



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

CAMILA TORRES STROZE

**HOSPEDABILIDADE DE *Tagetes minuta* A
FITONEMATOIDES E UTILIZAÇÃO COMO ALTERNATIVA
DE CONTROLE**

Londrina
2017

CAMILA TORRES STROZE

**HOSPEDABILIDADE DE *Tagetes minuta* A
FITONEMATOIDES E UTILIZAÇÃO COMO ALTERNATIVA
DE CONTROLE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Agronomia da Universidade Estadual de Londrina,
como requisito à obtenção do título de Doutor em
Agronomia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Débora Cristina Santiago.

Londrina
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Stroze, Camila Torres.

Hospedabilidade de *Tagetes minuta* a fitonematoides e utilização como alternativa de controle / Camila Torres Stroze. - Londrina, 2017.
82 f. : il.

Orientador: Débora Cristina Santiago.

Coorientador: Maria Isabel Balbi Peña.

Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2017.
Inclui bibliografia.

1. Controle alternativo - Tese. 2. Cravo-de-defunto - Tese. 3. Extratos vegetais - Tese. 4. Nematoides - Tese. I. Santiago, Débora Cristina. II. Peña, Maria Isabel Balbi. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. IV. Título.

CAMILA TORRES STROZE

**HOSPEDABILIDADE DE *Tagetes minuta* A FITONEMATOIDES E
UTILIZAÇÃO COMO ALTERNATIVA DE CONTROLE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Agronomia da Universidade Estadual de Londrina,
como requisito à obtenção do título de Doutor em
Agronomia.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof. Dr^a. Débora Cristina Santiago
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Dr^a. Adriana Figueiredo
Monsanto do Brasil

Prof^a. Dr^a. Claudia Regina Dias-Arieira
Universidade Estadual de Maringá - UEM

Prof^a. Dr^a. Inês Cristina Batista Fonseca
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Hirohide Sumida
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 17 de Março de 2017.

Dedico...

A Deus, pois foi Nele que encontrei forças para sempre continuar.

Aos meus pais, Terezinha e José Carlos, pelo apoio incondicional em todas as fases de minha vida, em especial nesse momento.

A minha filha, Manuela Stroze Baida.

Ao eterno namorado, Fernando Cesar Baida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me dar oportunidade, discernimento, calma e força para subir mais esse degrau na minha vida.

À Universidade Estadual de Londrina e ao Departamento de Agronomia, pela oportunidade de realização do curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudo.

Agradeço a minha orientadora Prof. Dr. Débora Cristina Santiago, pelo apoio incondicional, por acreditar na minha competência e no meu amor a profissão.

Aos membros da Banca Examinadora, pelas sugestões, que contribuíram para a melhoria deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Edmilson Bianchini, professor do Departamento de Biologia Animal e vegetal e aos técnicos dos Laboratórios de Apoio à Pesquisa Agropecuária (LAPA) e de Fitopatologia, pelo apoio, colaboração, amizade e pela agradável convivência nos Laboratórios.

À minha mãe Terezinha Torres, que sempre me apóia e fortalece a cada dia, pelo estímulo e amor incondicional desde os primeiros passos, pela paciência e ensinamentos para uma vida digna e com sabedoria.

Ao meu pai José Carlos Stroze exemplo de paciência, simplicidade, dedicação, amor e grande amizade.

Aos meus avós que partiram deixando muitas saudades e orgulho, João e Olga Stroze, Manuel e Antônia Torres.

À minha filha amada Manuela Stroze Baida, que sempre me dava força para continuar, me proporcionando momentos de extrema felicidade, alegria, companheirismo e amor.

Ao Dr. Fernando Cesar Baida, meu eterno namorado, pela ajuda, paciência, dedicação durante o desenvolvimento do trabalho e sobretudo pela convivência de todos esses anos sempre com muito amor.

À minha família, pelo constante apoio, sempre me confortando e ajudando principalmente nas horas mais difíceis.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente me apoiaram para a conquista deste trabalho e para o sucesso de mais uma etapa tão importante da minha vida.

“Ser homem é ser responsável. É sentir que colabora na construção do mundo.”

Antoine de Saint-Exupéry

STROZE, Camila Torres. **Hospedabilidade de *Tagetes minuta* a fitonematoides e utilização como alternativa de controle.** 2017. 82 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

RESUMO

Objetivou-se estudar o parasitismo de *Heterodera glycines*, *Meloidogyne incognita* e *Pratylenchus brachyurus* em *Tagetes minuta* bem como buscar o método ideal de obtenção de mudas em condição de casa de vegetação, conhecer a interação histológica planta-nematoide, além de avaliar o efeito dos extratos aquosos de caule e de folha de *T. minuta* na eclosão e mobilidade de juvenis de segundo estágio (J2) de *H. glycines* e *M. incognita* *in vitro* e *in vivo* a fim de avaliar o potencial nematicida dos extratos em duas formas de aplicação, com o objetivo de reduzir a reprodução de *H. glycines* e *M. incognita* na cultura da soja sob condições controladas. Para tanto no 1º artigo, estudou-se três formas de obtenção das mudas de *T. minuta*, sendo a partir de estacas lenhosas, estacas herbáceas e sementes. Após, realizou-se o estudo do parasitismo das espécies de nematoides em plantas de *T. minuta*. E aos cinco, 10 e 15 dias após a inoculação (DAI) foi avaliada a penetração de J2 nas raízes, e aos 30, 60 e 80 DAI avaliou-se a multiplicação dos nematoides nas raízes. Paralelamente, avaliou-se a interação planta-patógeno, com a observação do desenvolvimento dos nematoides no interior das raízes, por meio de cortes histopatológicos. Concluiu-se que a melhor forma de obtenção de mudas de *T. minuta* é a partir de estacas lenhosas. Quanto à penetração de J2, observou-se que todas espécies infectaram as raízes, porém *M. incognita* e *H. glycines* não estabeleceram o sítio de alimentação. Nas raízes não se observou alteração na morfologia das células de *T. minuta*, mas para *P. brachyurus* foi possível verificar consumo de células do parênquima, com lesões necróticas nas raízes. Para o 2º artigo foram testadas cinco concentrações (12,5; 25; 50; 75 e 100 mg mL⁻¹) dos extratos aquosos de caule e de folhas de *T. minuta*, para os ensaios de eclosão e mobilidade de *H. glycines* e *M. incognita*. As avaliações de eclosão de J2 foram feitas aos quatro, oito e 12 dias após a incubação e para mobilidade de J2 foram avaliados depois de 24 e 48 h após a separação dos extratos. A confirmação do efeito dos extratos foi realizada a partir da inoculação dos J2 eclodidos, dos respectivos ensaios, em plantas de tomate e soja, que foram mantidas em casa de vegetação e avaliadas aos 30 (*H. glycines*) e 60 (*M. incognita*) dias após a inoculação. Concluiu-se para *H. glycines* a concentração 100 mg mL⁻¹ do extrato de folha, apresentou os melhores resultados quanto a redução da eclosão e mobilidade de J2 com 67 e 62%, respectivamente. Já a concentração 12,5 mg mL⁻¹ do extrato de caule e de folha foi a mais eficiente para a inibição da eclosão de J2 de *M. incognita* em até 91%, comprometendo a reprodução dos nematoides em tomateiro em mais de 90% com o extrato de folha. E o 3º artigo, testou-se as mesmas concentrações dos extratos aquosos de caule e de folha, porém aplicadas em duas formas, diretamente no solo e via foliar com duas épocas (aos 15 e 30 dias após a inoculação), em plantas de soja cv. M6410 IPRO. As plantas foram mantidas em casa de vegetação até a plena floração, e ao final avaliou-se o número de ovos e J2 de *H. glycines* e *M. incognita* nas raízes. Os resultados mostraram que os extratos de caule e de folhas de *T. minuta* reduzem as populações de nematoides. E quando aplicados via foliar foram eficientes em controlar o desenvolvimento de *H. glycines*, sendo a melhor concentração de 75 mg mL⁻¹ (extrato de caule) e 25 mg mL⁻¹ (extrato de folha). Para o controle de *M. incognita* a aplicação via sulco de plantio foi a melhor forma de aplicação, na concentração 12,5 mg mL⁻¹ para ambos os extratos (caule e folhas).

Palavras-chave: Controle alternativo. Cravo-de-defunto. Extratos vegetais. Nematoides.

STROZE, Camila Torres. **Hospedability of *Tagetes minuta* to plant nematodes and alternative of control.** 2017. 82 p. Thesis (Doctoral Degree in Agronomy) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

ABSTRACT

The objective was to study the parasitism of *Heterodera glycines*, *Meloidogyne incognita* and *Pratylenchus brachyurus* in *Tagetes minuta* and seek the optimal method of obtaining seedlings in the greenhouse condition, knowing the histological plant-nematode, and to evaluate the effect of extracts (J2) of *H. glycines* and *M. incognita* *in vitro* and *in vivo* in order to evaluate the nematicidal potential of the extracts in two forms of application, with the objective of reducing the reproduction of *H. glycines* and *M. incognita* in soybean cultivation under controlled conditions. For both the 1st article studied are three ways of obtaining seedlings *T. minuta* being from woody cutting, herbaceous cuttings and seeds. After, the study of parasitic nematodes in plants *T. draft*. At 5, 10 and 15 days after inoculation (DAI) the J2 penetration was evaluated in the roots, and at 30, 60 and 80 DAI the nematode multiplication in the roots was evaluated. In parallel, the plant-pathogen interaction was evaluated, with the observation of nematode development within the roots, through histopathological cuts. It was concluded that the best way to obtain *T. minuta* seedlings is from woody cuttings. The penetration J2, it observed that all species infected roots, however *M. incognita* and *H. glycines* not establish the feeding site. The roots were not observed change in the morphology of the *T. minuta* cell, but the nematode was possible to verify consumption parenchymal cells with necrotic lesions on the roots. For the 2nd article, five concentrations (12.5, 25, 50, 75 and 100 mg mL⁻¹) of the aqueous extracts of stem and leaves of *T. minuta* were tested for the hatching and mobility assays of *H. glycines* and *M. incognita*. The J2 hatching was evaluated at four, eight and 12 days after incubation and J2 mobility were evaluated after 24 and 48 h after the separation of the extracts. Confirmation of the effect of the extracts was carried out the inoculation of J2 hatched respective tests in tomato and soybean plants, which were kept in the greenhouse and evaluated after 30 (*H. glycines*) and 60 (*M. incognita*) days after inoculation. It was concluded *H. glycines* concentration 100 mg mL⁻¹ leaf extract, showed the best results regarding the reduction of mobility and J2 hatch 67 and 62%, respectively. The 12.5 mg mL⁻¹ concentration of the stem and leaf extract was the most efficient for the inhibition of *M. incognita* J2 hatching by up to 91%, compromising nematode reproduction in tomato in more than 90% with the leaf extract. And the 3rd article, we tested the same concentrations of aqueous stem and leaf extracts, but applied in two forms, directly into soil and foliar with two times (at 15 and 30 days after inoculation) in soybean plants cv. M6410 IPRO. The plants were kept in a greenhouse until full bloom, and at the end the number of eggs and J2 of *H. glycines* and *M. incognita* in the roots were evaluated. The results showed that extracts the stem and leaves of *T. minuta* reduce nematode populations. When applied via leaf, they were efficient in controlling the development of *H. glycines*, being the best concentration of 75 mg mL⁻¹ (stem extract) and 25 mg mL⁻¹ (leaf extract). For *M. incognita* control application via a furrow was the best form of application, concentration 12.5 mg mL⁻¹ for both extracts (stem and leaves).

Keywords: Alternative control. Marigold. Nematodes. Vegetal extracts.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	12
2.	REVISÃO BIBLIOGRAFICA	16
2.1	NEMATOIDES	16
2.1.1	NEMATOIDE DO GÊNERO <i>MELOIDOGYNE SPP.</i>	17
2.1.2	NEMATOIDE DO GÊNERO <i>PRATYLENCHUS SP.</i>	19
2.1.3	NEMATOIDE <i>HETERODERA GLYCINES</i>	20
2.2	MEDIDAS GERAIS DE CONTROLE DE NEMATOIDE.....	22
2.2.1	CONTROLE DE NEMATOIDES COM PLANTAS ANTAGONISTAS	23
2.3	<i>TAGETES SPP.</i>	25
2.3.1	<i>TAGETES MINUTA</i>	27
3.	ARTIGO A: INTERAÇÃO DE <i>Tagetes minuta</i> COM <i>Meloidogyne incognita</i>, <i>Pratylenchus brachyurus</i> E <i>Heterodera glycines</i>	
3.1	RESUMO.....	9
3.2	ABSTRACT	30
3.3	INTRODUÇÃO	31
3.4	MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
3.6	CONCLUSÃO	43
4	ARTIGO B: EXTRATO AQUOSO DE <i>Tagetes minuta</i> SOBRE A ECLOSÃO, MOBILIDADE E REPRODUÇÃO DE NEMATOIDES	44
4.1	RESUMO.....	44
4.2	ABSTRACT	45
4.3	INTRODUÇÃO	46
4.4	MATERIAL E MÉTODOS.....	47
4.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4.6	CONCLUSÃO	57
5	ARTIGO C: APLICAÇÃO FOLIAR E EM SULCO DE PLANTIO DO EXTRATO AQUOSOS DE <i>Tagetes minuta</i> NO CONTROLE DE	

	<i>Meloidogyne incognita</i> E <i>Heterodera glycines</i> NA CULTURA DA SOJA	58
5.1	RESUMO.....	58
5.2	ABSTRACT	59
5.3	INTRODUÇÃO	60
5.4	MATERIAL E MÉTODOS.....	61
5.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
5.6	CONCLUSÃO	69
6	CONCLUSÃO.....	70
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

1. INTRODUÇÃO

Fitonematoides são patógenos de plantas com inúmeras espécies descritas, que liberam substâncias que induzem deformações ou provocam lesões necróticas nas raízes, impedindo as plantas de absorverem água e nutrientes, prejudicando assim seu desenvolvimento e, conseqüentemente, o potencial produtivo da cultura (HAEGEMAN et al., 2012).

Devido o tamanho microscópico e por, geralmente, os sintomas reflexos serem semelhantes a inúmeros outros problemas no solo e sistema radicular, como baixa fertilidade e compactação do solo, a presença desses patógenos nas áreas passa, por vezes, despercebida pelos agricultores, entretanto os danos causados por fitonematoides nas culturas podem variar de 1% até a morte da planta (TIHOHOD, 2000).

Estima-se que, anualmente, os fitonematoides sejam responsáveis por perdas agrícolas mundiais em torno de U\$ 157 bilhões de dólares (ABAD et al., 2008). No Brasil, dentre os fitonematoides de maior expressão estão os formadores de galhas (pertencentes ao gênero *Meloidogyne* Göeldi), o que causa as lesões radiculares (*Pratylenchus brachyurus* Filipjev) e o nematoide de cisto da soja (*Heterodera glycines* Ichinohe) (FERRAZ; BROWN, 2016).

