solani* which showed toxicity against *M. incognita*, were characterized by gas chromatography for the first time in this work. Toxicity of water exposed to volatile emissions from *Muscodor albus* was confirmed by Grimme et al. (2007), however, the molecules were not identified. Due to the characterization by GC-MS of the vapors and retained in water emitted by *F. oxysporum* and *F. solani*, it was possible to verify a lower number of molecules detected in the water exposed from *F. oxysporum* and *F. solani*. This difference can be explained by the difference in vapor pressure and by the solubility of the compounds in water. In addition, when water was exposed to the volatiles of the fungus on the split plate, only a small amount of these molecules dissolve in the water, while another portion of these molecules remains in the vapor phase and are lost at the moment the split plate is opened for transferred water.

To conclude, egg masses of *M. paranaensis* from coffee crops have a diversified fungal flora, although, with preponderance of *F. oxysporum* and *F. solani* fungi. Their volatile emissions results in reduction of the infectivity and reproduction of *M. incognita* J2 in tomato plants, besides causing immobility *in vitro* and making water toxic after an exposition period. Also, the majority of the molecules characterized in the volatile emissions from these fungi showed toxicity against plant parasitic nematodes.

### **Acknowledgements**

The authors would like to thank EPAMIG (Agricultural Research Company of Minas Gerais), especially, researcher Sonia Maria de Lima Salgado for making use of the

experimental area of Piumhi (Minas Gerais). We are also grateful the financial aid granted by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and Foundation of Support Research of the State of Minas Gerais (FAPEMIG). We also thank to the Department of Phytopathology/Mycology from the Federal University of Lavras, MG, Brazil, for the identification of the fungal isolates.



Table 1: Identification of fungal isolates obtained from *Meloidogyne paranaensis* egg masses and from corticous root tissues collected in two coffee areas in the municipality of Piumhi, MG, Brasil.

No.	Code*	Identification	No.	Code	Identification
1	F2	<i>Fusarium solani</i>	25	F34	<i>Fusarium oxysporum</i>
2	F4	<i>Fusarium solani</i>	26	F35	<i>Fusarium oxysporum</i>
3	F5	<i>Fusarium oxysporum</i>	27	F36	<i>Fusarium oxysporum</i>
4	F6	<i>Fusarium oxysporum</i>	28	F37	<i>Fusarium semitectum</i>
5	F7	<i>Fusarium oxysporum</i>	29	F38	<i>Paecilomyces lilacinus</i>
6	F8	<i>Fusarium solani</i>	30	F39	<i>Paecilomyces lilacinus</i>
7	F9	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	31	F42	<i>Fusarium oxysporum</i>
8	F10	<i>Fusarium oxysporum</i>	32	F43	<i>Fusarium oxysporum</i>
9	F12	<i>Fusarium solani</i>	33	F45	<i>Fusarium oxysporum</i>
10	F13	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	34	F46	<i>Paecilomyces lilacinus</i>
11	F14	<i>Drechslera sp</i>	35	F48	<i>Paecilomyces lilacinus</i>
12	F15	<i>Fusarium solani</i>	36	F49	<i>Fusarium oxysporum</i>
13	F16	<i>Fusarium oxysporum</i>	37	F50	<i>Fusarium oxysporum</i>
14	F18	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	38	F51	<i>Fusarium oxysporum</i>
15	F20	<i>Fusarium oxysporum</i>	39	F52	<i>Fusarium oxysporum</i>
16	F22	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	40	F53	<i>Aspergillus ochraceus</i>
17	F23	<i>Fusarium oxysporum</i>	41	F54	<i>Fusarium oxysporum</i>
18	F25	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	42	F55	<i>Fusarium oxysporum</i>

<b>19</b>	<b>F26</b>	<i>Penicillium sp</i>	<b>43</b>	<b>F56</b>	<i>Fusarium oxysporum</i>
<b>20</b>	<b>F27</b>	<i>Sordaria fimicola</i>	<b>44</b>	<b>F57</b>	<i>Fusarium oxysporum</i>
<b>21</b>	<b>F28</b>	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	<b>45</b>	<b>F58</b>	<i>Fusarium oxysporum</i>
<b>22</b>	<b>F30</b>	<i>Fusarium solani</i>	<b>46</b>	<b>F62</b>	<i>Epicoccum sp</i>
<b>23</b>	<b>F31</b>	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	<b>47</b>	<b>F63</b>	<i>Fusarium oxysporum</i>
<b>24</b>	<b>F33</b>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<b>48</b>	<b>F64</b>	<i>Fusarium oxysporum</i>

\*code refers to the collection where the fungi are deposited.

Table 2: Volatile organic compounds identified by SPME-GC-MS in vapors produced by *Fusarium oxysporum* and *F. solani* or retained in water.

				<i>Fusarium solani</i>		<i>Fusarium oxysporum</i> isolate F36		<i>Fusarium oxysporum</i> isolate 63	
				Vapors	Retained in water	Vapors	Retained in water	Vapors	Retained in water
<b>Compound<sup>x</sup></b>	<b>RI EXP<sup>y</sup></b>	<b>RI Literature<sup>z</sup></b>	<b>Similarity (%)<sup>w</sup></b>						
<b>Esters</b>									
ethyl acetate	606	606	90	v	v	v	vv	v	vv
2-methylpropyl acetate	766	767	90	v	v	v		v	v
3-methylbutyl acetate	871	875	88			v			
2-methylbutyl acetate	874	881	88	v	v	v	v	v	v
ethyl 3-(methylthio)butanoate	935	x	80			v	v		
ethyl hexanoate	1002	997	90			v			
hexyl acetate	1011	1007	95			v	v		
ethyl 2-hexenoate	1040	1038	93			v	v		

<b>ethyl octanoate</b>	1188	1196	91			v			
<b>ethyl benzoylacetate</b>	1234	x	90			v		v	
<b>phenethyl acetate</b>	1247	1257	96	v	v			v	v
<b>ethyl 3-acetoxyhexanoate</b>	1260	1266	89			v	v		
<b>Alcohol and phenols</b>									
<b>ethanol</b>	x	x	98			vv	v	vv	v
<b>2-methylpropanol</b>	619	622	92	v	v	v	vv	v	vv
<b>3-methyl-1-butanol</b>	731	730	93	vv	v	vv	vv	vv	vv
<b>2-methyl-1-butanol</b>	737	734	93	vv	v	vv	vv	vv	vv
<b>2,3-butanediol</b>	803	811	94			v		v	
<b>Hexanol</b>	868	863	86	v		vv	vv		
<b>2-heptanol</b>	902	894	81			v			
<b>3-methylthio propanol</b>	984	978	90	v					
<b>p-ethyl-anisole</b>	1105	1104	90			v			

<b>octanol</b>	1067	1063	90	v					
<b>phenethyl alcohol</b>	1108	1110	97	vvv	v	v		vvv	v
<b>nonanol</b>	1166	1165	90	v					
<b>Aldehydes</b>									
<b>hexanal</b>	799	801	96	v					
<b>2-heptenal</b>	958	947	81	v					
<b>2-octenal</b>	1054	1049	90	v					
<b>Ketones</b>									
<b>2-heptanone</b>	890	889	92			v			
<b>Carboxylic acids</b>									
<b>acetic acid</b>	633	600	90	vv		v			
<b>2-methyl-propanoic acid</b>	791	790	96			v			

<b>2-methylbutanoic acid</b>	890	873	90	v					
<b>Sesquiterpenos</b>									
<b>a-cedrene</b>	1412	1410	90			v			
<b>a-bergamotene</b>	1434	1432	88			v	v	v	v
<b>oxygenated sesquiterpene</b>	1611	x	x			v		v	v
<b>b-acorenol</b>	1641	1636	90			v	v		
<b>Others</b>									
<b>2,4,5-Trimethyl-1,3-dioxolane</b>	720	732	90					v	v

V- Compounds found in the samples

x - Compounds identified by Gas Chromatography

y – Calculated retention indices by injecting a homologous series of alkanes.

z - Literature retention indices according to the literature (RP Adams, Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography / Mass Spectrometry, 4th Ed, Allured Publishing Corp., Carol Stream, 2007) (<http://webbook.nist.gov/chemistry/>)

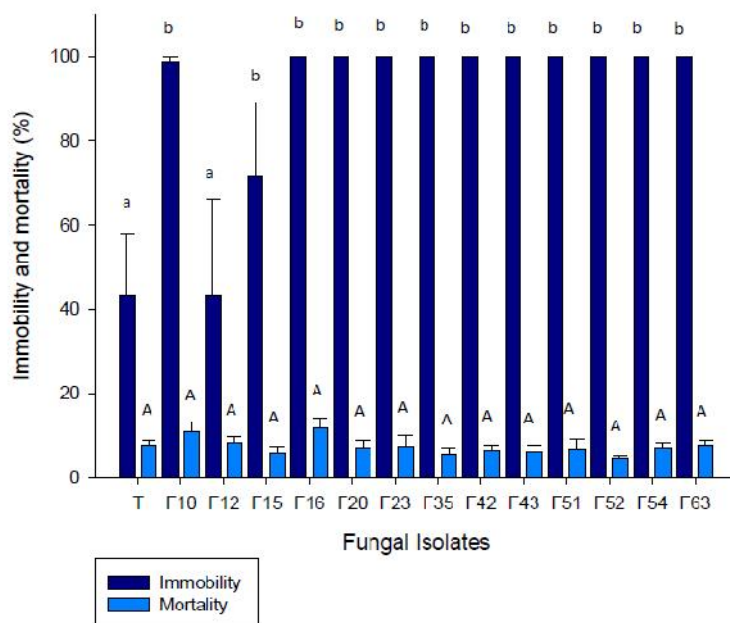


Figure 2: Percentage of immobility and mortality of *Meloidogyne incognita* second stage juveniles due to the exposition to volatile organic compounds produced by isolates of *Fusarium oxysporum* and *Fusarium solani* obtained from *M. paranaensis* egg masses. Means followed by the same letter are not statistically different by the Tukey test ( $p < 0.05$ ). T = YES medium without fungal growth (control).