Os nematoides de galhas (*Meloidogyne* spp.) são representados por mais de 90 espécies descritas (CARNEIRO; COFCEWICZ, 2008). Apresentam ampla distribuição geográfica e possuem ampla gama de hospedeiros, parasitando praticamente todas as plantas cultivadas com maior valor agregado (FREITAS; LIMA; FERRAZ, 2009). As perdas são comuns em culturas graníferas, oleaginosas, frutíferas e ornamentais, principalmente, em regiões com predominância de elevadas temperaturas, que favorecem o parasitismo, permitindo maior número de ciclos reprodutivos do patógeno (CAMPOS; CAMPOS; POZZA, 2006).

Pratylenchus brachyurus, comumente referido como nematoide das lesões radiculares, é considerado como uma das espécies mais prejudiciais do gênero devido à ampla distribuição geográfica e gama de hospedeiros, incluindo várias culturas anuais e perenes de interesse

agronômico, podendo ocasionar consideráveis perdas econômicas (DIAS et al., 2010). Os nematoides das lesões causam perdas econômicas impactantes em diversas culturas como soja, feijão, milho, algodão e pastagens em várias regiões do Brasil. Na região Centro-Oeste, há relatos frequentes de reduções na produção de 30% podendo alcançar até 50% (GOULART, 2008; DIAS et al., 2010).

Outro nematoide relevante para a agricultura nacional é o nematoide de cisto da soja (*Heterodera glycines*), detectado pela primeira vez no Brasil na safra de 1991/1992, e é considerado um dos patógenos mais sérios da sojicultura (DIAS et al., 2009). Ocasiona perdas em torno de 400 kg / ha em cultivares suscetíveis, mesmo em lavouras sem danos aparentes (GARCIA et al., 2005). Está presente em cerca de 90% das regiões brasileiras, distribuídas nos Estados de Mato Grosso, Goiás, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul (ASMUS et al., 2012).

Em razão das inúmeras características inerentes aos fitonematoides, o seu controle é complexo e, após a infestação da área, a erradicação é praticamente impossível (FERRAZ et al., 2010). Em áreas infestadas devem ser priorizada a adoção do manejo integrado que proporcione redução das populações abaixo do nível de dano econômico. Neste contexto, a sucessão de culturas com plantas antagonistas ou não hospedeiras (FERRAZ et al., 2010) é vista como uma das alternativas promissoras para o manejo de nematoides (CUNHA et al., 2003; FILETI et al., 2011).

Plantas antagonistas são aquelas que afetam negativamente a população de fitonematoides, atuando como planta-armadilha, má-hospedeira, ou plantas que contêm compostos nematicidas ou nematostáticos em seus tecidos (NEVES et al., 2005). Uma lista de plantas, estudadas como antagônicas às diferentes espécies de fitonematoides é encontrada nos trabalhos de Ferraz e Vale (2001) e Ferraz e Freitas (2004). Estes últimos autores citam uma relação de substâncias com atividade nematicida encontradas em plantas antagonistas. Entre as

espécies mais estudadas quanto às propriedades antagônicas aos fitonematoides estão as compostas (Asteraceae), as leguminosas (Fabaceae) e as gramíneas (Poaceae).

Algumas dessas espécies, como *Mucuna pruriensis* (mucuna), *Tagetes* spp. (cravo-de-defunto), *Crotalaria* spp. (crotalária), *Azadirachta indica* (nim) e *Ricinus communis* (mamona), têm sido utilizadas como matérias-primas para o preparo de extratos aquosos ou óleos essenciais com propriedades nematicidas (CETINTAS; YARBA, 2010; FERRAZ et al., 2010).

As espécies do gênero *Tagetes* são tidas como antagônicas aos fitonematoides e estão entre as plantas com maior eficiência de controle, especialmente, no controle de *Pratylenchus* spp. e *Meloidogyne* spp. (JOURAND et al., 2004; SANTANA et al., 2010). O efeito inibitório de *Tagetes* sobre fitonematoides é atribuído aos compostos nematicidas ‘ α -terthienyl’ e seus derivados presentes nas raízes dessas plantas (FERRAZ; VALE, 2001, FERREIRA; SILVA; NASCIMENTO, 2013).

Siddiqui e Alam (1987), avaliando o efeito nematicida de *Tagetes minuta* sobre diferentes fitonematoides, verificaram que a planta inibiu a formação de galhas de *M. incognita* em tomate e berinjela quando cultivados no mesmo vaso. Também observaram efeito desta espécie na reprodução de *Rotylenchulus reniformis* e *Tylenchorhynchus brassicae* em tomate, berinjela, repolho e couve-flor. Os exsudatos radiculares de *T. minuta* mostraram forte ação nematicida. Além disso, o crescimento de todas as plantas avaliadas melhorou quando *T. minuta* estava presente.

Scramin et al. (1987) avaliaram *in vitro* o efeito de extratos de 14 espécies vegetais sobre juvenis de *M. incognita* e verificaram que o extrato hexânico de folhas de *T. minuta*, seguido pelo extrato clorofórmico de caule de *T. patula*, apresentaram efeitos nematicida ou nematostático.

Assim, este trabalho teve como objetivos estudar a resposta de *T. minuta* frente ao parasitismo de *M. incognita*, *P. brachyurus* e *H. glycines*; avaliar a eficiência *in vitro* e *in vivo* do extrato aquoso de tecidos do caule e de folhas no controle de *M. incognita* e *H. glycines*; e avaliar o potencial de controle de extratos aquosos de *T. minuta* sobre *M. incognita* e *H. glycines*, aplicados no sulco de plantio e em pulverização foliar em plantas da soja, em condições de casa de vegetação.

2. REVISÃO BIBLIOGRAFICA

2.1 NEMATOIDES

Os nematoides pertencem ao filo Nematoda e são vermes microscópicos, transparente que habitam solos, rios, lagos e mares, podendo ser encontrados desde regiões frias até regiões de deserto (FREITAS et al., 2009).

Esses microrganismos podem se disseminar através de sementes e/ou materiais propagativos infestados, solos aderidos a implementos agrícolas, trânsito de máquinas na mesma propriedade ou entre propriedades vizinhas, água de irrigação, entre outros (ZAMBOLIM et al., 2007).

Possuem um ciclo biológico básico que apresenta as fases de ovo, quatro estádios juvenis (J1 a J4) e a fase adulta (macho ou fêmea). O juvenil, durante o período de crescimento, passa por quatro ecdises (trocas periódicas de cutículas). Os dois primeiros estádios são observados ainda no interior do ovo. Juvenis de segundo estádio (J2) eclodem dos ovos, movimentam-se a pequenas distâncias através da lâmina de água até penetrarem nas raízes das plantas hospedeiras (FERRAZ et al., 2010).

Dentre os sintomas primários no sistema de raízes, podem observar-se formação excessiva de raízes laterais, ou sistema com poucas raízes, formação de galhas em raízes e tubérculos, raízes deformadas, deslocamento e quebra do córtex radicular, rachaduras em órgãos subterrâneos e paralização do crescimento da raiz (FERRAZ et al., 2010).

As infestações desses patógenos também podem induzir o aparecimento de sintomas na parte aérea das plantas, caracterizando-se como sintomas reflexos. Dentre esses, podemos citar a desuniformidade de altura, murchas nos períodos mais quentes do dia, clorose, queda prematura de folhas, declínio vegetativo lento, formação de reboleiras, deficiência nutricional e a diminuição da produtividade (AGRIOS, 2005).

Além dos danos causados diretamente pelo parasitismo nas raízes, os nematoides abrem portas de entrada que facilitam a penetração de fungos e bactérias que danificam, ainda mais, o desenvolvimento da planta. Desta forma, os efeitos do parasitismo de fitonematoides envolvem queda na produção e na qualidade de culturas economicamente importantes (CASTAGNONE-SERENO, 2002).

2.1.1 NEMATOIDE DO GÊNERO *MELOIDOGYNE* SPP.

No primeiro relato do gênero, é descrita a presença de pequenas e numerosas estruturas denominadas galhas nas raízes de cafeeiro, formadas por estruturas císticas que continham ovos elípticos e pequenos animais vermiformes. Esses vermes foram denominados por Goeldi (1887) de *Meloidogyne exigua*, que também descreveu a importância da espécie para a cultura (MOURA, 1998). Em 1949, Chitwood revisou o gênero *Meloidogyne*, aceitando *M. exigua* como espécie-tipo e descrevendo cinco novas espécies. O autor inferiu, então, que as espécies formadoras de galhas pertenceriam ao gênero *Meloidogyne* (LORDELLO, 1988).

A partir disso, inúmeros estudos foram realizados e novas espécies descritas, e o gênero *Meloidogyne* tornou-se o de maior importância econômica e de maior interesse no mundo (FERRAZ, 2001). Mais de 100 espécies deste gênero já foram descritas (HUNT; HADDOO, 2009), sendo *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* e *M. hapla* as que ocasionam as maiores perdas para agricultura mundial (CARNEIRO; ALMEIDA, 2001).

São nematoides endoparasitas sedentários, com ciclo biológico típico que completa-se em três a quatro semanas, sob condições favoráveis. Temperaturas superiores a 40 °C ou inferiores a 5 °C paralisam por completo suas atividades vitais (CAMPOS; CAMPOS; POZZA, 2006). As fêmeas adultas possuem aspecto globoso e formato piriforme. Pode ovipositar cerca de 500 a 2000 ovos aglomerados em massa gelatinosa, na superfície da raiz (RUPPERT et al., 2005). O macho adulto deste gênero é de aspecto filiforme, não se alimenta da planta e vive

apenas poucos dias.

A alimentação ocorre através de uma simples célula ou de um grupo de células por períodos prolongados de tempo. Para sustentar o sítio de alimentação, as células das raízes hospedeiras se modificam, tornando-se células nutridoras, com complexas modificações na morfologia, função e expressão gênica da célula hospedeira (FARIA et al., 2003).

Os nematoides formadores de galhas são considerados um dos principais problemas para diversas culturas de importância agrícola no mundo e no Brasil, com maior ocorrência em países de climas tropicais e subtropicais, devido a temperatura e umidade serem mais favoráveis ao desenvolvimento (CARNEIRO et al., 2006). Plantas infectadas por esses nematoides tornam-se mais vulneráveis, ficam menos resistentes à seca e a outros patógenos, além disso respondem com menor eficiência à adubação (ROESE et al., 2001).

Os sintomas diretos podem ser observados em raízes de plantas infectadas, com a formação de galhas com tamanho e formato variados de acordo com o nível de infestação, espécie do nematoide e grau de suscetibilidade da planta. Os sintomas reflexos visualizados na parte aérea das plantas consistem em tamanho desigual de plantas, distribuídas em reboleiras no campo, deficiência nutricional, murcha, queda primária das folhas e diminuição da produtividade (BRASS et al., 2008). As galhas nas raízes bloqueiam a absorção de nutrientes do solo, tornando as plantas menores e amarelas, sintomas que se confundem com os de severa deficiência nutricional da planta (PEÑA, 2000).

O controle de *Meloidogyne* spp. se torna difícil devido à ampla gama de hospedeiros, o que facilita a perpetuação ao longo dos ciclos de cultivo (FREIRE et al., 2002). Dentre as principais medidas de controle adotadas, destaca-se a rotação de culturas, por influir na recuperação, manutenção e melhoria dos recursos naturais, viabilizando a produtividade com mínima alteração ambiental, melhorando as características físico-químicas e biológicas do solo (EMBRAPA, 2011).

2.1.2 NEMATOIDE DO GÊNERO *PRATYLENCHUS* SP.

Os nematoides do gênero *Pratylenchus* são conhecidos como os nematoides das lesões radiculares, devido à penetração e movimentação dos nematoides no interior das raízes causando a destruição dos tecidos corticais. A espécie *P. brachyurus* é uma das mais destacadas mundialmente. Segundo Ferraz (2006), sua relevância está associada a algumas características do nematoide, entre as quais destacam-se a ampla distribuição geográfica, alto grau de polifagia, e ação patogênica pronunciada em várias culturas de interesse agrônomo. No Brasil, é considerado o segundo em importância para a agricultura, perdendo apenas para o gênero *Meloidogyne* (LORDELLO, 1988; FERRAZ et. al., 2010).

A gama de hospedeiros de *P. brachyurus* inclui culturas perenes, semi-perenes e anuais, assim como plantas daninhas. Dentre os principais hospedeiros citam-se: *Glycine max* (soja), *Gossypium* spp. (algodão), *Zea mays* (milho), *Phaseolus vulgaris* (feijão), *Sorghum bicolor* (sorgo), *Arachis hypogaea* (amendoim), *Solanum tuberosum* (batata), *Nicotiana tabacum* (fumo), *Eucalyptus* spp. (eucalipto), *Hevea brasiliensis* (seringueira), *Cajanus cajan* (guandu), *Oryza sativa* (arroz), *Ananas comosus* (abacaxi), *Saccharum* spp. (cana-de-açúcar) e *Coffea arabica* (café), algumas hortaliças e diversas gramíneas forrageiras (GOULART, 2008).

Em campo experimentais, nos Estados Unidos, foram verificadas reduções de até 30% na produção de soja (GOULART, 2008). No Brasil, a ocorrência de *P. brachyurus* em lavouras de soja é comum e na região Centro-Oeste, há relatos frequentes de reduções na produção de 30% podendo alcançar até 50% (DIAS et al., 2010). A textura do solo é um dos principais fatores que influenciam a distribuição de espécies de *Pratylenchus*. Os solos arenosos ou de textura média favorecem a maioria das espécies (AGRIOS, 2005).

Implementos agrícolas contaminados, trânsito de trabalhadores e animais, escoamento de água em áreas de declive e águas de irrigação são as principais formas de disseminação desse fitonematoide. Observa-se que na ausência do hospedeiro esses nematoides podem sobreviver

em solo úmido por mais de oito meses. A umidade do solo é necessária para muitos processos vitais de *Pratylenchus*, considerando-se ótima na faixa de 70 a 80% da capacidade de campo, condição que é considerada ótima para nematoides em geral (GOULART, 2008). No entanto, em trabalho realizado por Castillo e Volvas (2007), em casa de vegetação, constataram a sobrevivência de *P. brachyurus* por um período de 21 meses, em solo sem irrigação e sem qualquer planta hospedeira.

Os machos de *P. brachyurus* são extremamente raros, visto que as fêmeas se reproduzem por partenogênese. Uma geração completa seu ciclo, em média, de quatro a oito semanas, dependendo das condições climáticas, a 30 °C o ciclo completa com 28 dias (CASTILLO; VOVLAS, 2007). Uma fêmea oviposita 70 a 80 ovos no interior dos tecidos vegetais e todo o ciclo biológico ocorre no interior das células, migrando para o solo quando as condições das raízes tornam-se desfavoráveis (FERRAZ, 2010).

Os sintomas causados pelos nematoides das lesões estão associados a podridões e necroses do sistema de raízes, sua penetração nas raízes abrem portas para a entrada de outros microrganismos patogênicos, como bactérias e fungos. As folhas das plantas afetadas podem apresentar clorose ou murchamento durante a estação seca, refletindo em perda da produção (ALVES et al., 2011).

2.1.3 NEMATOIDE *HETERODERA GLYCINES*

Heterodera glycines, conhecido como nematoide do cisto da soja (NCS), penetra frequentemente abaixo da zona de maturação da raiz, onde o tecido é jovem porém diferenciado (YOUNG, 1992).

Dentre os processos do ciclo de vida de NCS, muitos são influenciados pela temperatura e pelo movimento do nematoide no solo em direção às raízes. O período de duração do ciclo varia de 21 a 24 dias sob temperatura ideal de 23 ± 2 °C (TIHOHOD, 2000). Com

temperaturas de solo entre 22 e 30 °C, o nematoide completa uma geração em 21 dias, sendo que o maior índice de penetração ocorre a 28 °C, porém, abaixo de 22 °C a geração completa-se em 28 dias (CAMPOS; CAMPOS; POZZA, 2006). Em temperatura de 40 °C, juvenis emergidos morrem rapidamente (HAMBLEN; SLACK; RIGGS, 1972). Uma vez dentro da raiz, o crescimento e desenvolvimento depende da habilidade para iniciar e manter o sítio de alimentação viável para a nutrição (YOUNG, 1992).

Nematoídes deste gênero excretam enzimas pré-digestivas que estimulam a dissolução da parede de células adjacentes, tornando-as multinucleadas e ricas em nutrientes, originando um sítio de alimentação denominado sincício (TIHOHOD; SANTOS, 1993), fundamental para o desenvolvimento do nematoide.

As fêmeas adultas têm formato citriforme e mudam de cor, passando do branco para amarelo, até marrom, quando se transformam em cisto, que podem conter de 200 a 600 ovos, sendo que a maioria permanece dentro do corpo da fêmea (SCHMITT; RIGGS, 1991).

A disseminação desse fitonematoide ocorre de várias maneiras, através dos cistos que podem ser levados de uma área para outra, por qualquer meio que envolva movimentação do solo, tais como vento, água de superfície, máquinas e implementos agrícolas, veículos, homem, animais domésticos e selvagens, pássaros, sementes mal beneficiadas que contenham partículas de solo e materiais inertes contaminados (EMBRAPA, 2000).

Os cistos são resistentes às condições ambientais desfavoráveis como variação de temperatura, umidade, aeração do solo e ausência de plantas hospedeiras, podendo permanecer viáveis no solo por mais de oito anos (MOORE et al., 1990).

2.2 MEDIDAS GERAIS DE CONTROLE DE NEMATOIDES

A identificação das espécies de fitonematoides em culturas de importância econômica é de suma importância para o planejamento de medidas de controle, tendo em vista particularidades de cada região, dos sistemas de cultivo e das culturas (ROESE et al., 2001).

Em áreas infestadas, o manejo geral, baseia-se em evitar novas infestações, utilizando o sistema de rotação de culturas com materiais resistentes e/ou tolerantes e uso de nematicidas. De acordo com Almeida e Cardoso (1997), a rotação de cultura deve ser bem planejada, pois as espécies dos gêneros *Meloidogyne* e *Pratylenchus* são polípagas podendo parasitar diferentes espécies vegetais, assim como as plantas daninhas que possibilitam a reprodução e sobrevivência dos nematoides em áreas infestadas.

A utilização de variedades resistentes é um método de controle eficiente e de baixo custo, no entanto a disponibilidade de cultivares é variável de acordo com a espécie de cultivo e as espécies de nematoides presentes na área. O melhoramento genético visando resistência a *P. brachyurus* é considerado difícil, devido à espécie ser polífaga, pouco especializada e de hábito endoparasita migrador (GOULART, 2008).

O controle pode ser realizado por diferentes manejos, destacando-se os métodos químico e biológico, que atuam como nematicidas ou alteram a reprodução e orientação do fitoparasita em direção às raízes da planta hospedeira no solo (ARAUJO et al., 2002).

Alguns métodos como a incorporação de matéria orgânica ao solo, também, mostra-se eficiente em reduzir populações de nematoides pela liberação de substâncias tóxicas através da decomposição da matéria orgânica presente no solo, melhorando a estrutura, reciclando nutrientes e fornecendo substrato para agentes de controle biológico (AKHTAR; MALIK, 2000).

Com baixo custo e grande potencial, principalmente, para pequenos produtores, estudos têm mostrado o valioso potencial nematicida de algumas plantas, consideradas

antagônicas, e seus derivados quando incorporados ao solo (AKHTAR; MALIK, 2000; GAOFU et al., 2008; LOPES et al., 2011). A atividade antagônica de diversas plantas foi comprovada sobre várias espécies de nematoides (CHITWOOD, et al. 2002).

A rotação de culturas com plantas antagonistas além de proteger o solo da ação de agentes climáticos, melhorando a umidade e estrutura do solo, recicla nutrientes ajudando na viabilização do plantio direto e proporciona um controle dos fitonematoides, pois algumas plantas possuem em sua constituição compostos anti-helmínticos (PANDEY et al., 2003). Estas plantas podem produzir metabólitos com propriedades nematicidas, após a penetração de fitonematoides, ou podem possuir tais compostos constitutivamente (PÉREZ et al., 2003).

2.2.1 CONTROLE DE NEMATOIDES COM PLANTAS ANTAGONISTAS

Uma opção de controle alternativo eficiente é o uso de plantas antagonistas em esquema de rotação de culturas, plantio consorciado ou como cobertura vegetal. Algumas dessas plantas são capazes de fixar nitrogênio da atmosfera e fornecer expressivos volumes de matéria orgânica que aumentam a atividade de fungos, melhoram as características gerais do solo, além de liberarem ácidos graxos voláteis, produtos tóxicos aos nematoides (FERRAZ; VALLE, 2001; MOREIRA et al., 2015).

Algumas espécies vegetais têm efeito sobre nematoides por liberarem substâncias nematicidas ao solo durante a decomposição, tais como isotiocinatos e seus derivados (ZASADA; FERRIS, 2003). Outras espécies podem exercer efeito devido à presença de compostos nematicidas e/ou nematostáticos em seus tecidos.

Adubos verdes têm sido testados no controle de nematoides sedentários, como *Meloidogyne* spp., e também de espécies migradoras como *P. brachyurus* (INOMOTO et al., 2006). Além de servirem como fonte de matéria orgânica, alguns adubos verdes também apresentam efeito antagônico a nematoides, como *Crotalaria* spp., *Mucuna* spp. e *Avena* spp.

(FREITAS, 2006).

A rotação e/ou sucessão com espécies vegetais não hospedeiras pode constituir uma importante estratégia de manejo de áreas infestadas com este fitoparasita (ASMUS; ISHIMI, 2009; ASMUS et al., 2012).

O gênero *Crotalaria* spp., apesar de possibilitar a penetração de juvenis ou adultos de *Meloidogyne* sp., *H. glycines* e *R. reniformis*, prejudica o desenvolvimento do nematoide no interior das raízes, não permitindo que completem seu ciclo biológico e formem descendentes. Braz e colaboradores (2016) avaliaram a reação de espécies de plantas como hospedeiras de populações de *P. brachyurus*, e concluíram que excluindo-se a *C. juncea*, todas as demais espécies de crotalária apresentaram-se como boas opções para o manejo em áreas infestadas com *P. brachyurus*.

Weaver et al. (1998) consideram as plantas de *Mucuna pruriens* (mucuna) e *Paspalum notatum* (grama batatais) eficientes em reduzir populações de *Meloidogyne* spp. e *Heterodera glycines*. Plantas de *M. pruriens* promoveram efeito mais duradouro sobre a população de *Meloidogyne* sp. e *H. glycines* a campo após dois anos de rotação com soja. Outros resultados obtidos em casa de vegetação com *Stizolobium atterimum* (mucuna preta) mostram que esta espécie é eficiente em reduzir a população de *H. glycines* no solo, pois permite a penetração, mas impede o desenvolvimento (VALLE, et al., 1997).

Plantas que pertencem à família Brassicaceae, tais como: crambe (*Crambe abyssinica*), mostarda (*Brassica rapa*), brócolis (*Brassica oleracea*), agrião (*Nasturtium officinale*), couve (*Brassica oleracea*), canola (*Brassica napus*) e rabanete (*Raphanus sativus*) contém glicosinolatos, que atuam no sistema de defesa da planta (CLARKE, 2010; MOHN et al., 2007; FINIGUERRA et al., 2001), os isotiocianatos que são derivados dos glicosinolatos de brássicas apresentam efeito nematicida e além de baixa toxicidade à organismos não alvos, não apresenta perigos de aplicação (WU et al., 2011).

As plantas do gênero *Tagetes* são eficientes no controle de *Pratylenchus* spp. e *Meloidogyne* spp., embora também sejam eficientes no controle de outros nematoides (FERRAZ; VALLE, 2001). *Tagetes* spp. liberam exsudatos radiculares tóxicos, que apresentam em sua composição o constituinte α -tertienil com ação nematicida contra *Meloidogyne* e *Pratylenchus* (FURLANETTO et al., 2008).

O efeito supressivo de várias espécies do gênero *Tagetes* em nematoides dos gêneros *Meloidogyne* e *Pratylenchus* tem sido determinado por vários autores, seja através do cultivo das plantas em campos infestados (REYNOLDS et al., 2000; PLOEG, 2000; PUDASAINI et al., 2006) como pelo uso de extratos da planta (NATARAJAN et al., 2006). No entanto, a espécie *T. minuta* tem sido pouco estudada.

2.3 TAGETES SPP.

O gênero *Tagetes*, família Asteraceae, conhecido popularmente como cravo-de-defunto, contém mais de 50 espécies atualmente cultivadas. *Tagetes erecta*, *T. patula*, *T. lunata* e *T. tenuifolia* são as quatro espécies de ciclo anual mais cultivadas como ornamentais em todo o mundo (FERRAZ; FREITAS, 2004).

Plantas deste gênero são conhecidas popularmente como cravo-de-defunto, e possuem potencial de controle de diversos fitonematoides, principalmente das espécies de *Meloidogyne* e de *Pratylenchus* (HOOKS et al., 2010). É uma planta antagonista utilizada no manejo de solos infestados, pois o nematoide penetra mas não consegue completar seu ciclo de parasitismo, o que reduz drasticamente a população do fitopatógeno.

Tagetes patula, *T. erecta* e *T. minuta* são as três espécies mais utilizadas nas pesquisas de controle de nematoides, sendo que *T. patula* geralmente se mostra mais eficiente (FERRAZ; VALLE, 2001).

Determinadas culturas normalmente utilizadas em sistema de rotação, também, funcionam como matéria prima para a produção de extratos aquosos com efeito nematocida (FRANZENER et al., 2007; GARDIANO et al., 2009; FERREIRA; SILVA; NASCIMENTO, 2013).

Alguns extratos apresentam efeito ovicida *in vitro* como extratos de *Tagetes filifolia* contra *M. incognita* cuja ação é devida a presença de α -terthienil isolado de espécies do gênero *Tagetes* (LOAÍZA et al., 1996).

A ação supressiva de *Tagetes* spp. sobre fitonematoides é atribuída ao composto ' α -terthienil-5-(3-buten-1-inil)-2,2'-bithienyl e derivados (MOREIRA; FERREIRA, 2015), presentes nas raízes das plantas, porém, dependem de fotoativação, ou da ação de peroxidases ou de outros ativadores para que haja a liberação da substância nematocida (CHITWOOD, 2002).

Moreira e Ferreira (2015) verificaram que a incorporação das plantas de cravo-de-defunto teve seus picos de inibição da reprodução de *M. enterolobii* em plantas de tomate nos intervalos de 24 e 30 dias. Observaram uma redução média dos J2 de 88% comparado com a testemunha.

O extrato aquoso de parte aérea (seca) de *T. erecta* na concentração 0,1 g mL⁻¹ reduziu o número de galhas causadas por *M. incognita* em plantas de tomateiro, apresentando resultado semelhante ao controle químico carbofuran (NATARAJAN et al., 2006).

Franzener et al. (2007) verificaram que a aplicação ao solo do extrato aquoso de flores de *T. patula*, na concentração de 0,05 g mL⁻¹, reduziu o número de galhas, número de juvenis no solo e número de ovos de *M. incognita* em raízes de tomateiro, em 62,2%, 61,5% e 52,8%, respectivamente.

Olabiyi (2008) verificou que plantas de tomateiro tratadas com os extratos aquosos de *T. erecta*, *Hyptis suaveolens* (erva-canudo) e *Ocimum gratissimum* (alfavacão), nas

concentrações de 250, 500, 750 ou 1000 ppm, para o controle de *M. incognita*, apresentaram maiores alturas de planta, número de folhas por planta, número de frutos por planta, massa de frutos e de massa de parte aérea em comparação com o controle.

2.3.1 *TAGETES MINUTA*

Tagetes minuta Linnaeus (Asteraceae) é uma espécie tolerante à seca e, devido sua natureza competitiva, sobrevive facilmente em solos pobres como erva daninha (HULINA, 2008). Porém, ultimamente, vem sendo explorada como espécie cultivada por apresentar propriedades agroquímicas e farmacêuticas (SHAHZADI et al., 2010).

A espécie é nativa da América Central e ocorre espontaneamente na Bolívia, Paraguai, Argentina, México e no Brasil, onde é encontrada nos estados do Piauí, Pernambuco, Bahia, Mato Grosso do Sul, Goiás, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e no Distrito Federal (HATTORI, 2009; ROCA et al., 2009; SCHIAVON et al., 2015).

Como características, possui glândulas multinucleadas e puntiformes que estão presentes em folhas, brácteas e haste de *T. minuta*, onde se localiza o óleo, utilizado como matéria-prima na linha de produção de cosméticos e condimentos. A análise fitoquímica da parte aérea da planta mostraram a presença de terpenoides, saponinas, taninos, flavonoides e alcaloides. Os principais constituintes do óleo de *T. minuta* incluem limoneno, ocimeno, dihydrotagetone, tagetone, tagetenone (SHAHZADI et al., 2010).

A composição do óleo essencial pode ser diferente dependendo da parte da planta. Óleos essenciais de flores de *T. minuta* contêm β -ocimeno e tagetenone, e óleos de folhas de plantas não florescidas contêm principalmente dihydrotagetone (CHAMORRO et al., 2008).

Com relação ao efeito nematicida da espécie, estudos mostraram que *T. minuta* inibiu

a formação de galhas de *M. incognita* em tomate e berinjela, e reduziu a multiplicação de *R. reniformis* e *Tylenchorhynchus brassicae* em tomate, berinjela, repolho e couve flor (SIDDIQUI; ALAM, 1987).

Segundo Lovatto (2012), a disponibilidade de *T. minuta* no Brasil, especialmente na Região Sul do país, bem como a acessibilidade para agricultores familiares, fazem da espécie uma opção interessante para o manejo de pragas em sistemas de produção sustentáveis.

Vários são os estudos com o gênero *Tagetes* spp. para controle de nematoides (EL-HAMAWI et al., 2004), porém informações sobre a utilização de *T. minuta* para o controle de fitonematoides, ainda se fazem necessárias para comprovar e validar a eficiência e viabilidade de aplicação do extrato.

3. ARTIGO A: INTERAÇÃO DE *Tagetes minuta* COM *Meloidogyne incognita*, *Pratylenchus brachyurus* E *Heterodera glycines*

INTERACTION OF *Tagetes minuta* WITH *Meloidogyne incognita*, *Pratylenchus brachyurus* AND *Heterodera glycines*

Camila Torres Stroze^{1*}, Débora Cristina Santiago¹.