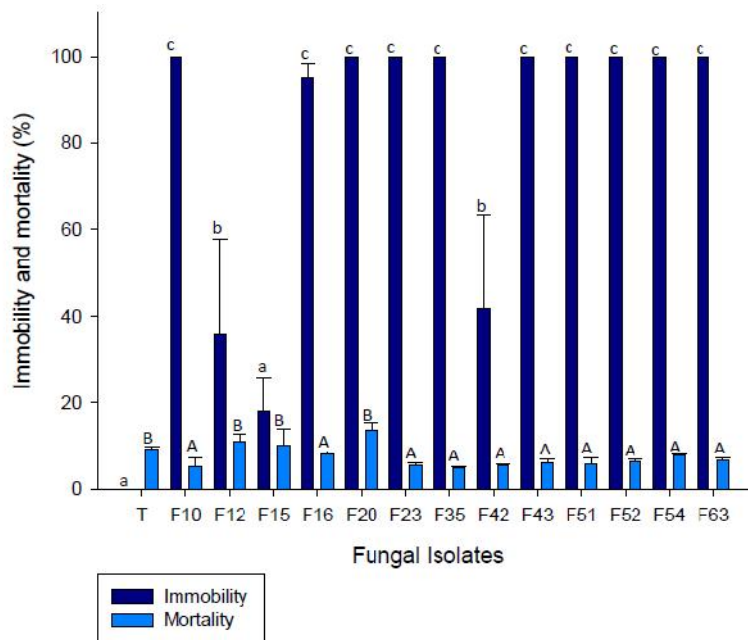


Figure 3: Percentage of immobility and mortality of *Meloidogyne incognita* second stage juveniles suspended in water exposed to volatile organic compounds produced by isolates of *Fusarium oxysporum* and *Fusarium solani* obtained from *M. paranaensis* egg masses. Means followed by the same letter are not statistically different by the Tukey test ( $p < 0.05$ ). T = control.

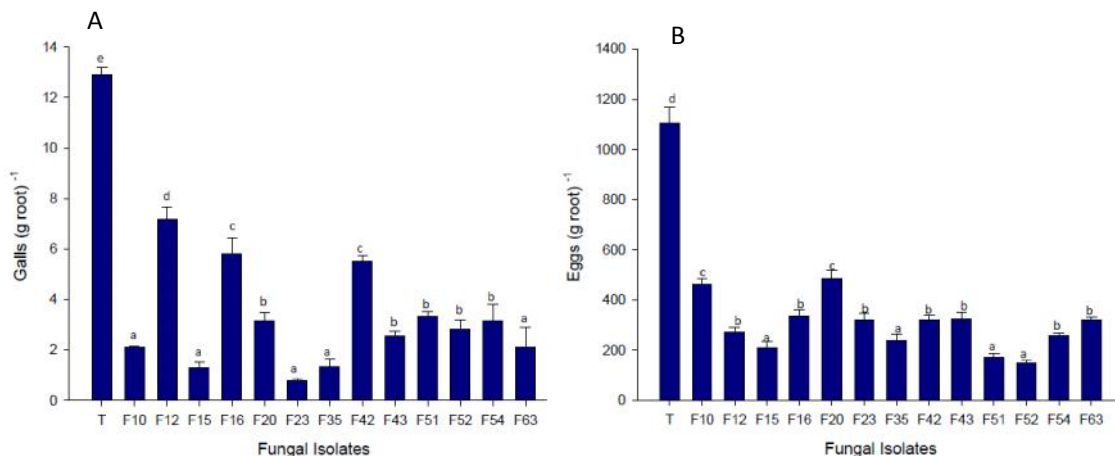


Figure 4: Infectivity (A) and reproduction (B) of *Meloidogyne incognita* in tomato after second stage juveniles in tomato after exposition to organic volatile compounds produced by isolates of *Fusarium oxysporum* and *Fusarium solani* obtained from *M. paranaensis* egg masses. Means followed by the same letter are not statistically different by the Tukey test ( $p < 0.05$ ). T= control.

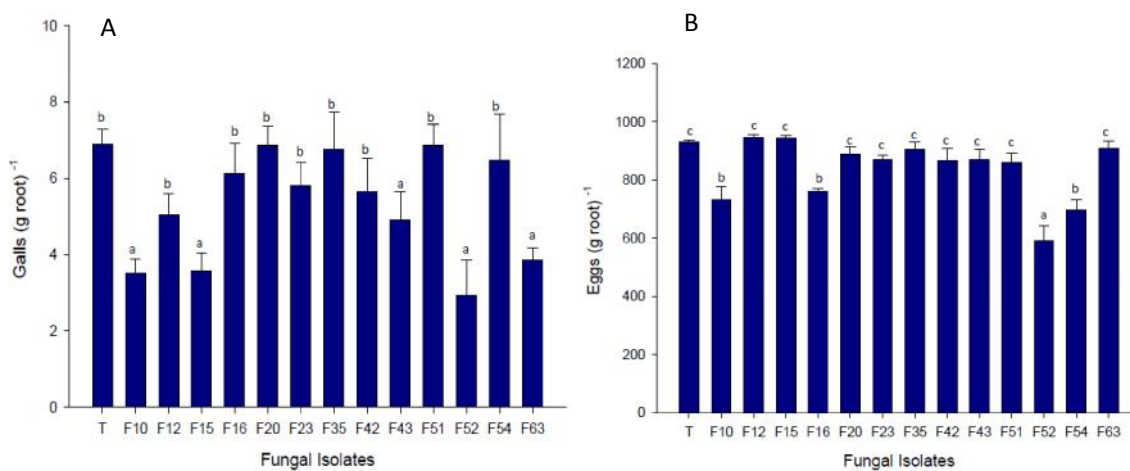


Figure 5: Infectivity (A) and reproduction (B) of *Meloidogyne incognita* second stage juveniles suspended in water exposed to volatile organic compounds produced by isolates of *Fusarium oxysporum* and *Fusarium solani* obtained from *M. paranaensis* egg masses, in tomato. Means followed by the same letter are not statistically different by the Tukey test ( $p < 0.05$ ). T= control.



## References

- Abdelnabby HM, Mohamed,HA, Abo Aly HE (2011) Nematode-antagonistic compounds from certain bacterial species. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 21:2:209-217
- Adams RP (2007) Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography /Mass Spectrometry. 4th ed. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, Illinois USA.
- Anke H, Sterner O (1997) Nematocidal metabolites from higher fungi. *Current Organic Chemistry* 1:4:361-374.
- Arrebola E, Sivakumar D, Korsten L (2010) Effect of volatile compounds produced by *Bacillus* strains on postharvest decay in citrus. *Biological control*, 53:122-128.
- Atkins SD, Clark IM, Pande S, Hirsch PR, Kerry BR (2005) The use of real-time PCR and species-specific primers for the identification and monitoring of *Paecilomyces lilacinus*. *FEMS Microbiology Ecology*, 51: 257–264.
- Barros AF, Campos VP, Silva JCP, Lopez LE, Silva AP, Pozza EA, Pedroso LA (2014) Tempo de exposição de juvenis de segundo estágio a voláteis emitidos por macerados de nim e de mostarda e biofumigação contra *Meloidogyne incognita*. *Nematropica*, 44:190-199.
- Basseto MA, Bueno CJ, Augusto F, Pedroso MP, Furlan MF, Padovani CR, Furtado EL, Souza NL (2012) Solarização em microcosmo: efeito de materiais vegetais na sobrevivência de fitopatógenos de solo e na produção de voláteis. *Summa Phytopathologica*, 38:2:123-130.
- Campos VP, Pinho RSC, Freire ES (2010) Volatiles produced by interacting microorganisms potentially useful for the control of plant pathogens. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, MG, Brazil 34:525-535.
- Campos VP, Villain L (2005) Nematode parasites of coffee and cocoa. In: Luc, M., Sikora, R.A., Bridge, J. (Ed). *Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture*. 2.ed. Wallingford: CABI p.189-204.
- Carneiro RMDG, Carneiro RG, Abrantes IMO (1996) *Meloidogyne paranaensis* n.sp., a root-knot nematode parasitizing coffee in Brazil. *Journal of Nematology*, 28:177-189
- Costa, L.S.A.S., Campos, V.P., Terra, W.C., Pfenning, L.H. 2015. Microbiota from *Meloidogyne exigua* egg mass and evidence for the effect of volatiles on infective survival. *Nematology*, p 1-10.

- Dong JY, Zhang KQ, Zhao ZX, Bi TJ (2001). Current advances in nematicidal toxins from higher fungi. *Chinese Journal of Biological Control*, 17: 92–95.
- Eapen SJ, Beena B, Ramana KV (2005) Tropical soil microflora of spice-based cropping systems as potential antagonists of root-knot nematodes. *Journal of Invertebrate Pathology*, 88: 3:218–225
- Estupiñan-López L, Campos VP, Silva AP, Barros AF, Pedroso MP, Silva JCP, Terra WC (2017) Volatile organic compounds from cottonseed meal are toxic to *Meloidogyne incognita*. *Tropical Plant Pathology*, p 1-10
- Fernando WGD, Ramarathnam R, Krishnamoorthy A.K, Savchuk SC (2005) Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, 37: 955-964.
- Fialho MB, Toffano L, Pedroso MP, Augusto F, Pascholati SF (2010) Volatile organic compounds produced by *Saccharomyces cerevisiae* inhibit the in vitro development of *Guignardia citricarpa*, the causal agent of citrus black spot. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26:925–932.
- Fialho MB, Bessi R, Inomoto MM, Pascholati SF (2012) Nematicidal effect of volatile organic compounds (VOCs) on the plant-parasitic nematode *Meloidogyne javanica*. *Summa Phytopathologica, Botucatu, Brazil* 38:152-154.
- Freire ES, Campos VP, Pinho RSC, Oliveira DF, Faria M R, Pohlit AM, Noberto NP, Rezende EL, Pfenning LH, Silva JRC (2012) Volatile substances produced by *Fusarium oxysporum* from coffee rhizosphere and other microbes affect *Meloidogyne incognita* and *Arthrobotrys conoides*. *Journal of Nematology*, 44:321-328
- Griffits, J.S., Whitacre, J.L., Stevens D.E., Aroian R.V. 2001. Bt toxin resistance from loss of a putative carbohydrate-modify-ing enzyme. *Science*, 293: 860-864.
- Grimme E, Zidack NK, Sikora RA, Strobel GA, Jacobsen BJ (2007) Comparison of *Muscodor albus* volatiles with a biorational mixture for control of seedling diseases of sugar beet and root-knot nematode on tomato. *Plant Disease*, Washington, D.C, USA 91:220-225
- Gu YQ, Mo MH, Zhou JP, Zou CS, Zhang KQ (2007) Evaluation and identification of potential organic nematicidal volatiles from soil bacteria. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford. 39: 2567-2575.