¹Universidade Estadual de Londrina, Campus Londrina, caixa postal 6001, 86051-990, Londrina, PR, Brasil. *Autor para correspondência: ctstroze@gmail.com

3.1 RESUMO

Objetivou-se estabelecer um método de propagação de *Tagetes minuta*, estudar o parasitismo de *Meloidogyne incognita*, *Pratylenchus brachyurus* e *Heterodera glycines* nesta planta em condições de casa de vegetação e a interação histológica planta-nematoide. Inicialmente, foi realizado um ensaio para definir a melhor forma de obtenção das mudas de *T. minuta*, em casa de vegetação, através de estacas lenhosas (5 - 6 cm); estacas herbáceas (2,5 - 3,5 cm); e sementes. Em seguida, realizou-se o estudo de parasitismo das espécies de nematoides nas plantas de *T. minuta*, os fatores foram compostos por plantas de *T. minuta* inoculadas com *M. incognita*, *P. brachyurus* e *H. glycines* e por plantas sem inoculação de nematoides. Aos cinco, 10 e 15 dias após a inoculação (DAI) foi avaliada a penetração de juvenis de segundo estágio (J2), e aos 30, 60 e 80 DAI avaliou-se a multiplicação dos nematoides. Paralelamente, avaliou-se a interação planta x patógeno pela observação do desenvolvimento dos nematoides no interior das raízes de *T. minuta*, por meio de cortes histopatológicos. Os resultados permitiram concluir que a melhor forma de obtenção de mudas de *T. minuta* foi a partir estacas lenhosas, com maior taxa de enraizamento. Apesar de haver penetração de J2 de *M. incognita* e *H. glycines* nas raízes de *T. minuta*, a espécie foi considerada má hospedeira dos nematoides. Já para o *P. brachyurus* esta planta se comportou como hospedeira. O parasitismo de *M. incognita*, *P. brachyurus* e *H. glycines* nas raízes não alterou a morfologia das células em *T. minuta*. Mas para *P. brachyurus* observou-se que as células do parênquima foram consumidas, resultando em lesões.

Palavras-chave: Parasitismo. Fitonematoides. Cravo-de-defunto. Compostos nematicidas. Plantas antagonistas.

3.2 ABSTRACT

The objective of this study was to establish a method of propagation of *Tagetes minuta*, to study the parasitism of *Meloidogyne incognita*, *Pratylenchus brachyurus* and *Heterodera glycines* in this plant under greenhouse conditions and the plant-nematode histological interaction. Initially, a test was conducted to determine the best way to obtain the *T. minuta* seedlings in a greenhouse through woody cuttings (5 - 6 cm); herbaceous cuttings (2.5 - 3.5 cm); and seeds. The nematode parasitism was studied in *T. minuta* plants, the factors were composed of *T. minuta* plants inoculated with *M. incognita*, *P. brachyurus* and *H. glycines* and by plants without inoculation of nematodes. The penetration of second stage juveniles (J2) was evaluated at 5, 10 and 15 days after inoculation (DAI), and nematodes multiplication was evaluated at 30, 60 and 80 DAI. In parallel, the interaction of plant x pathogen was evaluated by observing the development of nematodes within the roots of *T. minuta*, through histopathological cuts. The results allowed to conclude that the best way to obtain *T. minuta* seedlings was from woody cuttings, with a higher rooting rate. Although there is penetration J2 of *M. incognita* and *H. glycines* on roots *T. minuta*, it was considered bad species of nematode host. Already for the *P. brachyurus* this plant behaved as host. The parasitism of *M. incognita*, *P. brachyurus* and *H. glycines* in the roots did not alter the cell morphology in *T. minuta*. But for *P. brachyurus* it was observed that the cells of the parenchyma were consumed, resulting in lesions.

Key words: Antagonist plants. Parasitism. Marigold. Nematodes. Nematicidal compounds.

3.3 INTRODUÇÃO

O gênero *Tagetes*, pertencente à família Asteraceae, e tem como membro importante *T. minuta*, introduzido no Brasil há alguns anos, onde as plantas se aclimataram, tornando-se subespontâneas. A espécie é nativa de pastagens temperadas e presentes no sul da América do Sul, e em diversas regiões da Europa, África, Ásia entre outras (NAQINZHAD; MEHRVARZ, 2007).

A espécie *T. minuta* é conhecida popularmente como cravo-de-defunto, erva fedorenta ou chinchilho. É uma planta anual com 50-150 cm de altura, com flores tóxicas e de odor particular, sendo considerada uma planta daninha, com dormência no início do inverno (SADIA et al., 2013). Sua reprodução é realizada através de sementes e cada planta produz mais de 29 mil sementes, durante todo o ciclo (CHAMORRO et al., 2012).

Esta planta contém metabólitos secundários, como monoterpenos, sesquiterpenos, flavonoides e tiofenois, que são responsáveis pela bioatividade exercida sobre diferentes organismos (GARCÍA et al., 1995; GARCÍA; CARRIL; PÉREZ-URRIA, 2009), com resultados promissores contra insetos de interesse à saúde pública (IRERI et al., 2010) e de importância agrícola (RICHTER, 2011; LOVATTO, 2012).

A utilização de *T. minuta* foi avaliada no controle de pragas em grãos armazenados (RESTELLO; MENEGATT; MOSSI, 2009), no combate a micro-organismos patogênicos (SOUZA; AVANCINI; WIEST, 2000), além de apresentar efeito larvicida contra *Aedes aegypti* (FURTADO et al., 2005).

A eficiência de plantas de *Tagetes* spp. é relatada, especialmente, contra *Pratylenchus* spp. e *Meloidogyne* spp. (FERRAZ; FREITAS, 2004). Siddiqui e Alam (1987) observaram que *T. minuta* inibiu a formação de galhas de *M. incognita* em tomate e berinjela, e reduziu a reprodução de *Rotylenchulus reniformis* e *Tylenchorhynchus brassicae* em tomate, berinjela, repolho e couve-flor, quando cultivados no mesmo vaso.

Nesse contexto, objetivou-se estabelecer o melhor método de obtenção de mudas de *T. minuta*, avaliar o parasitismo de *M. incognita*, *P. brachyurus* e *H. glycines* nas plantas, em condições de casa de vegetação e estudar a interação planta-patógeno com uso de técnicas histopatológicas.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

As plantas de *T. minuta* utilizadas no estudo são nativas da região de Erechim - RS, e foram coletadas de vegetação espontânea, no mês de março de 2016, encontrando-se ainda na floração. Exsicata da planta, preparada segundo Ming (1995), foi encaminhada ao Herbário do Departamento de Botânica da Universidade Estadual de Londrina (UEL) para identificação taxonômica e arquivamento.

Inicialmente, foram avaliadas em casa de vegetação em delineamento inteiramente casualizado, com 64 repetições, três formas de obtenção de mudas de *T. minuta*, estacas lenhosas (5 - 6 cm); estacas herbáceas (2,5 - 3,5 cm); e sementes.

As estacas foram retiradas de plantas matrizes. Nos ramos fez-se cortes em bisel e as estacas foram mantidas com duas folhas. Após esse processo, as estacas assim como as sementes foram transferidas para bandejas de mudas contendo uma mistura autoclavada de substrato comercial, vermiculita e areia (2:1:1). Após 30 dias foram realizadas as avaliações quanto ao número de estacas enraizadas e número de sementes germinadas. Foram consideradas enraizadas, as que apresentaram comprimento de raiz maior ou igual 1,0 cm.

No estudo de parasitismo, foram utilizadas mudas obtidas a partir de estacas lenhosas. Para tanto, populações puras dos nematoides foram multiplicadas em plantas de soja (*Glycine max* M6410 IPRO) para *H. glycines*, tomate (*Solanum lycopersicum* cv. Santa Cruz 'Kada') para *M. incognita* e milho (*Zea mays* var. DKB 390) para *P. brachyurus*, e cultivadas em casa

de vegetação por 30, 60 e 80 dias , respectivamente, para posterior obtenção de inóculos.

O inóculo de *H. glycines* foi obtido pelo processamento das raízes em liquidificador, seguido pelo peneiramento sobre peneiras acopladas de 850, 250 e 25 mm, lavadas com jato de água. As fêmeas retidas na peneira de 250 mm foram esmagadas e os ovos liberados foram recolhidos em peneira de 25 mm, segundo adaptações na metodologia de Dias-Arieira et al. (2003). Os ovos e possíveis J2 foram recolhidos em béquer e a suspensão foi calibrada para 500 ovos/mL.

Para *M. incognita*, raízes de tomate foram processadas seguindo o método de extração de Boneti e Ferraz (1981), modificado. A suspensão aquosa foi calibrada para 500 ovos/mL. E das raízes de milho, foram extraídos os ovos e eventuais juvenis de *P. brachyurus* segundo método proposto por Coolen e D'Herde (1972), com suspensão calibrada para 500 ovos/mL.

O estudo foi conduzido em casa de vegetação, utilizando-se vasos plásticos com capacidade de 3L contendo como substrato solo e areia (1:3) autoclavados. As parcelas foram constituídas por uma estaca de *T. minuta* com três a quatro folhas, e receberam 1000, 2000 e 1000 ovos e/ou J2 de *H. glycines*, *M. incognita* e *P. brachyurus*, separadamente, em orifícios ao redor do colo de cada muda. Como testemunha de viabilidade dos inóculos foram utilizadas plantas das mesmas cultivares utilizadas para a multiplicação.

Os fatores analisados foram compostos por plantas de *T. minuta* inoculadas com *H. glycines*, *M. incognita* e *P. brachyurus* e por plantas sem inoculação de nematoides, avaliados aos cinco, 10 e 15 dias após a inoculação (DAI), quanto à penetração de J2 por meio da técnica de coloração com fucsina ácida (BYRD et al., 1983).

E aos 30, 60 e 80 DAI avaliou-se a reprodução dos nematoides, com cinco repetições para cada variável analisada. Os nematoides foram extraídos das raízes seguindo as metodologias já descritas e avaliados, com auxílio de câmara de contagem, o número de ovos e J2, sob microscópio de luz. Com os valores obtidos, calculou-se o fator de reprodução (FR =

população final / população inicial) de acordo com Oostenbrink (1966). Também foram avaliadas massa fresca de parte aérea e massa fresca de raiz.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA); as médias do ensaio de penetração foram transformadas " $\arcsen((x/100)^{1/2})$ " e as médias da reprodução dos nematoides em plantas de *T. minuta* foram transformadas " $(x+k)^{1/2}$ " com $k = 10$ e submetidas ao teste de Tukey a 5% de probabilidade, para tanto utilizou-se o programa estatístico SASM-agri (CANTERI et al., 2001).

Paralelamente, a interação planta-patógeno foi avaliada observando-se o desenvolvimento dos nematoides no interior das raízes de *T. minuta*, por meio de cortes histopatológicos, aos cinco, 10, 15, 30, 60 e 80 DAI. Para tanto, cinco plantas de cada tratamento foram coletadas, descartando-se a parte aérea, e as raízes lavadas em água corrente, para posterior infiltração em parafina histológica.

Segmentos de 0,5 - 1,0 cm das raízes foram amostrados nas regiões mediana e apical, e fixados em solução de FAA 70% (formol + ácido acético + álcool 70%) por 48 horas (JOHANSEN, 1940). Na sequência, foram desidratados em série alcoólica (etanol 70, 80, 90 e 100%) por duas horas cada, seguido de clarificação em xilol mais álcool, até xilol puro. Após foi realizada uma pré-infiltração com xilol mais parafina por quatro horas, seguida da infiltração em parafina líquida por no mínimo 24 horas; foram realizadas duas trocas de parafina, mantendo o material, a cada troca, por mais uma hora na estufa a 55 °C. Os segmentos foram dispostos em moldes plásticos com parafina líquida e, em seguida, foram fixados em blocos de madeira com a própria parafina, seccionados transversalmente em micrótomo rotatório Leica 2155, com 5 µm de espessura.

Foram realizados 1520 cortes histológicos, que foram depositados sobre água aquecida + gelatina (adesivo) e, posteriormente, colocados em lâminas de microscopia. Os cortes obtidos foram corados com Azul de Toluidina 1% em tampão acetato pH 4,7 por três minutos

(O'BRIEN; FEDER; MCCULLY, 1964), sendo montados entre lâminas e lamínulas com glicerina (0,5%).

As observações anatômicas das raízes foram feitas com auxílio de microscópio de luz e todos os segmentos foram fotografados sob microscópio acoplado com câmera digital, e os aspectos mais relevantes foram discutidos.

3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No estudo para definir a melhor forma de obtenção das mudas de *T. minuta*, àquelas obtidas por meio de sementes apresentaram porcentagem de germinação média de 42,7 % aos 30 dias após a sementeira (dados não apresentados em forma de Tabela). Considerada uma espécie daninha, a planta tem como característica a germinação escalonada, que garante maior sobrevivência no meio ambiente. Percentuais semelhantes foram observados por Oliveira et al. (2007), com a propagação de *T. erecta* realizada por meio de sementes, atingindo em média uma germinação de 50 %.

Quanto à avaliação das estacas de *T. minuta* produzidas a partir de segmentos lenhosos e herbáceos (Tabela 1), observou-se um enraizamento de 92 % nas estacas lenhosas, superior ao obtido nas herbáceas (45 %), indicando que as estacas lenhosas, por apresentarem maior reserva nutricional, têm maior chance de formar uma nova planta. A reserva nutricional da estaca pode interferir no enraizamento, pois quanto maior a disponibilidade de nutrientes, melhor o desempenho destas na propagação assexuada (NICOLOSO et al., 1999).

Tabela 1. Porcentagem de enraizamento, número de estacas enraizadas e comprimento radicial de estacas lenhosas e herbáceas de *Tagetes minuta*, aos 30 dias de cultivo em casa de vegetação. Londrina, PR. 2016.

TRATAMENTOS	Enraizamento (%)	Diâmetro de estacas enraizadas (mm)	Comprimento de raiz (cm)
Estacas lenhosas (5 - 6 cm)	92,0 ¹	4,50 ¹ a ²	5,30 ¹ a ²
Estacas herbáceas (2,5 - 3,5 cm)	45,0	1,10 b	1,89 b
C.V. (%)	-	5,04	3,75

¹Dados são médias de 64 repetições. ²Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey 1%.

Com relação ao estudo do parasitismo das espécies de *M. incognita*, *P. brachyurus* e *H. glycines*, a viabilidade dos inóculos foi confirmada pela reprodução observada nas plantas de tomate cv. Santa Cruz Kada, de milho var. DKB 390 e soja cv. Monsoy 6410, com valores para Fator de Reprodução (FR) de 53,7, 12,3 e 25,9 (respectivamente), com cinco repetições por nematoide.

Os resultados de penetração de J2 dos nematoides nas raízes de *T. minuta* estão apresentados na Tabela 2. Na comparação por período de avaliação, observou-se que aos cinco DAI não houve diferença quanto ao número de J2 penetrantes para nenhuma das espécies de nematoides. Já aos 10 e 15 DAI, a penetração de J2 de *H. glycines* foi estatisticamente superior em relação aos demais tratamentos. Já os números de J2 penetrantes de *M. incognita* e *P. brachyurus* não diferiram daquele observado nas raízes de *T. minuta* sem inoculação de nematoides.