- Hallmann J, Sikora RA (1994) Occurrence of plant parasitic nematodes and nonpathogenic species of *Fusarium* in tomato plants in Kenya and their role as mutualistic synergists for biological control of root knot nematodes. *International Journal of Pest Management* 40:321-325
- Hussey RS, Barker KR (1973) A comparison of methods for collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. *Plant Disease Reporter*, Washington, D.C, USA 57:1025-1028.
- Jardim IN, Oliveira DF, Silva GH3, Campos VP, Souza PE (2017) (E)-cinnamaldehyde from the essential oil of *Cinnamomum cassia* controls *Meloidogyne incognita* in soybean plants. *Journal of Pest Science*, p 1-10.
- Kerry, B. R. 1984. Nematophagous fungi and the regulation of nematode population in soil. *Helminthological. Abstract Serie B* 53, 1-14.
- Kerry, B.R., Evans, K. 1996. New strategies for the management of plant parasitic nematodes p. 134-152. In: Hall, R. *Principles and Practice of managing soilborne plant pathogen*. APS press, St Paul, Minnesota 330p.
- Kiewnick S, Sikora RA (2006) Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* by *Paecilomyces lilacinus* strain 251. *Biological Control*, 38:2:179–187
- Kok, C.J., Papert, A., Kok-A-Hin, C.H. 2001. Microflora of *Meloidogyne* egg masses: species composition, population density and effect on the biocontrol agent *Verticillium chlamydosporium* (Goddard). *Nematology*, 3:8:729-734.
- Le TTH (2006). Antagonistic potencial of endophytic and rhizosphere fungi against the rice root knot nematode *Meloidogyne graminicola* under upland rice growing conditions. M. Sc. Thesis. University of Bonn, Germany.
- Lopes EA, Ferraz S, Freitas LG, Ferreira PA (2008) Controle de *Meloidogyne javanica* com diferentes quantidades de torta de nim (*Azadirachta indica*). *Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas*, Chapadinha, 2:1:17-21.
- Luo H, Li X, Li GH, Pan YB, Zhang KQ (2006) Acanthocytes of *Stropharia rugosoannulata* fuction as a nematode-attacking device. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 2982-2987.
- Martinuz A, Schouten A, Sikora RA (2013) Post-infection development of *Meloidogyne incognita* on tomato treated with the endophytes *Fusarium oxysporum* strain Fo. 162 and *Rhizobium etli* strain G12. *Biocontrol* 58:95104.

- Niere BI (2001) Significance of nonpathogenic isolates of *Fusarium oxysporum* Schlecht: Fries for the biological control of the burrowing nematode *Radopholus similis* (Cobb) Thorne on tissue cultured banana. Ph.D Thesis. University of Bonn, Germany.
- NIST (2017) NIST Chemistry Webbook-National Institute of Standards and Technology. <http://webbook.nist.gov/chemistry/>. Accessed February 2017
- Orion D, Kritzman G, Meyer SLF, Erbe EF, Chitwood DJ (2001) A role of the gelatinous matrix in the resistance of root-knot nematode (*Meloidogyne spp.*) eggs to microorganisms. *Journal of Nematology* 33(4):203–207
- Riga E, Lacey LA, Guerra N (2008) *Muscodor albus*, a potential biocontrol agent against plant-parasitic nematodes of economically important vegetable crops in Washington State, USA. *Biological Control, Washington, USA* 45:380-385.
- Rodriguez-Kabana R, Morgan-Jones G (1988) Potential for Nematode Control by Mycofloras Endemic in the Tropics. *Journal of Nematology* 20(2):191-203.
- Salgado SML De, Carneiro RMDG, Pinho RSC de (2011) Aspectos técnicos dos nematóides parasitas do cafeeiro. EPAMIG, Boletim Técnico, Lavras 98: p60.
- Silva JCP, Campos VP, Freire ES, Terra WC, Lopez EL (2017) Toxicity of ethanol solutions and vapours against *Meloidogyne incognita*. *Nematology*, p 1-10
- Valente PAL, Augusto F (2000) Microextração por fase sólida. *Química Nova, São Paulo, Brazil* 23, 4.
- Xu YY, Lu H, Wang X, Zhang KQ, Li GH (2015) Effect of volatile organic compounds from bacteria on nematodes. *Chemistry & biodiversity* 12:1415-1421.

**ARTIGO 2: Incidência de bactérias em massas de ovos de *Meloidogyne paranaensis* do cafeeiro e a toxicidade de suas emissões voláteis a *Meloidogyne incognita***

Liliana Estupiñan López<sup>a</sup>, Vicente Paulo Campos<sup>\*a</sup>, Márcio Pozzobon Pedroso<sup>b</sup>, Júlio Cesar da Silva Júnior<sup>c</sup>, Ivan Oliveira de Souza<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Plant Pathology – Federal University of Lavras, POB 3037, 37200-000, Lavras - MG, Brazil.

<sup>b</sup> Department of Chemistry – Federal University of Lavras, POB 3037, 37200-000, Lavras - MG, Brazil.

<sup>c</sup> Department of Soil Science – Federal University of Lavras, POB 3037, 37200-000, Lavras - MG, Brazil.

Author for Correspondence: Vicente P. Campos

e-mail address: vpcampos@dfp.ufla.br

Phone number: 55 - 35 - 38291469

**Artigo preparado de acordo com as normas do periódico Summa Phytopathologica**

## Resumo

As massas de ovos produzidas por *Meloidogyne* contêm nutrientes que podem servir de substrato para crescimento de bactérias da rizosfera. Neste trabalho foi estudada a presença de bactérias em massas de ovos de *M. paranaensis* e os efeitos tóxicos de suas emissões voláteis em juvenis de segundo estágio (J<sub>2</sub>) de *M. incognita*. Entre as bactérias identificadas foram encontrados sete gêneros diferentes predominando o gênero *Pseudomonas*. Os isolados bacterianos causaram imobilidade e mortalidade dos J<sub>2</sub>, tanto nos J<sub>2</sub> expostos diretamente aos voláteis quanto nos J<sub>2</sub> em suspensão na água previamente exposta aos mesmos voláteis. A infectividade e reprodução dos J<sub>2</sub> de *M. incognita* em tomateiros foram reduzidas em até 99% após a exposição dos J<sub>2</sub> aos voláteis emitidos pelos isolados bacterianos. Os compostos voláteis emitidos pelas bactérias foram identificados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) e agrupados em seis classes principais como ésteres, álcoois, cetonas, ácidos carboxílicos, compostos sulfurados e outros compostos totalizando 16 moléculas. Na água que foi exposta aos vapores dos isolados de *Bacillus* sp e *Pseudomonas* sp, foram identificadas pela primeira vez 2-etil-hexanol, dissulfeto de dimetila e trissulfeto de dimetila. Dentre esses grupos encontraram-se compostos já reportados com alta atividade nematicida. Portanto, os compostos voláteis emitidos por bactérias das massas de ovos de *M. paranaensis* causam efeito tóxicos aos J<sub>2</sub> de *M. incognita*.

**Palavras-chave:** Nematóide de galhas, cromatografia gasosa, controle, nematóides parasitas de plantas, tomateiro.

## Introdução

O Brasil é o maior produtor de café e o segundo maior consumidor do mundo. A área plantada de café arábica em Minas Gerais representa, aproximadamente, 68% da área total plantada no país (13). Dentre os fatores limitantes de produção de café no Brasil destacam-se os nematoides de galhas que não só causam queda na produção, inviabilizando economicamente a lavoura, como também demandam o uso de mudas enxertadas que são de maior custo. Os nematoides danosos ao cafeeiro têm extensa distribuição nas regiões cafeeiras e três das espécies de *Meloidogyne* que ocorrem nos cafezais têm destaque devido aos prejuízos que causam, sendo estas *M. exigua*, *M. incognita* e *M. paranaensis* (6, 9, 10, 12). Em Minas Gerais ocorrem nematoides danosos à cafeicultura e com grande disseminação nas regiões produtoras. Atualmente, *M. paranaensis* encontra-se distribuído nos municípios de Serra do Salitre, Patrocínio, Piumhi e Coqueiral (11) e no sul de Minas (33).

Os sintomas do parasitismo por *M. paranaensis* incluem danos drásticos na integridade das raízes, como escamações superficiais com aspecto de cortiça, descascamento, rachaduras e lesões necróticas. No entanto, não ocorrem galhas típicas comuns aos nematoides de galhas. Na parte aérea ocorrem clorose, desfolhamento, redução no crescimento chegando à morte de plantas em extensas áreas (7, 9, 27, 32).

A produção de ovos em grande quantidade é o principal fator para a proliferação de *Meloidogyne*. Por outro lado, fungos e bactérias podem conviver e nutrir-se das massas de ovos e reduzindo a viabilidade dos ovos produzidos e, conseqüentemente,, queda da densidade populacional do nematoide (14, 22, 25). A microflora da matriz gelatinosa dos nematoides das galhas foi, por muito tempo, ignorada como um fator que pudesse influenciar o parasitismo dos nematoides (25). A partir dos estudos de Kok et al. (25) foram desenvolvidas pesquisas com fungos e bactérias residentes de massas de ovos causando

toxicidade a nematoides parasitas de plantas pelos compostos voláteis ou não voláteis (14, 21).