Na comparação da penetração de J2 nas raízes de *T. minuta* entre os períodos de avaliação, a única diferença observada foi para *H. glycines*, em que o número de J2 penetrantes aos 10 DAI foi maior que aos 5 DAI, porém semelhante ao obtido aos 15 DAI (Tabela 2). Esses dados encontram-se, também, ilustrados na Figura 1.

Tabela 2. Penetração de juvenis de segundo estágio (J2) em plantas de *Tagetes minuta* aos cinco, 10 e 15 dias após a inoculação (DAI) de *Meloidogyne incognita*, *Pratylenchus brachyurus* e *Heterodera glycines*, cultivadas em casa de vegetação. Londrina, PR. 2016.

Tratamentos	Testemunha Absoluta	<i>Heterodera glycines</i>	<i>Meloidogyne incognita</i>	<i>Pratylenchus brachyurus</i>
5 DAI	0.00	3,5 b	0.0 a	1.1 b
10 DAI	0.00	15,4 a	0.4 a	4.8 a
15 DAI	0.00	9,8 a	0.3 a	2.6 a
C.V (%)	-	38.1	147,1	44,3

¹Dados são médias de cinco repetições, transformados " $\arcsen((x/100)^{1/2})$ ". ²Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade.

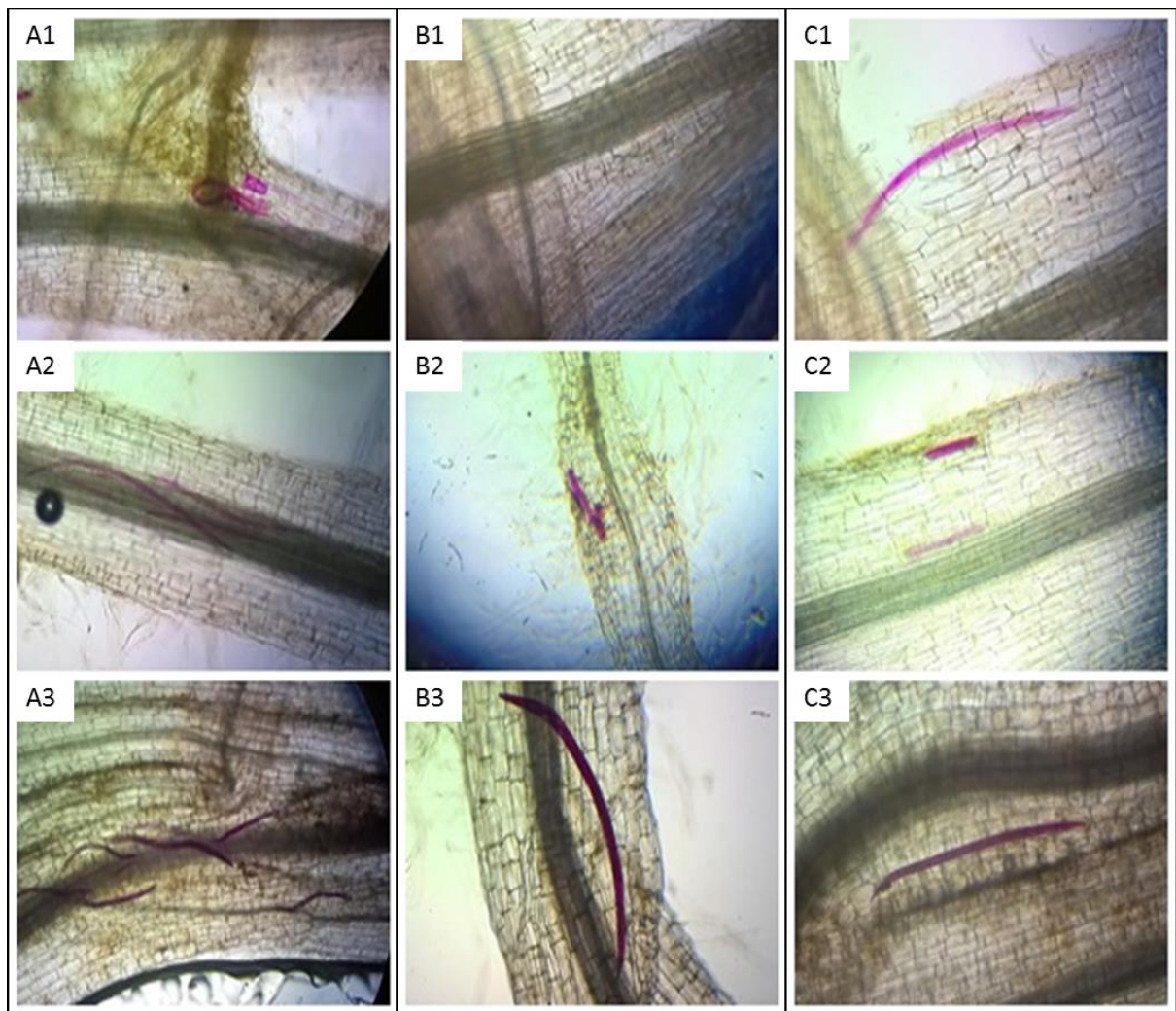


Figura 1. Penetração de juvenis de segundo estágio (J2) de *Heterodera glycines*, *Meloidogyne incognita* e *Pratylenchus brachyurus* em raízes de *Tagetes minuta*. A1, A2, A3: Penetração de J2 de *H. glycines* aos cinco, 10 e 15 dias após a inoculação (DAI), respectivamente. B1, B2, B3: Penetração de J2 de *M. incognita* aos cinco, 10 e 15 DAI, respectivamente. C1, C2, C3: Penetração de J2 de *P. brachyurus* aos cinco, 10 e 15 DAI, respectivamente.

Na comparação entre os diferentes períodos de avaliação, foi observada diferença estatística para massa fresca de parte aérea apenas para *T. minuta* sem inoculação, com média aos 60 DAI maior que a obtida aos 80 DAI, porém semelhante à avaliação aos 30 DAI. As plantas inoculadas com os diferentes nematoides não apresentaram diferenças entre as épocas de avaliações (Tabela 3).

Tabela 3. Massa fresca de parte aérea das plantas de *Tagetes minuta* aos 30, 60 e 80 dias após a inoculação (DAI) de *Meloidogyne incognita*, *Pratylenchus brachyurus* e *Heterodera glycines*, cultivadas em casa de vegetação. Londrina, PR. 2016.

TRATAMENTOS	Massa fresca de parte aérea (g)						C.V. (%)
	30 DAI		60 DAI		80 DAI		
<i>T. minuta</i> sem inoculação	3,29 ¹	a ² AB ²	4,03 ¹	a ² A ²	3,06 ¹	a ² B ²	14,55
<i>T. minuta</i> x <i>M. incognita</i>	2,16	ab A	2,60	b A	1,92	b A	34,32
<i>T. minuta</i> x <i>P. brachyurus</i>	1,21	b A	1,73	b A	1,47	b A	23,32
<i>T. minuta</i> x <i>H. glycines</i>	2,39	ab A	1,82	b A	1,58	b A	28,68
C.V. (%)	31,90		22,80		14,87		---

¹Dados são médias de cinco repetições. ²Médias seguidas de mesma letra minúscula, na coluna, e maiúscula, na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade.

Os resultados para massa fresca de raízes de *T. minuta* estão apresentados na Tabela 4. Na avaliação aos 30 DAI, não houve diferença entre as plantas inoculadas com os nematoides e as plantas sem inoculação. Mas, a partir de 60 DAI, observou-se que as plantas inoculadas com *P. brachyurus* apresentaram média inferior à testemunha, porém semelhante aos demais nematoides. Aos 80 DAI verificou-se que a inoculação de *M. incognita*, *P. brachyurus* e *H. glycines* nas plantas resultou em médias inferiores para massa de raízes em comparação às plantas sem inoculação, evidenciando a capacidade destes nematoides em reduzir a formação de raízes ao longo do ciclo de cultivo.

Quanto à comparação entre as épocas de avaliação foi observada diferença estatística somente para a espécie *H. glycines*, com uma redução gradual durante o período, observando-se que a média aos 80 DAI foi inferior aos 30 DAI. Isso indica que quanto maior for o tempo de contato deste nematoide com as raízes das plantas de *T. minuta*, maior pode ser o dano.

Tabela 4. Massa fresca de raízes das plantas de *Tagetes minuta* aos 30, 60 e 80 dias após a inoculação (DAI) de *Meloidogyne incognita*, *Pratylenchus brachyurus* e *Heterodera glycines*, cultivadas em casa de vegetação. Londrina, PR. 2016.

TRATAMENTOS	Massa fresca de raiz (g)			C.V. (%)
	30 DAI	60 DAI	80 DAI	
<i>T. minuta</i> sem inoculação	2,21 ¹ a ² A ²	2,08 ¹ a ² A ²	2,58 ¹ a ² A ²	19,28
<i>T. minuta</i> x <i>M. incognita</i>	1,89 a A	1,86 ab A	1,49 b A	28,61
<i>T. minuta</i> x <i>P. brachyurus</i>	1,18 a A	0,93 b A	1,01 b A	39,54
<i>T. minuta</i> x <i>H. glycines</i>	1,65 a A	1,11 ab AB	0,96 b B	31,23
C.V. (%)	31,56	29,96	17,89	---

¹Dados são médias de cinco repetições. ²Médias seguidas de mesma letra minúscula, na coluna, e maiúscula, na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade.

Analisando-se os resultados sobre a população de nematoides encontrados nas raízes nos diferentes períodos (Tabela 5), observou-se que o número de ovos e J2 de *P. brachyurus* por grama de raízes foi maior nas avaliações de 30 e 60 DAI, em relação aos demais tratamentos, porém aos 80 DAI a média foi semelhante à obtida para *H. glycines*, comprovando a capacidade de parasitismo dessas espécies nas raízes de *T. minuta*.

Para a comparação dos nematoides entre os períodos, houve diferença apenas para as plantas inoculadas com *H. glycines*, com aumento progressivo do número de ovos e J2 por grama de raízes no decorrer do ciclo, sendo a média obtida aos 80 DAI superior à observada aos 30 DAI (Tabela 5). Entretanto, vale ressaltar que não foi verificada a formação de fêmeas nas raízes e cistos no solo, o que indica uma falha no estabelecimento do sítio de alimentação.

Tabela 5. Número de ovos e juvenis por grama de raiz de *Meloidogyne incognita*, *Pratylenchus brachyurus* e *Heterodera glycines* nas raízes de *Tagetes minuta*, aos 30, 60 e 80 dias após a inoculação (DAI) dos nematoides, em casa de vegetação. Londrina, PR. 2016.

Tratamentos	Testemunha Absoluta	<i>Heterodera glycines</i>	<i>Meloidogyne incognita</i>	<i>Pratylenchus brachyurus</i>
30 DAI	0,00	106,7 b	20,2 a	504,7 a
60 DAI	0,00	231,5 a	9,4 a	1160,2 a
80 DAI	0,00	352,2 a	35,5 a	792,6 a
C.V (%)	-	24,0	92,6	32,01

¹Dados são médias de cinco repetições, transformados " $(x+k)^{1/2}$ " com $k = 10$. ²Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade.

Em relação ao fator de reprodução (FR), calculado com base nos número de ovos e J2 nas raízes de *T. minuta*, observou-se que todas as espécies apresentaram $FR < 1$, independente do período de avaliação, indicando a baixa capacidade reprodutiva de *M. incognita*, *P. brachyurus* e *H. glycines* em *T. minuta* (Tabela 6).

Tabela 6. Fator de reprodução (FR) de *Meloidogyne incognita*, *Pratylenchus brachyurus* e *Heterodera glycines* em raízes de *Tagetes minuta*, aos 30, 60 e 80 dias após a inoculação (DAI), em casa de vegetação. Londrina, PR. 2016.

TRATAMENTOS	FATOR DE REPRODUÇÃO		
	30 DAI	60 DAI	80 DAI
<i>T. minuta</i> x <i>M. incognita</i>	0,016 ¹	0,008 ¹	0,024 ¹
<i>T. minuta</i> x <i>P. brachyurus</i>	0,432	0,960	0,800
<i>T. minuta</i> x <i>H. glycines</i>	0,160	0,240	0,336

¹Dados são médias de cinco repetições sem comparação estatística.

Ferraz e Freitas (2004) relacionam vários trabalhos que demonstram a eficiência de de *Tagetes* spp. em reduzir populações de *Pratylenchus* e *Meloidogyne*. Siddiqui e Alam (1987), avaliando o efeito nematicida de *T. minuta* sobre diferentes nematoides, verificaram que seu cultivo inibiu a formação de galhas de *M. incognita* em tomate e berinjela quando plantados no mesmo vaso.

Os cortes histológicos mostrando o desenvolvimento dos nematoides no interior das raízes de *T. minuta* estão ilustrados na Figura 2. Analisando os cortes, observa-se que apesar de haver a penetração de J2 nas raízes, comprovada pelo número de J2 penetrantes, a planta não apresentou diferença morfológica em suas células quando parasitadas por *M. incognita*, *P. brachyurus* e *H. glycines*.

Nas raízes de *T. minuta* ficou evidenciado o espessamento da parede das células dos vasos condutores de seiva. A parede celular vegetal constitui a primeira barreira encontrada pelo fitonematoide, que tem de ser ultrapassada para o estabelecimento da relação parasitária. Além da força mecânica exercida pelo estilete durante seu contínuo movimento para o interior da célula, os fitonematoides secretam enzimas hidrolíticas que promovem a degradação desta parede (JAUBERT et al., 2002).

A espessura da parede celular das células do xilema e floema em *T. minuta* pode ter comprometido o estabelecimento do sítio de alimentação de *M. incognita* e *H. glycines*. Estas espécies possuem modo de parasitismo sedentário, e são altamente dependentes do estabelecimento de um sítio de alimentação para completarem seu ciclo de vida e se reproduzirem (FARIA et al., 2003).

Já espécies de nematoides ectoparasitas ou endoparasitas migradores, como *P. brachyurus*, não possuem capacidade de induzir o sítio de alimentação, isso porque o produto excretado pela glândula esofageana dorsal é inadequado à formação do sítio, ou porque as células da planta no local de infecção não apresentam receptores para esta sinalização, forçando esses fitonematoides se alimentarem apenas do conteúdo celular ali existente (FARIA et al., 2003), causando lesões necróticas. Entretanto, no presente estudo *P. brachyurus*, também, não teve sucesso quanto à reprodução nas raízes de *T. minuta*.

O sucesso do parasitismo depende do eficiente progresso de todas as fases envolvidas durante a interação nematoide-planta. Por exemplo, Zhao et al. (2000) citam o efeito supressivo de exsudados radiculares de *Tagetes* spp. sobre várias espécies de nematoides.