Ainda são poucos os patossistemas em que a incidência de bactérias e fungos em massas de ovos foi estudada (14, 25, 35). Também, não se conhece o antagonismo de moléculas voláteis emitidas por bactérias residentes de massas de ovos de *M. paranaensis*, importante patógeno do cafeeiro, além das poucas informações sobre as moléculas voláteis que podem ser dissolvidas em água, tornando-a tóxica para os nematoides.

Neste trabalho, buscou-se isolar bactérias presentes em massas de ovos de *M. paranaensis*, estudar os efeitos tóxicos *in vitro* e *in vivo* das bactérias de ocorrência majoritária nestas massas de ovos, avaliar a toxicidade em *M. incognita* da água quando exposta aos voláteis, além de identificar os COVs emitidos pelas bactérias e aqueles retidos em água por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS).

## **Material e métodos**

### **Amostragem, isolamento e identificação de bactérias de massas de ovos de *M. paranaensis* e de tecidos corticosos do cafeeiro**

Amostras de raízes apresentando descamação foram obtidas em cafezal, cultivar Catuaí, com incidência de *M. paranaensis* em Piumhi (MG), tanto de locais com plantas em declínio pronunciado e mortas, bem como de locais com presença do nematoide, porém, sem declínio evidente das plantas. Massas de ovos de *M. paranaensis* foram obtidas dos tecidos infectados como também dos pequenos segmentos de tecidos corticosos.

As massas de ovos foram observadas no microscópio estereoscópio. Vinte delas foram selecionadas quando apresentavam sintomas indicativos de parasitismo microbiológico (escurecimento), conforme recomendação de Stirling & Mankau (36) e usadas para obtenção das suspensões microbianas. Para isso, duas massas de ovos e as porções de fragmentos do



tecido corticoso foram lavadas três vezes em solução salina estéril (8,5 g. NaCl L<sup>-1</sup>) e dissecadas. Alíquotas de 0,1 ml dessas suspensões foram usadas para proceder a diluição seriada plaqueando-as em meio TSA “tryptic soy agar” (digerido pancreático de caseína: 15,0 g L<sup>-1</sup>; digerido papaínico de soja: 5 g L<sup>-1</sup>; Cloreto de sódio: 5 g L<sup>-1</sup>; Ágar: 15 g L<sup>-1</sup>) com 50 mg L<sup>-1</sup> do fungicida ciclohexamida. Para cada diluição foram feitas três repetições. Seis dias após, foram estimados todos os isolados bacterianos formados. Por observação visual, os isolados com morfologias diferentes foram transferidos para outras placas com meio TSA. Os isolados foram preservados em água mineral esterilizada a 4 °C até o uso nos ensaios posteriores.

#### **Obtenção de juvenis de segundo estágio (J<sub>2</sub>) de *M. incognita***

Para os ensaios *in vitro* e *in vivo* foram usados J<sub>2</sub> de *M. incognita* que também parasita o cafeeiro, pela facilidade de obtenção de inóculo. O inóculo foi obtido de populações de *M. incognita* multiplicadas em plantas de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L cultivar do grupo Santa Clara), em vasos com substrato Multiplant© mantidas em casa de vegetação. A suspensão de ovos de *M. incognita* foi obtida conforme Hussey & Barker (24). Assim, raízes de tomateiro foram lavadas cuidadosamente em água corrente para retirar restos de substratos ou solo, picadas em pedaços de aproximadamente 1 a 2 cm e trituradas em liquidificador com solução de NaOCl 0,5% por cerca de 20 segundos. A suspensão de ovos e raízes foi vertida em uma peneira de 0,074 mm de abertura (200 mesh), acoplada a outra de 0,025 mm (500 mesh), ficando os ovos retidos nesta última. A contagem dos ovos foi realizada em câmara de Peters em microscópio de luz. Parte dos ovos obtidos foi incubado em câmara de eclosão a 28 °C. Os J<sub>2</sub> eclodidos no segundo e no terceiro dia após a montagem da câmara foram utilizados nos ensaios.

### **Imobilidade e mortalidade de J<sub>2</sub> de *M. incognita* por COVs bacterianos**

Para a avaliação da atividade nematicida dos COVs emitidos pelos isolados bacterianos obtidos das massas de ovos de *M. paranaensis*, foram repicadas as bactérias da cultura estoque, para o meio TSA colocado em um dos compartimentos da placa de Petri bipartida. No compartimento contíguo foi colocado um recipiente plástico arredondado e esterilizado e nele adicionado 1 mL com 100 J<sub>2</sub> de *M. incognita* (**Figura 1**). As placas foram vedadas com filme de PVC para prevenir o escape de voláteis e incubadas a 28 °C no escuro por 24 horas. Como controle, a mesma quantidade de meio TSA foi adicionada em um dos compartimentos da placa sem a bactéria e os J<sub>2</sub> adicionados no compartimento contíguo no recipiente plástico. O conteúdo de cada recipiente plástico foi transferido para placa ELISA e a seguir, foi realizada a contagem dos J<sub>2</sub> móveis e imóveis (imobilidade) em microscópio de luz invertida. As placas foram deixadas a 28°C por 24 horas e, logo após, os J<sub>2</sub> que ainda continuaram imóveis foram avaliados e caracterizados como mortos (mortalidade).

### **Mortalidade de J<sub>2</sub> de *M. incognita* em suspensão na água anteriormente exposta aos COVs bacterianos**

Cada isolado bacteriano obtido foi repicado para o meio TSA em um dos compartimentos da placa de Petri bipartida. No outro compartimento foi colocado um recipiente plástico esterilizado e adicionado 1 mL de água. As placas foram vedadas com filme de PVC para prevenir o escape de voláteis e incubadas a 25 °C no escuro por 24 horas. Como controle, a mesma quantidade de meio TSA foi adicionada em um dos compartimentos da placa sem a presença da bactéria e no outro compartimento foi adicionado 1 mL de água como descrito anteriormente. Foram feitas cinco repetições para cada espécie bacteriana, bem como, para o controle. Após o período de exposição aos COVs, a água que foi exposta aos voláteis bacterianos foi recolhida para análise da toxicidade em J<sub>2</sub> de *M. incognita*. Para isso, em um

microtubo plástico de 2 mL de volume foi colocada a água exposta aos COVs e adicionado 1mL de suspensão aquosa contendo 100 J<sub>2</sub> de *M. incognita*. O tubo foi fechado e os J<sub>2</sub> em suspensão aquosa foram incubados por 24 horas a 25°C no escuro. A seguir, o tubo foi aberto e dele foram transferidos os J<sub>2</sub> em suspensão para a placa ELISA. Os J<sub>2</sub> foram móveis e imóveis contados em microscópio de luz invertida. A seguir, as placas após exposição a água possivelmente contaminada pelos COVs contendo os nematoides foram deixadas sem vedação a 25°C por 24 horas. Após este período, os J<sub>2</sub> que ainda permaneceram imóveis foram avaliados e caracterizados como mortos (mortalidade). Apenas a mortalidade foi avaliada pois ela tem maior expressão da toxicidade.

#### **Teste *in vivo* sobre infectividade e reprodução de *M. incognita* após exposição aos COVs ou na suspensão na água exposta aos voláteis dos isolados bacterianos**

Em bandejas com células de 75 cm<sup>3</sup>, preenchidas com substrato artificial Multiplant®, foram colocadas 2 a 4 sementes de tomateiro (*S. lycopersicum* L. cultivar Santa Clara) para germinar. Quando as mudas alcançaram 3 a 4 pares de folhas definitivas, foram transplantadas para copos plástico de 300 ml contendo substrato artificial Multiplant® e fertilizadas de acordo com a recomendação para a cultura. Dez dias após o transplante, 800 J<sub>2</sub> expostos por 24 horas aos voláteis ou suspensos na água exposta aos COVs bacterianos, foram inoculados em cada muda distribuindo a suspensão em quatro perfurações feitas no substrato a 2 cm ao redor do caule da muda. Foram realizadas cinco repetições por isolado bacteriano assim como para o controle. Após a inoculação, as mudas foram mantidas por 30 dias em casa de vegetação com irrigações frequentes e as adubações necessárias. Ao final dos 30 dias foi pesado o sistema radicular e calculado o número de galhas e número de ovos por grama de raiz.

### **Caracterização das moléculas emitidas pelos isolados bacterianos ou retidos em água exposta aos voláteis desses organismos através de GC-MS**

Foram caracterizadas as moléculas emitidas pelas bactérias *Bacillus* sp (B01) e de *Pseudomonas* sp (B12 e B44) nos vapores e na água que a eles foi exposta, pois esses isolados apresentaram alta imobilidade e mortalidade nos J<sub>2</sub> de *M. incognita*. Para as análises em cromatografia gasosa, os isolados selecionados foram transferidos para meio de cultura TSA em tubo Supelco® de 20 mL. Após 24 horas de crescimento bacteriano foram realizadas as análises por GC-MS. Como controle, utilizou-se o meio de cultura TSA sem isolado bacteriano, foi inserido no tubo Supelco®. As amostras e controles foram preparados em três replicatas.

Para as análises dos COVs emitidos pelos isolados de *Bacillus* sp (B01) e de *Pseudomonas* sp (B12 e B44) que foram retidos na água, foi realizado o procedimento similar ao ensaio da mortalidade de J<sub>2</sub> de *M. incognita* em suspensão na água exposta por 24 horas anteriormente descrita. A modificação foi que, após 24 horas de incubação no escuro, a água foi transferida para tubos Supelco® de 20 mL, e como controle, o tubo Supelco® recebeu apenas água exposta ao meio de cultura TSA.

As análises cromatográficas foram realizadas na Central de Análise e Prospecção Química (CAPQ/UFLA). Para a extração dos COVs foi empregada a microextração em fase sólida (SPME) no modo *headspace* (38) e foram adotados os seguintes parâmetros: fibra DVB/CAR/PDMS (Divinilbenzeno, Carboxen, Polidimetilsiloxano) de 2 cm (SUPELCO); temperatura de extração de 55 °C, tempo de extração de 35 minutos e tempo de dessorção no injetor do GC de 1 minuto. Para a separação e identificação dos COVs foi usado um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas GC-MS QP 2010 Ultra (Shimadzu, Japan) equipado com injetor automático para líquidos e gases AOC-5000 (Shimadzu, Japan) e coluna HP-5 (5% fenil-95% dimetilsiloxano) de dimensões 30 m × 0,25

mm  $\times$  0,25  $\mu$ m. A temperatura do injetor foi de 250 °C, da interface de 240 °C e da fonte de íons do detector de 200 °C. O injetor foi operado no modo splitless e como gás de arraste foi usado He grau 5.0 a 1,0 mL min<sup>-1</sup>. A programação da temperatura do forno do GC foi de 40 °C até 160 °C a 3°C min<sup>-1</sup> e então até 240 °C a 10 °C min<sup>-1</sup>. Para verificar que compostos são produzidos apenas pelos isolados bacterianos, os cromatogramas do controle (meio de cultura sem isolados) e das amostras foram sobrepostos e apenas picos produzidos exclusivamente pela amostra foram selecionados para a etapa de identificação. A identificação dos COVs foi realizada por análise comparação dos espectros de massas e dos índices de retenção. Os espectros de massas de cada pico do cromatograma foram extraídos através do programa Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System (AMDIS) v. 2.63 e foram comparados aos espectros da biblioteca NIST pelo programa Mass Spectral Search Program v. 1.7 (29), sendo considerados somente picos em que a similaridade entre os espectros foi maior que 80%. Os índices de retenção experimentais (RI Exp.) foram obtidos através da injeção de uma série homóloga de alcanos e comparados aos índices de retenção da literatura (RI Lit.) (2, 29).

### **Análises estatísticas**

Todos os ensaios foram organizados em delineamento inteiramente casualizados com cinco repetições por tratamento. Os resultados foram previamente submetidos a testes de normalidade (Shapiro -Wilk) e da homogeneidade de variância dos erros (Bartlett). Uma vez atendidos a esses pressupostos, aplicou-se o teste F, por meio da análise de variância (ANOVA). Quando os testes de F foram significativos (P <0,05) procedeu-se à comparação entre médias pelo teste de Tukey (P <0,05). Os ensaios com COVs bacterianos *in vitro* e *in vivo* foram realizados duas vezes com resultados semelhantes.

## Resultados

### Isolamento e identificação das bactérias

Foram obtidos 49 isolados bacterianos das massas de ovos de *M. paranaensis* e de tecidos corticosos de cafeeiro. Foram identificados 13 isolados bacterianos pelo sequenciamento do gene ribossomal 16S no Laboratório de Bioquímica Fitopatológica do Instituto Biológico de São Paulo, destes, 7 pertencem ao gênero *Pseudomonas*. Os dados obtidos no processo de identificação sugerem a proximidade de algumas espécies. Assim, um dos treze isolados foi identificado como *Bacillus cereus* ou *thuringiensis*, devido a impossibilidade de distinguir as duas espécies com base no gene 16S. Espécies de outros gêneros também foram identificados como *Rhizobium pusense*, *Chryseobacterium gallinarum*, *Leclercia adecarboxilata*, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Acinetobacter oleivorans* (**Tabela 1**). As duas áreas amostradas no campo não demonstraram diferenças qualitativas quanto as espécies identificadas. Para prosseguir com os testes *in vitro* e *in vivo* foi realizada uma avaliação preliminar com base nos dados sobre imobilidade e mortalidade de J<sub>2</sub> na presença dos COVs bacterianos e então, selecionados 23 isolados para prosseguir nas avaliações detalhadas a seguir.

### Imobilidade e mortalidade de J<sub>2</sub> de *M. incognita* pelos COVs bacterianos

Os J<sub>2</sub> de *M. incognita* expostos aos COVs emitidos pelos vinte e três isolados bacterianos, apresentaram imobilidade e mortalidade variáveis, porém, todas foram significativamente maiores ( $P < 0,001$ ) comparados ao controle. A imobilidade variou de 74% a 100% e mortalidade de 32% a 90%. Em grande número de isolados (vinte e dois) a imobilidade foi maior de 90% enquanto a mortalidade na maioria dos isolados ficou entre 45% e 65% (**Figura 2**).

### **Mortalidade de J<sub>2</sub> de *M. incognita* em suspensões na água exposta aos COVs bacterianos**

Os J<sub>2</sub> de *M. incognita* que foram suspensos na água exposta aos voláteis emitidos pelos vinte e três isolados bacterianos, apresentando mortalidades ( $P < 0,001$ ) variáveis. Excetuando os isolados B15, B20 e B24, os COV de todos os outros isolados bacterianos promoveram a mortalidade dos J<sub>2</sub> quando comparados ao controle ( $P < 0,01$ ), variando de 22% a 42%. Por outro lado, os isolados que apresentaram mortalidade acima de 35% em J<sub>2</sub> quando expostas aos COVs foram B10, B11, B30, B32, B35 e B38 (**Figura 3**).

### **Infectividade e reprodução de *M. incognita* a partir de J<sub>2</sub> expostos aos COVs bacterianos**

A infectividade e a reprodução de todos os isolados bacterianos expressas em número de galhas e ovos, foram significativamente reduzidas comparadas ao controle. A redução do número de galhas variou entre 32% a 96%, enquanto a redução no número de ovos variou de 8% a 97% quando comparado ao controle. Os COVs dos isolados B24 e B29 de *Pseudomonas* sp foram os que causaram maior redução no número de galhas (87% e 88%) e ovos (93% e 97%). Além disso, o isolado *Stenotrophomonas maltophilia* (B40) também causou elevada redução no número de ovos (90%), no entanto, a redução no número de galhas (35%) não foi tão pronunciada. Por outro lado, o isolado B04 foi o que mais reduziu o número de galhas, no entanto, ficou no segundo grupo de isolados que mais reduziram o número de ovos (**Figura 4**).

### **Infectividade e reprodução de *M. incognita* a partir de J<sub>2</sub> em suspensões na água exposta aos COVs bacterianos**

A infectividade e reprodução dos J<sub>2</sub> expressas em número de galhas e ovos, respectivamente, foram na maioria dos isolados bacterianos reduzida significativamente quando comparados ao controle. A redução do número de galhas variou de 13% a 66%

enquanto o número de ovos variou entre 8% a 75% quando comparados ao controle. Os COVs dos isolados B09, B10, B38, B40 (*S. maltophilia*) e B41 (*P. taiwanensis*) que dissolveram na água, foram os que mais reduziram o número de galhas (maior a 53%) e ovos (maior a 60%). No entanto, os COVs dos isolados B20 e B24, B29 (*Pseudomonas* sp.), reduziram também o número de ovos (67%, 69% e 67%, respectivamente), porém, a redução do número de galhas (41%, 34% e 30% respectivamente) não foi tão pronunciada. Por outro lado, o isolado B30 foi um dos que mais reduziu o número de galhas (56%) e ficou no segundo grupo de isolados que mais reduziram o número de ovos (51%) (**Figura 5**).

#### **Caracterização das moléculas voláteis emitidos pelos isolados bacterianos e na água exposta aos COVs através da cromatografia gasosa GC-MS**

Nas análises por CG-MS foram identificados 16 compostos voláteis, os quais foram emitidos pelos isolados bacterianos. As moléculas foram identificadas e divididas em 6 classes: ésteres (3metiltiobutanoato de etila e 3-hidroxy butanoato de etila), álcoois (2-metil-1-butanol, 2-etil-hexanol), cetonas (2-undecanona e 2-tridecanona) ácidos carboxílicos (ácido acético, ácido 2-metil-propanóico, ácido butanoico, ácido 3-metilbutanóico, ácido 2-metilbutanóico), sulfurados (dissulfeto de dimetila, trissulfeto de dimetila, tetrassulfeto de dimetila) e outras. Quatorze moléculas foram encontradas nos vapores e três na água exposta aos COVs nas emissões dos três isolados estudados (B01, B12 e B44). Maior número de moléculas (cinco) encontradas nas emissões de B01 e pertencem à classe dos ácidos carboxílicos, enquanto no isolado B44, o maior número (três) pertencem à classe dos compostos sulfurados. Foram identificados três compostos retidos na água exposta aos isolados bacterianos: 2-etil-hexanol e dois compostos sulfurados (dissulfeto de dimetila e trissulfeto de dimetila) (**Tabela 2**).



## Discussão

Estudos realizados no local de infecção de *Meloidogyne* e de suas massas de ovos têm investigado a incidência e efeitos de fungos e bactérias não fitopatogênicos que usam a matriz gelatinosa como residência (14, 25). No entanto, isolados bacterianos presentes em massas de ovos de *M. paranaensis* como *Pseudomonas sp.*, *B. cereus/thuringiensis*, *Rhizobium pusense*, *Chryseobacterium gallinarum*, *Leclercia adecarboxilata*, *S. maltophilia* e *Acinetobacter oleivorans* encontrados neste trabalho têm sido relatadas como agentes no controle biológico de nematoide parasitas de plantas (23, 30, 39). Por exemplo, *Bacillus spp* inibem o crescimento de grande número de patógenos de plantas por antagonismo, produzem antibióticos e pela produção de enzimas degradam os polímeros estruturais de fungos, além de emissões de voláteis antifúngicos (3). Gu et al., (21) observaram que 149 isolados de bactérias tiveram mais de 20% de atividade nematicida contra *Panagrellus redivivus*, e *Bursaphelenchus xylophilus*, destacando a espécie *S. maltophilia* que também foi encontrada em massas de ovos de *M. paranaensis* neste trabalho. Uma outra forma de ação de rizobactérias como *P. putida* e *P. fluorescens* é a influência direta na migração dos nematoides infectivos através da raiz (15).