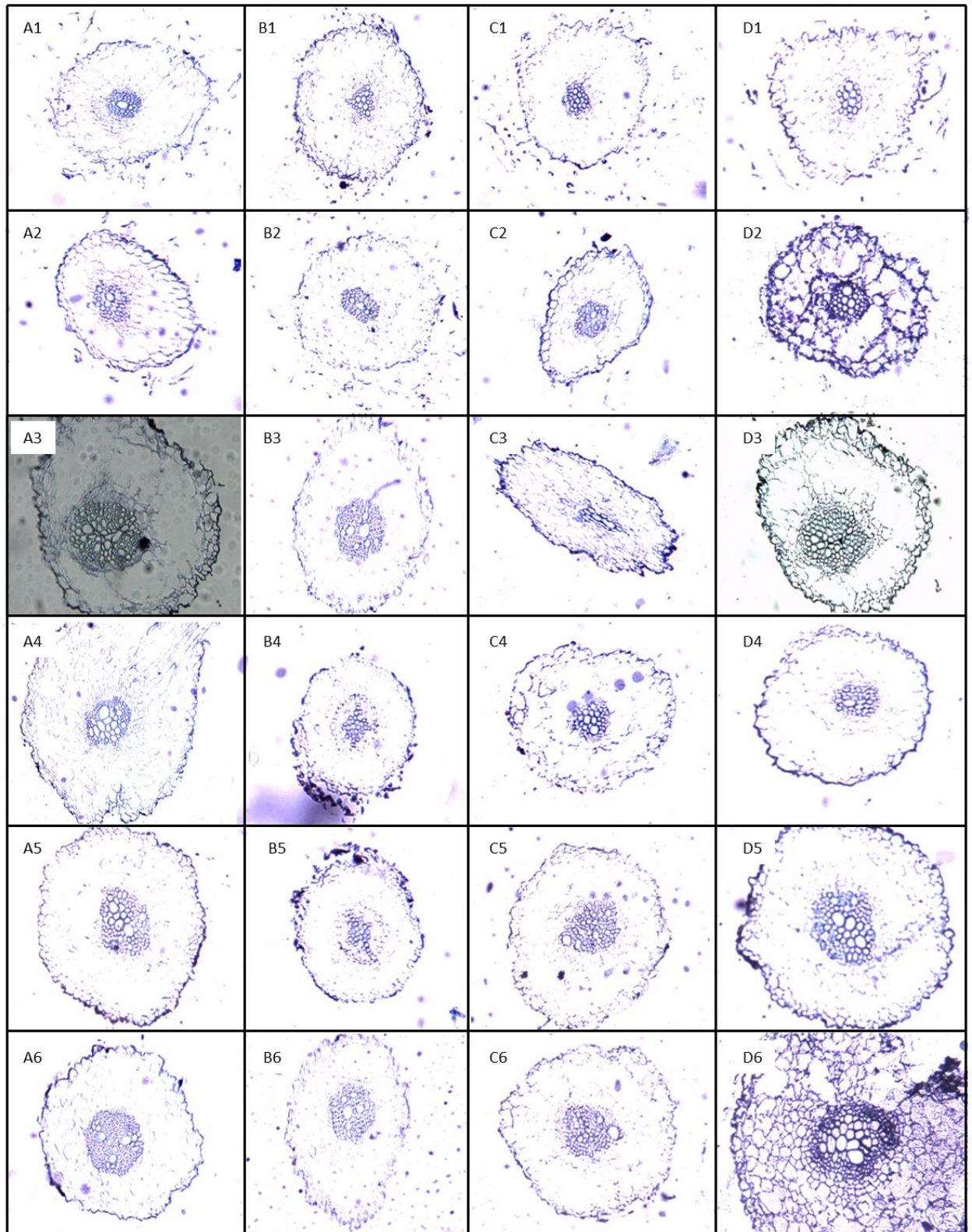


Figura 2. Cortes transversais histológicas de raízes de *Tagetes minuta* aos cinco, 10, 15, 30, 60 e 80 dias após a inoculação. A1 - A6) Raízes sem inoculação de nematoide, testemunha absoluta; B1 - B6) Raízes inoculadas com *Hetedora glycines*; C1 - C6) Raízes inoculadas com *Meloidogyne incognita*; D1 - D6) Raízes inoculadas com *Pratylenchus brachyurus*.

3.6 CONCLUSÃO

A melhor forma de obtenção de mudas de *Tagetes minuta* foi a partir estacas lenhosas, com maior taxa de enraizamento.

Apesar de haver penetração de J2 de *M. incognita* e *H. glycines* nas raízes de *T. minuta*, a espécie foi considerada má hospedeira dos nematoides. Já para o *P. brachyurus* esta planta se comportou como hospedeira.

O parasitismo de *M. incognita*, *P. brachyurus* e *H. glycines* nas raízes não alterou a morfologia das células em *T. minuta*. Mas para *P. brachyurus* observou-se que as células do parênquima foram consumidas, resultando em lesões.

4. ARTIGO B: EXTRATO AQUOSO DE *Tagetes minuta* NA ECLOSÃO, MOBILIDADE E REPRODUÇÃO DE NEMATÓIDES

EXTRACT AQUEOUS OF *Tagetes minuta* ON HATCHING, MOBILITY AND REPRODUCTION OF NEMATODES

Camila Torres Stroze^{1*}, Débora Cristina Santiago¹.

¹Universidade Estadual de Londrina, Campus Londrina, caixa postal 6001, 86051-990,

Londrina, PR, Brasil. *Autor para correspondência: ctstroze@gmail.com

4.1 RESUMO

As substâncias encontradas em plantas de *Tagetes* spp. apresentam potencial para o controle de nematoides, para tanto objetivou-se avaliar o efeito de extratos aquosos de *T. minuta* na eclosão e mobilidade de juvenis de segundo estágio (J2) *in vitro* e na reprodução de *Meloidogyne incognita* e *Heterodera glycines* *in vitro* e *in vivo*. Foram testadas cinco concentrações (0; 12,5; 25; 50; 75 e 100 mg mL⁻¹) de extratos aquosos obtidos a partir de caule e de folhas de *T. minuta*. Os nematoides foram extraídos e incubados, mantidos em contato com os extratos para os ensaios de eclosão, mobilidade e mortalidade de J2, com quatro repetições por tratamento. As avaliações de eclosão foram feitas aos 4, 8 e 12 dias após a incubação, e para mobilidade os juvenis foram avaliados depois de 24 e 48 h da retirada dos extratos. O efeito dos extratos foi confirmado através da inoculação de ovos e J2, tratados com os respectivos extratos, em plantas de tomate e soja, que foram mantidas em casa de vegetação e avaliadas aos 30 (*H. glycines*) e 60 (*M. incognita*) dias após a inoculação. Concluiu-se que, para *H. glycines*, a concentração 100 mg mL⁻¹ do extrato de folha apresentou os melhores resultados de redução da eclosão e mobilidade dos juvenis inibindo em 67 e 62 %, respectivamente. Já a concentração 12,5 mg mL⁻¹ do extrato de caule e de folha foi a mais eficaz para a inibição da eclosão dos juvenis de *M. incognita* em até 91 %, dificultando a reprodução dos nematoides em tomateiro em mais de 90 % com o extrato de folha.

Palavras-chave: *Meloidogyne incognita*. *Heterodera glycines*. Controle alternativo. Extratos vegetais.

4.2 ABSTRACT

The substances found in plants of *Tagetes* spp. present potential for the control of nematodes, the objective of this study was to evaluate the effect of aqueous extracts of *T. minuta* on hatching and mobility of second stage juveniles (J2) *in vitro* and on reproduction of *Meloidogyne incognita* and *Heterodera glycines* *in vitro* and *in vivo*. Five concentrations (0; 12.5; 25; 50; 75 and 100 mg mL⁻¹) of aqueous extracts obtained from stem and leaves of *T. minuta* were tested. The nematodes were extracted and incubated, kept in contact with the extracts for the hatching, mobility and mortality of J2, with four replicates per treatment. Hatching evaluations were performed at 4, 8 and 12 days after incubation, and for mobility the juveniles were evaluated after 24 and 48 h remove of extract. The effect of the extracts was confirmed by the inoculation of eggs and J2, treated with the respective extracts, in tomato and soybean plants, which were kept in greenhouse and evaluated at 30 (*H. glycines*) and 60 (*M. incognita*) days after inoculation. It was concluded that, for *H. glycines*, the concentration 100 mg mL⁻¹ of the leaf extract presented the best results of reduction of hatching and mobility of juveniles inhibiting in 67 and 62%, respectively. The 12.5 mg mL⁻¹ concentration of stem and leaf extract was the most effective for inhibiting the hatching of *M. incognita* juveniles by up to 91%, making nematode reproduction in tomatoes more than 90% the leaf extract.

Key words: Alternate control. *Heterodera glycines*. *Meloidogyne incognita*. Plant extracts.

INTRODUÇÃO

A maioria das culturas enfrentam limitações de produção por incidências de pragas e doenças (NICOL et al., 2011), entre essas incluem-se as causadas por nematoides. O uso de agrotóxicos é uma das principais medidas de controle, porém é uma prática que pode acarretar prejuízos ambientais e problemas à saúde humana (PIMENTEL; BURGUESS, 2014).

Pesquisas sobre medidas de controle que minimizem os riscos ambientais tornam-se necessárias, minimizando o uso de nematicidas convencionais pela aplicação de extratos naturais (FERRAZ, FREITAS, 2004; MOREIRA; SANTOS, INNECCO, 2015; STEFFEN et al., 2008; BORGES et al., 2013; CARBONI; MAZZONETTO, 2013).

Com a utilização do manejo integrado de nematoides outras medidas são incluídas, como rotação de cultura, uso de plantas antagonistas em plantio intercalado ou consorciado, incorporação de matéria orgânica, além dos controles biológico e químico (FERRAZ et al., 2010; SILVA et al., 2006; SILVA, 2012).

As substâncias naturais encontradas nos extratos vegetais e óleos essenciais, que possuem propriedades químicas com potencial nematicida têm sido estudadas por vários pesquisadores (FERRAZ; FREITAS, 2004; MOREIRA; SANTOS; INNECCO, 2015; STANGARLIN, KUHN, SCHWAN-ESTRADA, 2008; CARBONI; MAZZONETTO, 2013).

Dentre estas, destacam-se os polietienos encontrados em *Tagetes* spp., isotiocianatos e glicosinolatos, oriundos de *Brassica* e outros compostos de diferentes plantas como glicosídeos cianogênicos, alcaloides, terpenoides e compostos fenólicos (VIEIRA et al., 2001; COIMBRA et al., 2006; GARDIANO et al., 2011; MATEUS et al., 2014; NEVES et al., 2008).

Extratos obtidos de folhas e sementes de mamão (*Carica papaya*), de alho (*Allium sativum*), folhas de hortelã (*Mentha piperita*), de mentrasto (*Ageratum conyzoides*), de melão de São Caetano (*Mormodica charantia*), de alecrim (*Rosmarinus officinalis*), de orégano (*Origanum vulgare*), entre várias outras espécies vegetais, têm apresentado resultados

eficientes no controle de nematoides fitopatogênicos (COIMBRA et al., 2006; DIAS et al., 2000; GARDIANO et al., 2009).

Existem vários estudos com *Tagetes* spp. associado ao controle de nematoides (PLOEG, 2000; EL-HAMAWI et al., 2004; OSMAN et al., 2008). Buena et al. (2008) encontraram resistência de *T. patula* às espécies *Meloidogyne arenaria*, *M. hapla*, *M. javanica* e *M. incognita*. A análise fitoquímica da parte aérea de *T. minuta* mostrou a presença de terpenoides, saponinas, taninos, flavonoides e alcaloides (HADJIAKHOONDI et al., 2005). As raízes de *T. minuta*, também, apresentam ação fungicida (BATISH et al., 2007).

Na busca de novos produtos como alternativa no manejo de fitonematoides, objetivou-se avaliar o efeito do extrato aquoso de *T. minuta* na eclosão, mobilidade de juvenis de segundo estágio (J2) *in vitro* e na reprodução de *Heterodera glycines* na cultura da soja e de *Meloidogyne incognita* em tomateiro em casa de vegetação.

4.4 MATERIAL E MÉTODOS

O ensaio foi realizado em laboratório (*in vitro*) e em casa de vegetação (*in vivo*), com delineamento experimental inteiramente casualizado, com seis tratamentos e quatro repetições.

Para a produção dos extratos foram utilizados, separadamente, haste e folhas de *T. minuta*, que foram processadas em liquidificador na proporção de 1 g de tecido vegetal para 10 mL de água destilada e esterilizada (10% m/v). As suspensões foram mantidas em B.O.D. por 24 horas, em frasco âmbar fechado na temperatura de 26 °C. Após esse período, filtrou-se o conteúdo dos frascos e obteve-se uma suspensão na concentração de 100 mg mL⁻¹ (COSTA et al., 2001). A partir desta concentração, obteve-se as demais (12,5; 25; 50 e 75 mg mL⁻¹), diluídas em água destilada e esterilizada, e utilizando água como testemunha controle (0 mg mL⁻¹).

O inóculo de *H. glycines* foi obtido a partir de raízes de soja cv. M6410 IPRO, mantidas em casa de vegetação. Para a extração, as raízes foram processadas em liquidificador e colocadas sobre peneiras acopladas de 850, 250 e 25 mm, lavadas em água. As fêmeas retidas na peneira de 250 mm foram esmagadas e os ovos liberados foram recolhidos em peneira de 25 mm, segundo adaptações na metodologia de Dias-Arieira et al. (2003). Os ovos foram recolhidos em béquer e a suspensão foi calibrada para 250 ovos/mL.

O inóculo de *M. incognita* foi retirado de raízes de tomate cv. Santa Clara 'Kada' mantido em casa de vegetação por 60 dias, seguindo o método de extração de Bonetti e Ferraz (1981). A suspensão aquosa foi calibrada para 360 ovos/mL.

Para o ensaio de eclosão foram utilizados tubos de ensaio contendo, separadamente, 2 mL das suspensões de inóculo de *H. glycines* e *M. incognita* + 2 mL de cada concentração dos extratos de caule e de folha (separadamente), incubados em B.O.D. a 26 ± 2 °C. Foram realizadas três avaliações, aos quatro, oito e 12 dias após a incubação, determinando-se a porcentagem de eclosão dos juvenis de segundo estágio (J2) de *H. glycines* e *M. incognita*.

E, aos 16 dias após a incubação, realizou-se o ensaio em casa de vegetação para avaliar o efeito nematicida ou nematostático dos extratos sobre os nematoides. Para tanto, as suspensões contendo ovos e J2 tratadas com os extratos, depois de enxaguadas em água corrente, foram inoculadas em plantas de soja cv. M6410 IPRO para *H. glycines* e de tomate cv. Santa Clara 'Kada' para *M. incognita*, em vasos de 500 mL contendo como substrato solo de barranco e areia (1:3). Decorridos 30 e 60 dias da inoculação (DAI), respectivamente, para *H. glycines* em soja e *M. incognita* em tomate, as raízes foram processadas e avaliadas quanto ao número de ovos e J2 pela metodologia de Bonetti e Ferraz (1981).

Para o ensaio de mobilidade de juvenis, foram preparadas câmaras de eclosão (CLIFF; HIRSCHMANN, 1985) para obtenção de J2, que foram posteriormente quantificados, em câmara de contagem de nematoide sob microscópio de luz, em que se obteve aproximadamente

240 J2 / mL de *H. glycines* e 325 J2 / mL de *M. incognita*. Em tubos de ensaios foram adicionados 2 mL da suspensão contendo os J2 de cada espécie de nematoide + 2 mL de cada concentração dos extratos aquosos de haste e de folha (separadamente). Na testemunha controle (0 mg mL⁻¹) foi utilizada somente água destilada.