Neste trabalho, a alta imobilidade e mortalidade de J<sub>2</sub> de *M. incognita* introduzido na câmara de gás formada nas placas de Petri, demonstram os efeitos nematicidas e nematostáticos dos COVs emitidos pelas culturas bacterianas. A imobilidade e mortalidade de J<sub>2</sub> de *M. incognita* e de outros nematoides têm sido observados após a exposição dos COVs de plantas e de microrganismos como fungos e bactérias (8). Abdelnabby et al (1) demonstraram que a mobilidade de J<sub>2</sub> de *M. incognita* cessou após exposição por 24 horas a *B. thuringiensis*. A exposição aos compostos voláteis de *Bacillus sp* isolados de massas de ovos de *M. paranaensis* neste trabalho, mostraram alta imobilidade dos J<sub>2</sub> expostos e a consequente baixa infectividade e reprodução de *M. incognita*, esse resultado concorda com Dhawan et al. (16),

que demonstraram imobilidade completa de *M. incognita* após exposição aos voláteis emitidos por *B. thuringiensis* durante 24 horas, bem como a mortalidade de juvenis expostos a voláteis de *B. cereus* (28). Também a alta imobilidade e mortalidade dos J<sub>2</sub> de *M. incognita* quando expostos aos COVs de *Pseudomonas* sp neste trabalho concorda com os resultados alcançados por Siddiqui et al., (34) nos quais isolados de *Pseudomonas* causaram inibição na eclosão e na penetração de *M. incognita* em plantas de ervilha (*Pisum sativum*).

A infectividade e a reprodutibilidade de *M. incognita* a partir de J<sub>2</sub> expostos aos COVs bacterianos e a água exposta aos COVs das diferentes bactérias isoladas de massas de ovos de *M. paranaensis* foram significativamente reduzidas comparadas ao controle, comprovando o efeito nematostático e nematicida já avaliada pela imobilidade e mortalidade neste trabalho. Grimme et al (20) observaram que água exposta aos COVs do fungo *M. albus* tornou-se tóxica a *M. incognita* após uma semana de exposição. Terra et al. (37) observaram imobilidade de 100% em J<sub>2</sub> de *M. incognita* misturado a água exposta aos COVs do isolado 21 de *F. oxysporum* de massas de ovos de *M. exigua* do cafeeiro. Costa et al (14) estudando massas de ovos de *M. exigua* encontraram bactérias emissoras de COVs tóxicos a *M. incognita*.

A maioria das moléculas emitidas pelos isolados bacterianos e identificados por GC/MS neste trabalho foram agrupados em ésteres, álcoois, fenóis, aldeídos, cetonas, ácidos carboxílicos e sulfurados também foram encontrados por Abdelnabby et al, (1) nas emissões de COVs emitidos por *B. simplex*, *B. subtilis*, *Serratia marcescens* e *Streptomyces maltophilia*, destacando-se a alta atividade nematicida do 2-undecanone e dimethyl disulfide também encontrados nas emissões de bactérias isoladas de massas de ovos de *M. paranaensis*.

Algumas das moléculas identificadas neste trabalho, têm relatos de efeitos nematicidas, como: 2-metil-1-butanol (4, 18, 19), 2-undecanona (3, 5, 17, 21, 23, 30, 31, 39), 2-tridecanona (3, 17, 26, 31, 39), ácido acético (3); ácido 2-metil-propanóico (4); ácido 3-metilbutanóico

(4); ácido 2-metilbutanóico (4); dissulfeto de dimetila (5, 21, 23, 30, 39) e trissulfeto de dimetila (17).

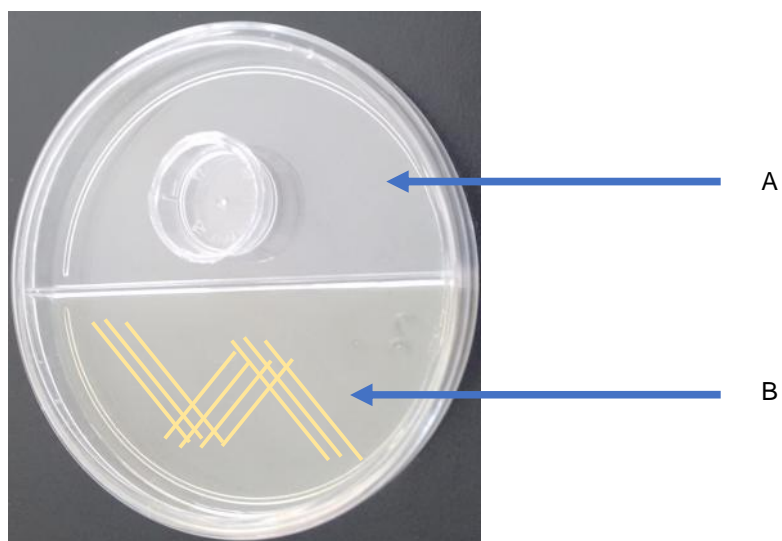
Existem na literatura exemplos de aplicação de moléculas: 2-metil-1-butanol, também encontrada em emissões de *Saccharomyces cerevisiae*, demonstrou alto efeito nematicida contra *M. javanica* e também efeito fungicida contra *Guignardia citricarpa* (18,19). Vapores de dissulfeto de dimetila causaram 100% de mortalidade dos nematoides *Bursaphelenchus xylophilus* e *Panagrellus redivivus* (21). Moléculas 2-undecanona e dissulfeto de dimetila produzidos pela bactéria *Bacillus megaterium* mostraram alta atividade nematicida em J<sub>2</sub> e ovos de *M. incognita* (23). Xu et al. (39) obtiveram uma alta atividade nematicida com dissulfeto de dimetila contra *Caenorhabditis elegans* e *Meloidogyne incognita*. Popova et al. (30) demonstraram que 2-undecanone e dissulfeto de dimetila produzidos pelas bactérias *Pseudomonas chlororaphis* 449 e *Serratia proteamaculans* 94, tiveram efeitos nematicidas contra *Caenorhabditis elegans*.

São diversas as bactérias que ocorrem nas massas de ovos de *M. paranaensis* no cafeeiro. Os COVs emitidos tanto na fase de vapor como retidos na água exposta a eles, causaram imobilidade, mortalidade dos J<sub>2</sub>, além de perdas na infectividade e reprodução de *M. incognita* em tomateiro. Maior número de moléculas foi sempre constatado na fase de vapor comparado aos retidos em água.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem à EPAMIG (Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais) através da pesquisadora Sonia Maria de Lima Salgado por disponibilizar o uso da área experimental de Piumhí (Minas Gerais). Também agradecemos o apoio financeiro concedido pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho

Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Apoio a Pesquisas do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).



**Figura 1:** Técnica para o estudo dos compostos orgânicos voláteis em placas bipartidas, emitidos pelos isolados bacterianos seguido do fechamento com filme plástico. A) Compartimento da placa de Petri com o recipiente plástico para receber o organismo teste (suspensão de juvenis de segundo estágio ( $J_2$ ) de *Meloidogyne incognita*), B) Compartimento da placa de Petri contendo a fonte de COVs (isolados bacterianos).

**Tabela 1:** identificação dos isolados bacterianos obtidos de massas de ovos de *Meloidogyne paranaensis* e de tecidos corticosos de raiz coletados em duas áreas cafeeiras da mesma propriedade na cidade de Piumhi, MG, Brasil.

No.	Código*	Identificação pelo sequenciamento do gene ribossomal 16S
1	01	<i>Bacillus cereus/thuringiensis</i>
2	11	<i>Pseudomonas sp.</i>
3	12	<i>Pseudomonas sp.</i>
4	15	<i>Rhizobium pusense</i>
5	24	<i>Pseudomonas sp.</i>
6	29	<i>Pseudomonas sp.</i>
7	31	<i>Chryseobacterium gallinarum</i>
8	32	<i>Leclercia adecarboxilata</i>
9	39	<i>Pseudomonas monteilii</i>
10	40	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
11	41	<i>Pseudomonas taiwanensis</i>
12	44	<i>Pseudomonas sp.</i>
13	47	<i>Acinetobacter oleivorans</i>

\*Código referente à coleção onde os fungos estão depositados.

**Tabela 2:** Compostos orgânicos voláteis identificados por SPME-GC-MS em vapores ou retidos em água nas emissões voláteis de *Bacillus sp* e *Pseudomonas sp*.

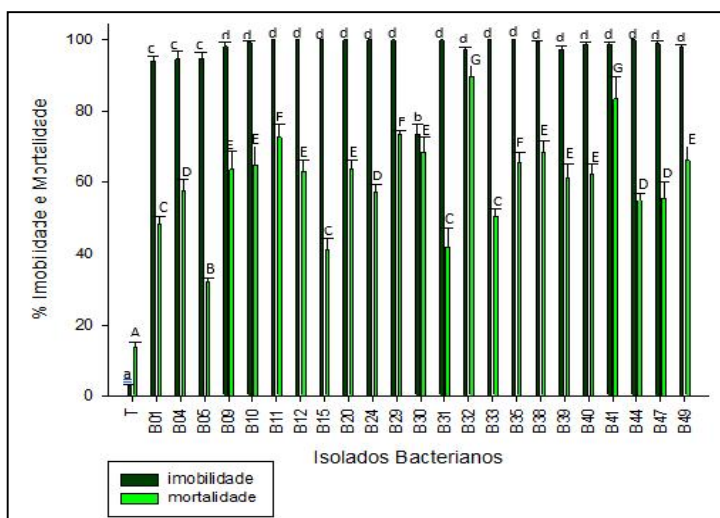
Composto <sup>x</sup>	IR EXP	IR Teórico <sup>y</sup>	Match	<i>Bacillus sp</i> isolado B01		<i>Pseudomonas sp</i> isolado B12		<i>Pseudomonas sp</i> isolado B44	
				Vapor	Retido em água	Vapor	Retido em água	Vapor	Retido em água
<b>Ésteres</b>									
3metiltiobutanoato de etila	935	x	80					v	
3-hidroxy butanoato de etila	937	x	88	v					
<b>Álcoois e fenóis</b>									
2-metil-1-butanol	737	734	93	v		v		v	
2-etil-hexanol	1029	1029	91			v	vv		
<b>Cetonas</b>									
2-undecanona	1285	1293	93			v			
2-tridecanona	1491	1495	92			v			
<b>Ácidos carboxílicos</b>									
ácido acético	633	600	90	v					
ácido 2-metil-propanóico	791	790	96	v					
ácido butanóico	816	821	87	v					
ácido 3-metilbutanóico	865	858	801	v					

ácido 2-metilbutanóico	890	873	90	v		
<b>Sulfurados</b>						
Dissulfeto de dimetila	737	738	92			v v
trissulfeto de dimetila	968	968	88			v v
tetrassulfeto de dimetila	1207	1211	95			v
<b>Outros</b>						
dioxido de carbono	x	x	94	v	v	
não identificado	1084	x			vv	v

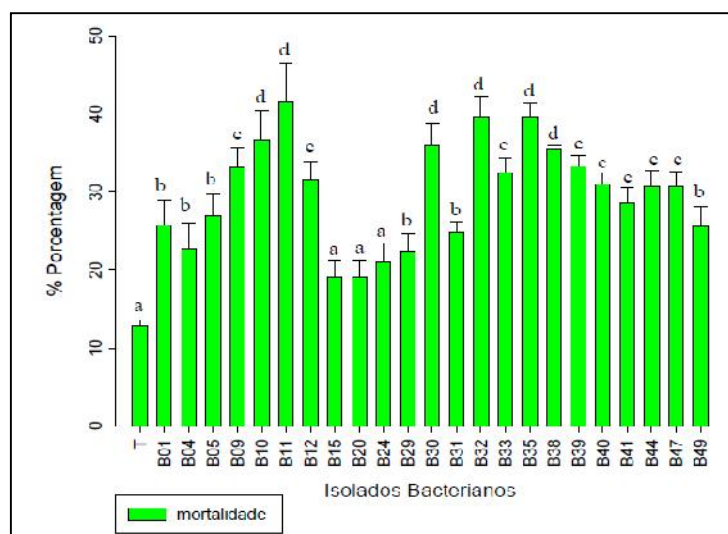
V- compostos presentes nas amostras

<sup>x</sup>- Compostos identificados por Cromatografia Gasosa

<sup>y</sup>- índices de retenção teóricas de acordo com a literatura (RP Adams, Identificação dos componentes do óleo essencial por Cromatografia Gasosa / Espectrometria de Massa, 4ª Ed., Allured Publishing Corp., Carol Stream, 2007.) (<http://webbook.nist.gov/química/>)

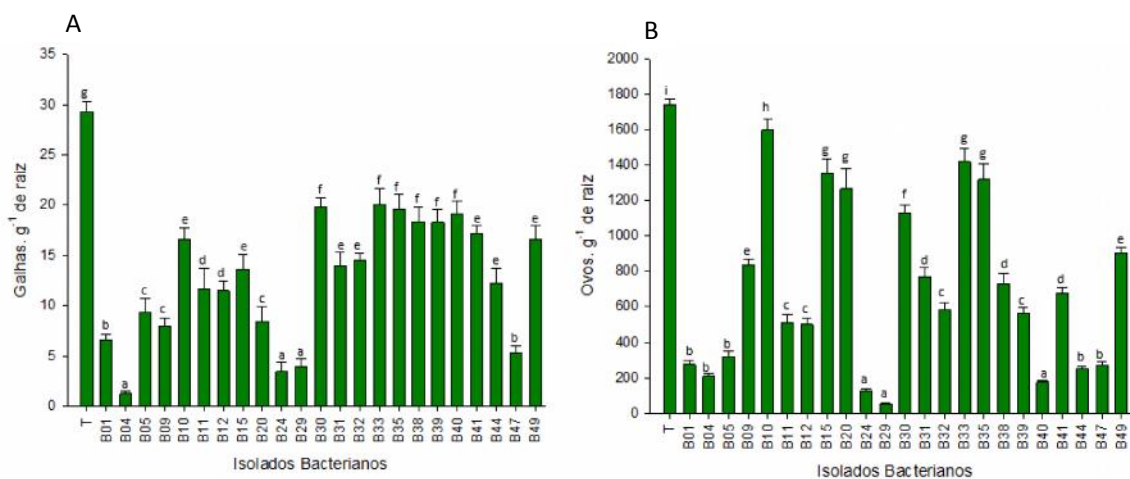


**Figura 2:** Porcentagem da imobilidade e da mortalidade de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne incognita* pela exposição aos compostos orgânicos voláteis produzidos por diferentes isolados bacterianos obtidos de massas de ovos de *M. paranaensis*. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). T = controle

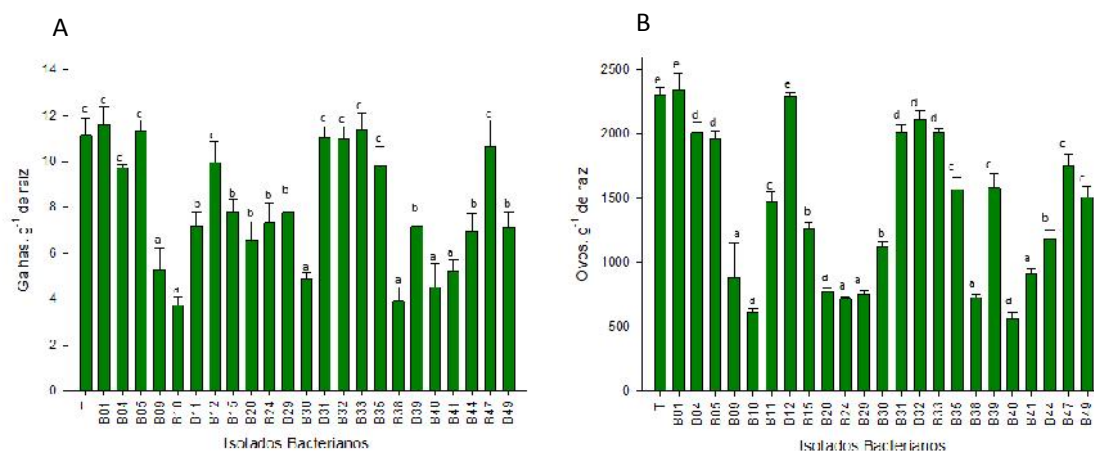


**Figura 3:** Porcentagem da mortalidade de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne incognita* em suspensões na água exposta aos compostos orgânicos voláteis produzidos por diferentes isolados bacterianos obtidos de massas de ovos de *M. paranaensis*. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). T = controle.





**Figura 4:** Infectividade (A) e reprodução (B) de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne incognita* pela exposição aos compostos orgânicos voláteis produzidos por diferentes colônias bacterianas obtidas de massas de ovos de *M. paranaensis*. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). T = controle.



**Figura 5:** Infectividade (A) e (B) de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne incognita* em suspensão na água exposta aos compostos orgânicos voláteis produzidos por diferentes colônias bacterianas obtidas de massas de ovos de *M. paranaensis*. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). T = controle.

## Referências

1. Abdelnabby, H.M.; Mohamed, H.A.; Abo, Aly H.E. Nematode-antagonistic compounds from certain bacterial species. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v.21, n.2, p. 209-217, 2011.
2. Adams, R.P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography /Mass Spectrometry**. 4th ed. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, Illinois USA, 2007.
3. Arrebola, E.; Sivakumar, D.; Korsten, L. Effect of volatile compounds produced by *Bacillus* strains on postharvest decay in citrus. **Biological control**, v.53, n.1, p.122-128, 2010.
4. Basseto, M.A.; Bueno, C.J.; Augusto, F.; Pedroso, M.P.; Furlan, M.F.; Padovani, C.R.; Furtado, E.L.; Souza, N.L. Solarização em microcosmo: efeito de materiais vegetais na sobrevivência de fitopatógenos de solo e na produção de voláteis. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.38, n.2, p.123-130, 2012.
5. Briard, B.; Heddergott, C.; Latgé, J. Volatile compounds emitted by *Pseudomonas aeruginosa* stimulate growth of the fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. **mBIO®**, USA, v.7, n.2, p.1-5, 2016.
6. Campos, V.P. Controle de doenças causadas por nematóides. In: Vale, F.X.R., Zambolim, L., (ed). **Controle de Doenças de Plantas**. Vol. I. Editora Universitária, Viçosa (MG), p.141-170, 1997.
7. Campos, V.P.; Villain, L. Nematode parasites of coffee and cocoa. In: Luc, M., Sikora, R.A., Bridge, J. (Ed). **Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture**. 2.ed. Wallingford: CABI p.189-204, 2005.
8. Campos, V.P.; Pinho, R.S.C.; Freire, E.S. Volatiles produced by interacting microorganisms potentially useful for the control of plant pathogens. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, MG, Brazil v.34, p.525-535, 2010.
9. Carneiro, R.M.D.G.; Carneiro, R.G.; Abrantes, I.M.O. *Meloidogyne paranaensis* n.sp., a root-knot nematode parasitizing coffee in Brazil. **Journal of Nematology**, v.28, p.177-189, 1996.
10. Castro, J.M.C.; Campos, V.P. Detecção de *Meloidogyne paranaensis* em cafeeiros do Sul de Minas Gerais. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.30, n.4, p.507, 2004.
11. Castro, J.M.C.; Campos, V.P.; Pozza, E.A.; Naves, R.L.; Andrade Junior, W.C.; Dutra, M.R.; Coimbra, J.L.; Maximiniano, C.; Silva, J.R.C. Levantamento de fitonematoides em cafezais do Sul de Minas. **Nematologia Brasileira**, v.32, p.56-64, 2008.