Os tubos de ensaios foram mantidos em B.O.D. a 26 °C ± 2 °C por 24 horas. Após esse período, o conteúdo de cada tubo foi enxaguado com água corrente sobre peneira de 25 mm e recolhido em placas de Petri, para a primeira avaliação da mobilidade dos J2. Após a contagem, as placas retornaram para B.O.D. nas mesmas condições, sendo novamente avaliada após 48 horas da retirada do extrato. Os J2 que permaneceram imóveis, retilíneos ou que apresentavam aspecto incomum foram considerados mortos (FRANZENER et al., 2007).

Após a segunda avaliação, seguiu-se para o ensaio em casa de vegetação com a inoculação de cada repetição em plantas de soja cv. M6410 IPRO para *H. glycines* e de tomate cv. Santa Clara 'Kada' para *M. incognita*, da mesma maneira descrita para o ensaio de eclosão. Aos 30 e 60 DAI, respectivamente, para *H. glycines* e *M. incognita* foram avaliados o número de ovos e J2 nas raízes.

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo programa estatístico R (R CORE TEAM, 2017) e análise de regressão, com o auxílio do programa Curve Expert Basic.

4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados para eclosão dos J2 de *H. glycines* tratados com extrato aquoso de caule de *T. minuta*, após os 12 dias de incubação (DAT), mostraram que todas as concentrações testadas apresentam médias menores que a testemunha, sendo eficaz na redução de 40 % da

eclosão dos nematoides na menor concentração (12,5 mg mL⁻¹), em comparação com a testemunha (0 mg mL⁻¹) (Figura 1).

Já para o extrato aquoso de folha de *T. minuta*, a melhor concentração foi de 100 mg mL⁻¹ representando uma redução de 67 % da eclosão dos J2 comparada com a testemunha aos 12 DAT (Figura 1), indicando que os compostos presentes nas folhas não tem a mesma ação contra o *H. glycines*.

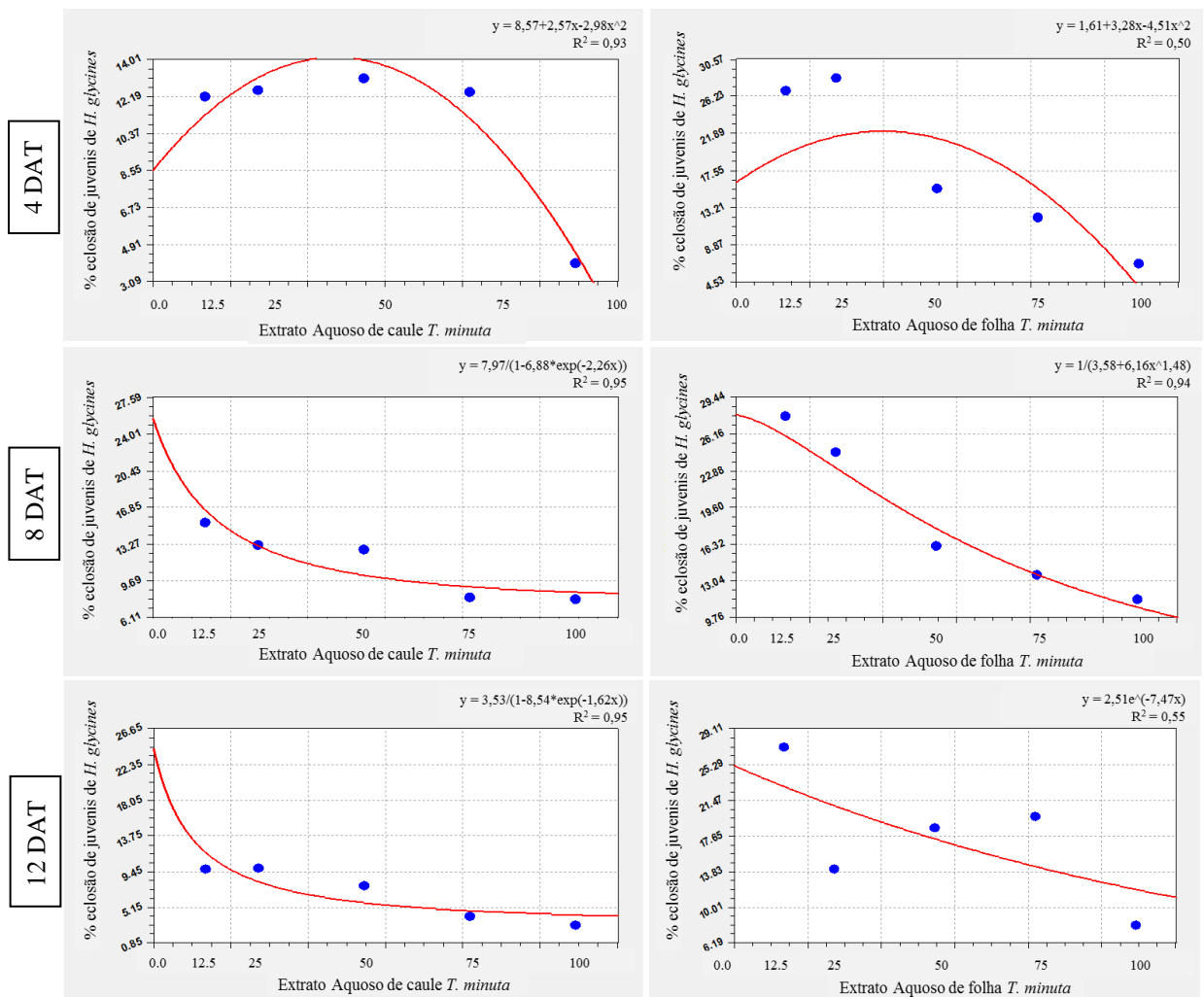


Figura 1: Porcentagem de eclosão de juvenis de *Heterodera glycines* avaliada aos 4, 8 e 12 dias após o tratamento (DAT) com extrato de caule e de folha de *Tagetes minuta*.

Nos resultados observados para a porcentagem de mobilidade dos J2 de *H. glycines* após 48 horas da retirada do extrato de caule (Figura 2), notou-se que as concentrações 75 e

100 mg mL⁻¹ tiveram médias menores e significativamente diferentes da testemunha, portanto consideradas eficazes em provocar a paralização de pelo menos 66 % dos J2 de *H. glycines*.

Em relação à mobilidade dos J2, o extrato de caule (Figura 2), nas avaliações de 24 e 48 horas após o tratamento (HAT), todas as concentrações foram eficientes, comparando-se com a testemunha, em imobilizar os J2. Para o extrato de folha, as concentrações mais eficientes foram de 50, 75 e 100 mg mL⁻¹ apresentando diferença para a testemunha (0 mg mL⁻¹). Extratos aquosos de folhas de *Ocimum purpureus*, *Cymbopogon winterianus*, *Cymbopogon citratus*, e de sementes de *Curcubita moschata* e *Carica papaya*, também, foram testados *in vitro* sobre a eclosão e mobilidade de *H. glycines*, e mostraram resultados significativos como a redução de até 100% da mobilidade dos juvenis com a aplicação do extrato de *C. papaya* (SCHIDLOWSKI et al., 2016).

A eficiência dos extratos na redução da mobilidade dos J2 de *H. glycines*, conseqüentemente, influenciou o desenvolvimento deste nematoide, após 30 dias da inoculação em soja, conforme demonstrado na Figura 3. Observou-se diferença entre as concentrações testadas e a testemunha, com destaque para a maior concentração (100 mg mL⁻¹) que apresentou efeito significativo com redução de 70 % da reprodução de *H. glycines*.

A avaliação da mobilidade dos J2 de *H. glycines*, inoculados em plantas de soja, não apresentou diferença estatística para o extrato aquoso de caule, no entanto para o extrato de folha as concentrações 75 e 100 mg mL⁻¹ tiveram as menores médias de número de nematoides por grama de raiz, ou seja, estas concentrações foram eficazes em reduzir a infecção em 70 % (Figura 3).

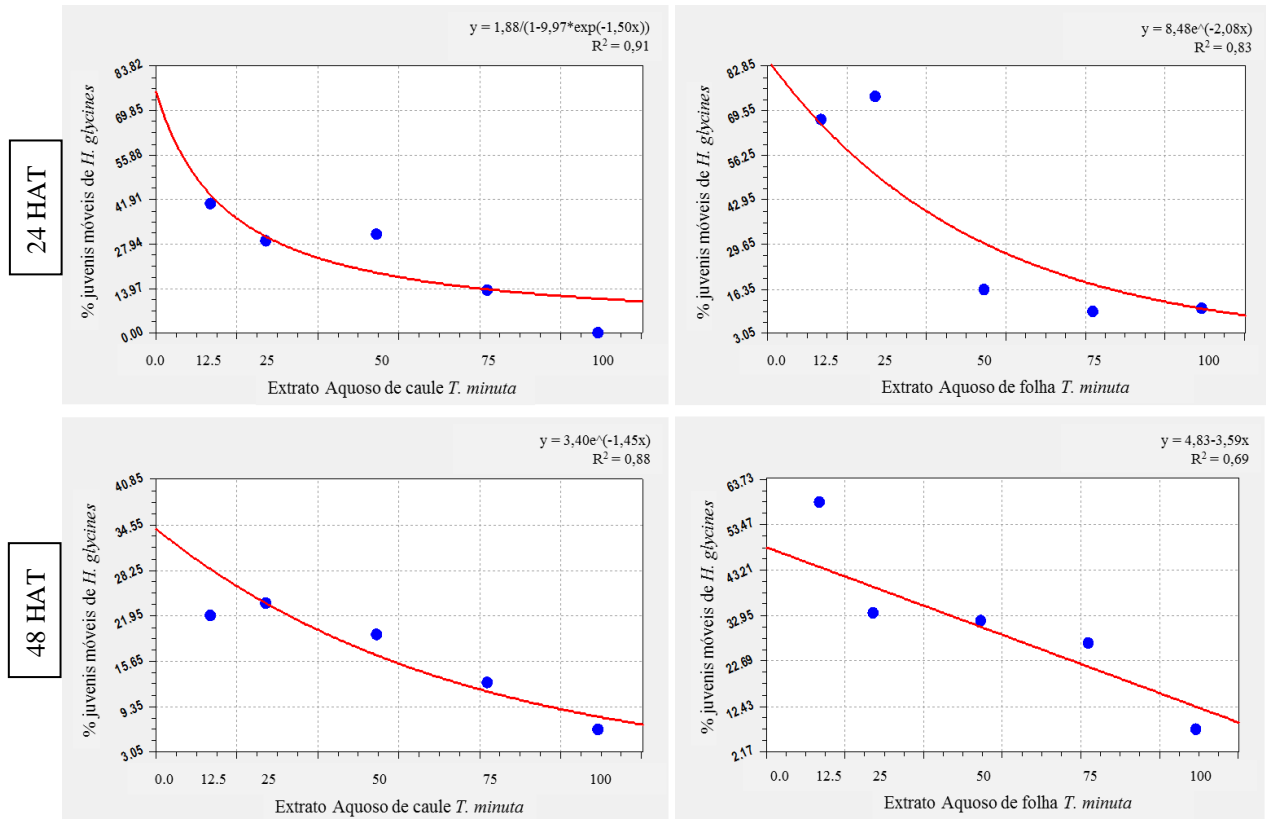


Figura 2: Porcentagem de juvenis móveis de *Heterodera glycines* avaliado a 24 e 48 horas após a retirada dos tratamentos (HAT) com extrato de caule e de folha de *Tagetes minuta*.

A composição química de *T. minuta* apresenta diferentes compostos em diferentes partes da planta, porém como principal constituinte das folhas prevalece o dihidrotagetona, enquanto que nas flores prevalecem β -ocimeno e tagetenona (CHAMORRO et al., 2008).

Segundo Pérez et al. (2003), princípios ativos presentes nos óleos essenciais de flores, folhas, raízes e sementes de *Tagetes* spp. podem atuar diretamente sobre a cutícula do patógeno, alterando sua permeabilidade ou, então, induzirem resistência envolvendo a ativação de estruturas de defesa latentes existentes nas plantas.

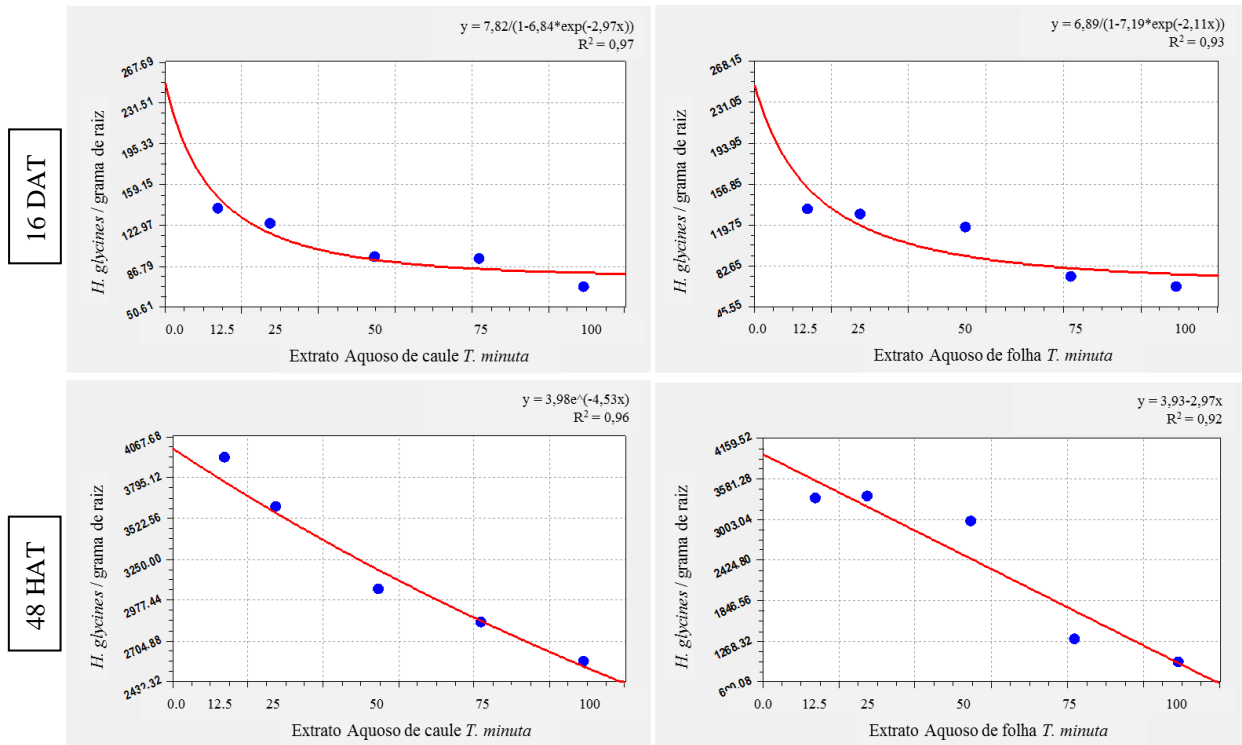


Figura 3: Números de juvenis e ovos de *Heterodera glycines* por grama de raízes de soja avaliados aos 30 dias após a inoculação, submetidos aos tratamentos com extratos de caule e de folha de *Tagetes minuta*, e incubados por 16 dias (DAT) e 48 horas (HAT).