12. Castro, J.M.C.; Naves, R.L.; Campos, V.P. Ocorrência de *Meloidogyne paranaensis* em cafeeiro na região Alto Paranaíba em Minas Gerais. **Fitopatologia Brasileira**, v.28, p.565, 2003.
13. CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento- **Acompanhamento da Safra Brasileira de Café**, Primeiro levantamento safra janeiro 2016, v.1, p.1-68, 2016.
14. Costa, L.S.A.S.; Campos, V.P.; Terra, W.C.; Pfenning, L.H. Microbiota from *Meloidogyne exigua* egg mass and evidence for the effect of volatiles on infective survival. **Nematology**, p.1-10, 2015.
15. Davies, K.G.; Timper, P. Biotic interactions, in: Gaugler R, Bilgrami A, (Eds.), *Nematode Behaviour*. **CAB International**, p.277-297, 2004.
16. Dhawan, S.C.; Sarvjeet, K.; Aqbal, S. Effect of *Bacillus thuringiensis* on the mortality of root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. **Indian Journal of Nematology**, v.34, n.1, p.98-99, 2004.
17. Fernando, W.G.D.; Ramarathnama, R.; Krishnamoorthy, A.S.; Savchuka, S.C. Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol. **Soil Biology & Biochemistry**, v.37, p. 955-964, 2005.
18. Fialho, M.B.; Toffano, L.; Pedroso, M.P.; Augusto, F.; Pascholati, S.F. Volatile organic compounds produced by *Saccharomyces cerevisiae* inhibit the in vitro development of *Guignardia citricarpa*, the causal agent of citrus black spot. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.26, p. 925-932, 2010.
19. Fialho, M.B.; Bessi, R.; Inomoto, M.M.; Pascholati, S.F. Nematicidal effect of volatile organic compounds (VOCs) on the plant-parasitic nematode *Meloidogyne javanica*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.38, p.152-154, 2012.
20. Grimme, E.; Zidack, N.K.; Sikora, R.A.; Strobel, G.A.; Jacobsen, B.J. Comparison of *Muscodor albus* volatiles with a biorational mixture for control of seedling diseases of sugar beet and root-knot nematode on tomato. **Plant Disease**, Washington, D.C, USA v.91, p.220-225, 2007.
21. Gu, Y.Q.; Mo, M.; Zhou, J.; Zou, C.; Zhang, K.Q. Evaluation and identification of potential organic nematicidal volatiles from soil bacteria. **Soil biology & biochemistry**, v.39, p.2567-2575, 2007.
22. Hallmann, J.; Sikora, R.A. Occurrence of plant parasitic nematodes and nonpathogenic species of *Fusarium* in tomato plants in Kenya and their role as mutualistic synergists for biological

- control of root knot nematodes. **International Journal of Pest Management** v.40, p.321-325, 1994.
23. Huang, Y.; Xu, C.; Ma, L.; Zhang, K.; Duan, C.; Mo, M. Characterisation of volatiles produced from *Bacillus megaterium* YFM3.25 and their nematocidal activity against *Meloidogyne incognita*. **European Journal of Plant Pathology**, Netherlands, v.126, p.417–422, 2010.
  24. Hussey, R.S.; Barker, K.R.A. Comparison of methods for collecting inocula of *Meloidogyne* spp including a new technique. **Plant Disease Reporter**, v.57, n.12, p.1025-1028, 1973.
  25. Kok, C.J.; Papert, A.; Kok-A-Hin, C.H. Microflora of *Meloidogyne* egg masses: species composition, population density and effect on the biocontrol agent *Verticillium chlamydosporium* (Goddard). **Nematology**, v.3, n.8, p.729-734, 2001.
  26. Liu, W.; Mu, W.; Zhu, B.; Liu, F. Antifungal activities and components of VOCs produced by *Bacillus subtilis* G8. **Current Research in Bacteriology**, v.1, p.28-34, 2008.
  27. Lopes, E.A.; Ferraz, S.; Freitas, L.G.; Ferreira, P.A. Controle de *Meloidogyne javanica* com diferentes quantidades de torta de nim (*Azadirachta indica*). **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, Chapadinha, v.2, n.1, p.17-21, 2008.
  28. Nagesh, M.; Asokan, R.; Mohan, K.S. Partial characterization of novel nematocidal toxins from *Bacillus cereus* Frankland 1887 and their effect on root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood. **Journal Biological Control**, v.19, n.1, p.65-69, 2005.
  29. NIST. **Chemistry Webook-National Institute of Standards and Technology**. <http://webbook.nist.gov/chemistry/>. Accessed February 2017
  30. Popova, A.A.; Koksharova, A.O.; Lipasova, V.A.; Zaitseva, J.V.; Katkova-Zhukotskaya, O.A.; Eremina, S.I.; Mironov, A.S.; Chernin, L.S.; Khmel, I.A. Inhibitory and toxic effects of volatiles emitted by strains of *Pseudomonas* and *Serratia* on growth and survival of selected microorganisms, *Caenorhabditis elegans*, and *Drosophila melanogaster*. **BioMed Research International**, 11p, 2014.
  31. Raza, W.; Wang, J.; Wu, Y.; Ling, N.; Wei, Z.; Huang, Q.; Shen, Q. Effects of volatile organic compounds produced by *Bacillus amyloliquefaciens* on the growth and virulence traits of tomato bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum*. **Applied Microbiology and Biotechnology Journal**, v.100, p.7639–7650, 2016.
  32. Salgado, S.M.L.; Carneiro, R.M.D.G.; Pinho, R.S.C. Aspectos técnicos dos nematóides parasitas do cafeeiro. **Boletim Técnico. Lavras: EPAMIG**, v.98, 60p, 2011.
  33. Salgado, S.M.L.; Guimarães, N.M.R.B.; Botelho, C.E.; Tassone, G.A.T.; Marcelo, A.L.; Souza, S.R.; Oliveira, R.D.L.; Ferreira, D.F. *Meloidogyne paranaensis* e *Meloidogyne exigua* em

- lavouras cafeeiras na região sul de Minas Gerais. **Coffee Science**, Lavras, v.10, n.4, p.475 – 481, 2014.
34. Siddiqui, Z.A.; Qureshi, A.; Akhtar, M.S. Biocontrol of root-knot nematode *Meloidogyne incognita* by *Pseudomonas* and *Bacillus* isolates on *Pisum sativum*. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v.42, n.12, p.1154-1164, 2009.
  35. Silva, G.S.; Souza, I.M.R.; Cutrim, F.A. Efeito da incorporação de sementes trituradas de feijão de porco ao solo sobre o parasitismo de *Meloidogyne incognita* em tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.27, p.412-413, 2002.
  36. Stirling, G.R.; Mankau, R. Mode of parasitism of *Meloidogyne* and other nematode eggs by *Dactylella oviparasitica*. **Journal of Nematology**, v.11, p.282-288, 1979.
  37. Terra, W.C.; Campos, V.P.; Pedroso, M.P.; da Costa, A.L.; Freire, E.S.; de Pinto, I.P.; da Silva, J.C.P.; Lopez, L.E.; Santos, T.C.N. Volatile molecules of *Fusarium oxysporum* strain 21 are retained in water and control *Meloidogyne incognita*. **Biological Control**, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.06.004>, 2017.
  38. Valente, P.A.L.; Augusto, F. Microextração por fase sólida. **Química Nova**, São Paulo, Brazil, v.23, 4p, 2000.
  39. Xu, Y.Y.; Lu, H.; Wang, X.; Zhang, K.Q.; Li, G.H. Effect of volatile organic compounds from bacteria on nematodes. **Chemistry & biodiversity**, v.12, p.1415-1421, 2015.

**Apêndice A:** Porcentagem da imobilidade, mortalidade e redução da infectividade e reprodução de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne incognita* pela exposição aos compostos orgânicos voláteis produzidos por diferentes isolados bacterianos obtidos de massas de ovos de *M. paranaensis*, quando comparado ao controle.

<b>Isolados bacterianos</b>	<b>Imobilidade (%)</b>	<b>Mortalidade (%)</b>	<b>Redução de galhas g<sup>-1</sup> de raiz (%)</b>	<b>Redução de ovos g<sup>-1</sup> de raiz (%)</b>
Controle	3 a	14 a	0 g	0 i
B01	94 c	49 c	77 b	84 b
B04	95 c	58 d	96 a	88 b
B05	95 c	32 b	68 c	82 b
B09	95 d	64 e	73 c	52 e
B10	99 d	65 e	43 e	8 h
B11	100 d	73 f	60 d	71 c
B12	100 d	63 e	61 d	71 c
B15	100 d	41 c	53 e	22 g
B20	100 d	64 e	71 c	27 g
B24	100 d	57 d	88 a	93 a
B29	100 d	74 f	87 a	97 a
B30	74 b	69 e	32 f	35 f
B31	100 d	42 c	52 e	56 d
B32	97 d	90 g	50 e	67 c
B33	100 d	51 c	32 f	18 g
B35	100 d	66 e	33 f	24 g
B38	99 d	69 e	37 f	58 d
B39	98 d	61 e	38 f	68 c
B40	99 d	62 e	35 f	90 a
B41	99 d	84 g	42 e	61 d
B44	100 d	55 d	58 e	85 b
B47	99 d	56 d	82 b	84 b
B49	98 d	66 e	43 e	48 e

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

**Apêndice B:** Porcentagem da mortalidade e redução da infectividade e reprodução de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne incognita* em suspensões na água exposta aos compostos orgânicos voláteis produzidos por diferentes isolados bacterianos obtidos de massas de ovos de *M. paranaensis*, quando comparado ao controle

Isolados bacterianos	Mortalidade (%)	Redução de galhas g <sup>-1</sup> de raiz (%)	Redução de ovos g <sup>-1</sup> de raiz (%)
Controle	13 a	0 c	0 e
B01	26 b	0 c	0 e
B04	23 b	13 c	13 d
B05	27 b	2 c	15 d
B09	33 c	53 a	62 a
B10	37 d	66 a	73 a
B11	42 d	35 b	36 c
B12	32 c	11 c	0 e
B15	19 a	30 b	45 b
B20	19 a	41 b	67 a
B24	21 a	34 b	69 a
B29	22 b	30 b	67 a
B30	36 d	56 a	51 b
B31	25 b	1 c	12 d
B32	40 d	2 c	8 d
B33	32 c	0 c	13 d
B35	40 d	12 c	32 c
B38	35 d	65 a	68 a
B39	33 c	36 b	31 c
B40	31 c	60 a	75 a
B41	29 c	53 a	60 a
B44	31 c	38 b	49 b
B47	31 c	5 c	24 c
B49	26 b	36 b	35 c

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).