Para *M. incognita*, com relação ao ensaio de eclosão dos juvenis, em todas as avaliações (4, 8 e 12 DAT) foram observadas reduções da eclosão de J2 nas diferentes concentrações, sendo que aos 12 DAT, tanto para o extrato aquoso de caule como de folha, as médias foram diferentes da testemunha (0 mg mL^{-1}), com eficiência de 91 % para o extrato de caule e 84 % com extrato de folha (Figura 4).

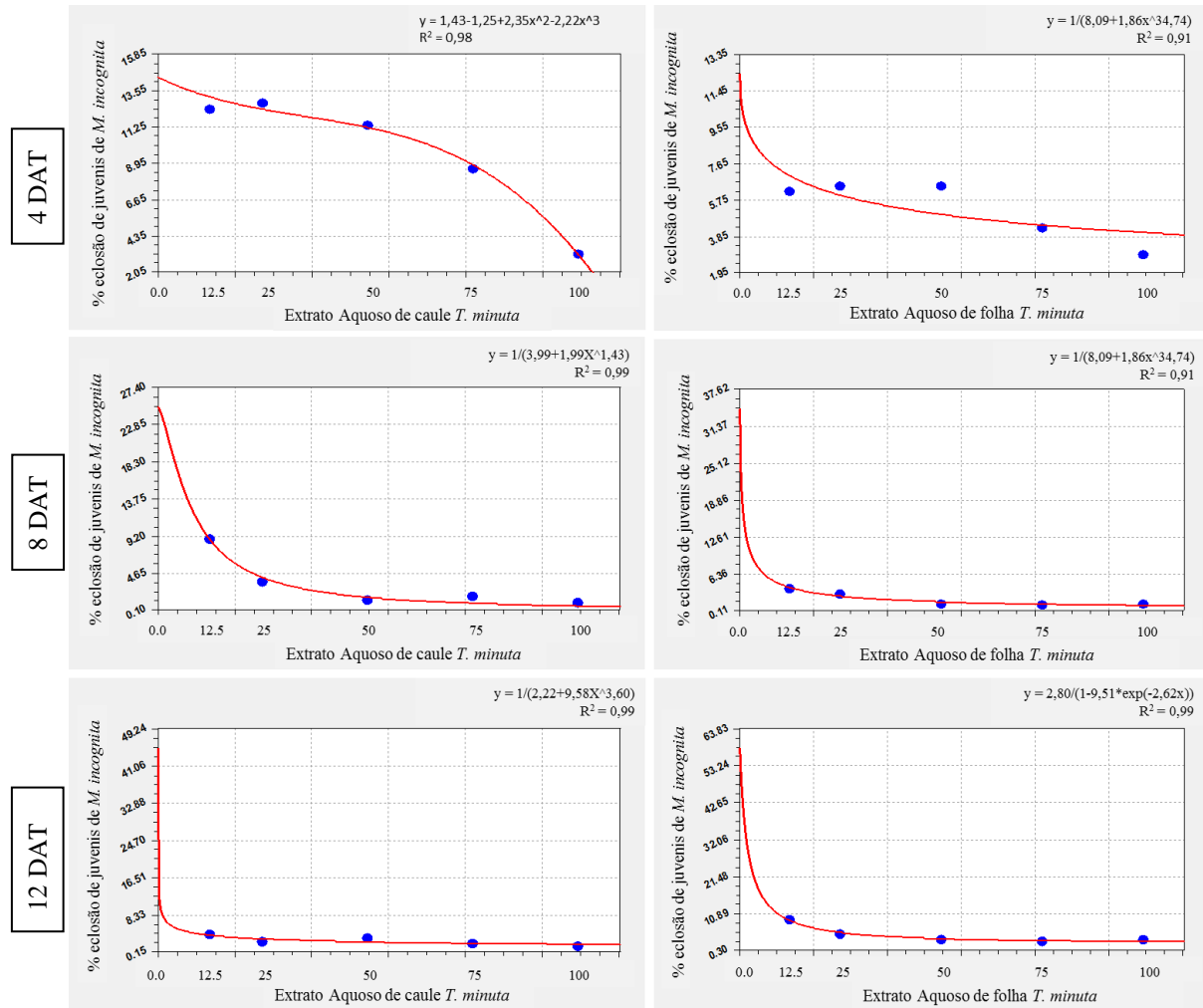


Figura 4: Porcentagem de eclosão de juvenis de *Meloidogyne incognita* avaliada aos 4, 8 e 12 dias após o tratamento (DAT) com os extratos de caule e de folha de *Tagetes minuta*.

Quanto a porcentagem de mobilidade de J2 após 48 horas da retirada dos tratamentos (HAT), os dados demonstraram que ambos os extratos apresentaram diferença para a testemunha, em todas as concentrações avaliadas, sendo eficientes em imobilizar os J2 de *M. incognita*. Entre os extratos destaca-se a concentração de 12,5 mg mL⁻¹ do extrato de caule com 70 % de imobilização dos J2, e a concentração de 50 mg mL⁻¹ do extrato de folha com 95 % de imobilização (Figura 5).

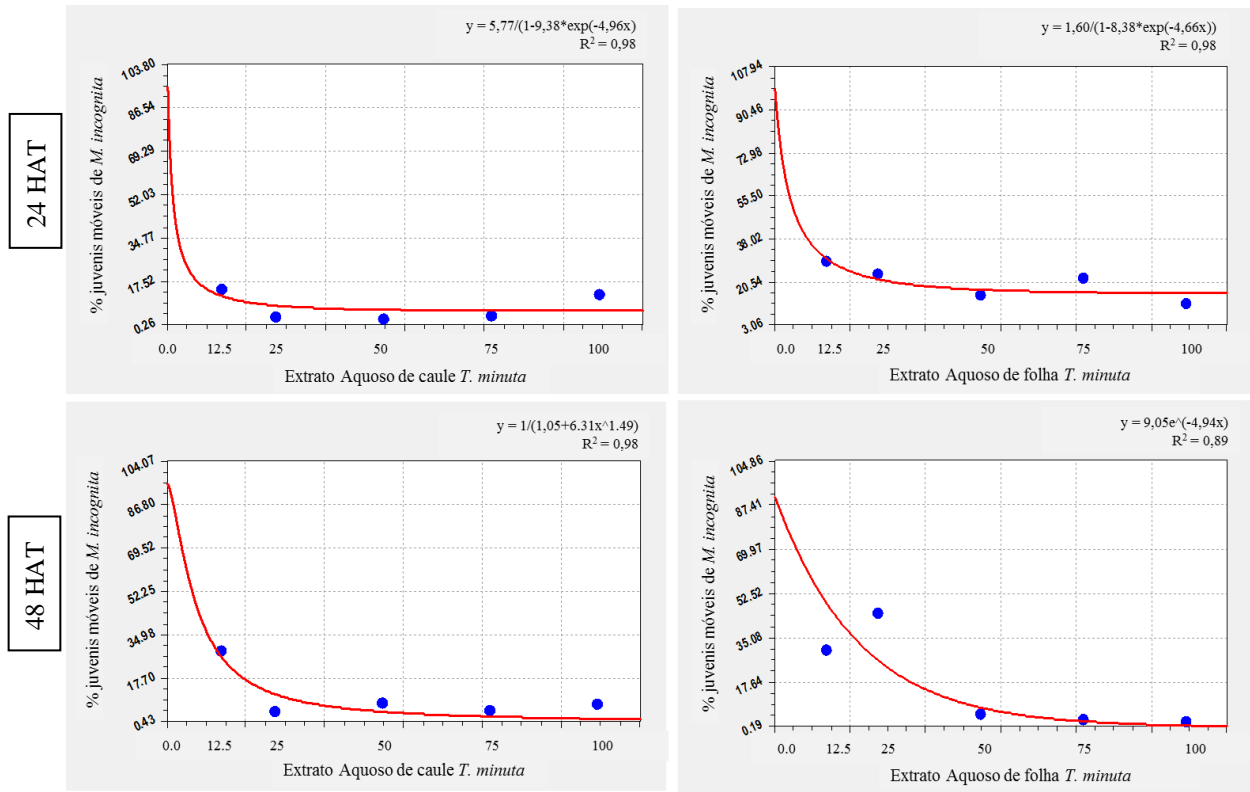


Figura 5: Porcentagem de juvenis móveis de *Meloidogyne incognita* avaliado a 24 e 48 horas após a retirada dos tratamentos (HAT) com extrato de caule e de folha de *Tagetes minuta*.

Os resultados para o efeito dos extratos sobre a infecção dos J2 de *M. incognita*, aos 16 DAT, avaliados aos 60 dias após a inoculação (DAI) nas plantas de tomate, encontram-se demonstrados na Figura 6. Quando comparamos o extrato de caule com o de folha, observamos uma maior eficiência sobre a reprodução de *M. incognita* nas raízes com a menor concentração (12,5 mg mL⁻¹) para extrato de folha, apresentando uma redução de 80 % dos juvenis oriundos do ensaio de eclosão aos 16 DAT, e redução de 91 % dos juvenis oriundos do ensaio de mobilidade, depois de 48 HAT. O extrato de caule também apresentou redução na reprodução do nematoide, porém com porcentagens menores (Figura 6), de 63 % na concentração de 12,5 mg mL⁻¹ quanto aos juvenis obtidos no ensaio de eclosão (16 DAT) e de 47 % na concentração de 25 mg mL⁻¹ quanto aos juvenis oriundos do ensaio de mobilidade (48 HAT).

A redução da infectividade dos juvenis e, conseqüente, reprodução da espécie, pode ser atribuída ao gasto das reservas lipídicas, resultante da contínua movimentação em água

(CAMPOS; CAMPOS; POZZA, 2006), ou ainda a infecção pode ser alterada por ação dos compostos presentes nos extratos vegetais (MARTINS; SANTOS, 2016).

Os juvenis oriundos do ensaio de eclosão, aos 16 DAT, que infectaram as raízes das plantas de tomate não foram eficientes em completarem o ciclo, com hipótese desses J2 terem diminuído o poder de locomoção no solo, ou até perderem o poder de injetar substâncias tóxicas nas células das raízes, a fim de estabelecer o sítio de alimentação, provavelmente pela ação dos compostos com atividade nematicida produzidos por espécies de *Tagetes*, como α -tertienil (PRIYANKA et al., 2013).

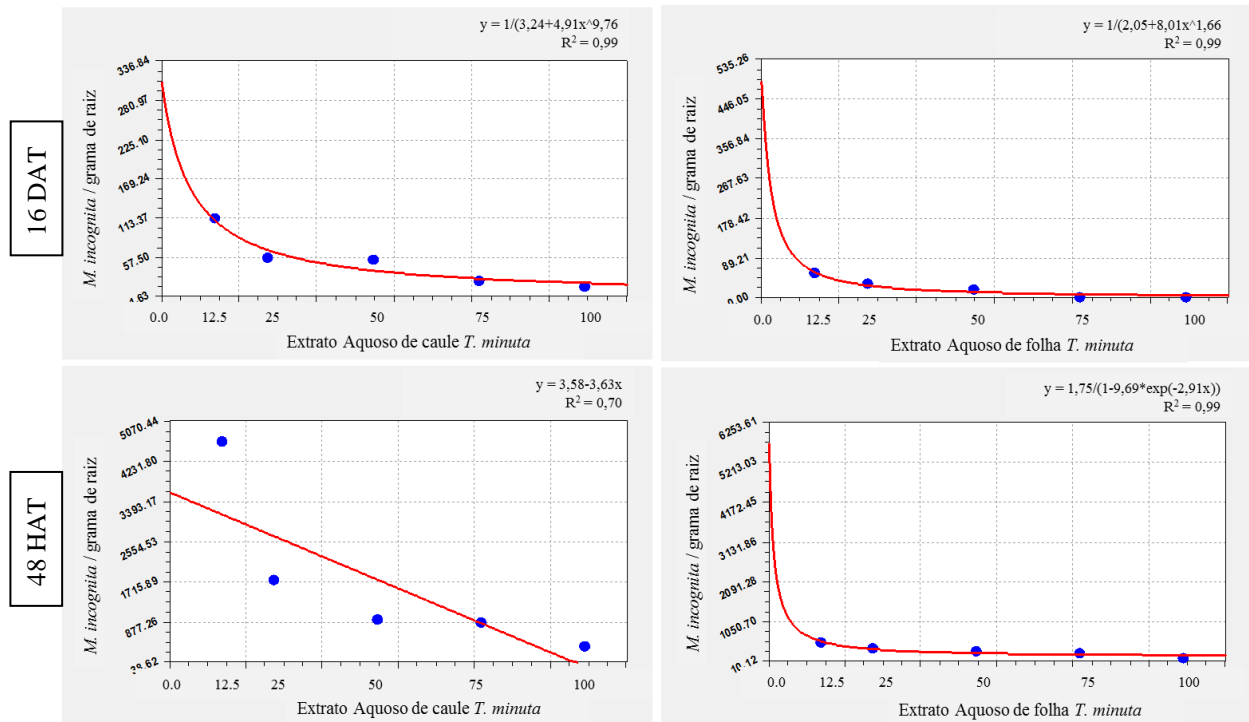


Figura 6: Números de juvenis e ovos de *Meloidogyne incognita* por grama de raízes de tomate avaliados aos 60 dias após a inoculação, submetidos aos tratamentos com extratos de caule e de folha de *Tagetes minuta*, e incubados por 16 dias (DAT) e 48 horas (HAT).

4.6 CONCLUSÃO

Para os ensaios com *H. glycines*, a melhor concentração foi de 75 mg mL⁻¹ pois, além de apresentar efeito deletério sobre a eclosão e mobilidade, reduziu em 70% a reprodução de *H. glycines* em plantas de soja.

Quanto aos ensaios com *M. incognita*, a concentração de 12,5 mg mL⁻¹ foi a mais eficaz em reduzir a reprodução dos nematoides nas plantas de tomate com uma eficiência de 91%.

5. ARTIGO C: APLICAÇÃO DO EXTRATO AQUOSO DE *Tagetes minuta* NO CONTROLE DE *Meloidogyne incognita* E *Heterodera glycines* EM SOJA

APPLICATION OF AQUEOUS EXTRACT OF *Tagetes minuta* IN CONTROL OF *Meloidogyne incognita* AND *Heterodera glycines* IN SOYBEAN

Camila Torres Stroze^{1*}, Débora Cristina Santiago¹.

¹Universidade Estadual de Londrina, Campus Londrina, caixa postal 6001, 86051-990, Londrina, PR, Brasil. *Autor para correspondência: ctstroze@gmail.com

5.1 RESUMO

Objetivou-se avaliar a atividade nematicida dos extratos aquosos de caule e de folha de *Tagetes minuta* em duas formas de aplicação, em solo e pulverização foliar, a fim de controlar a reprodução de *Heterodera glycines* e *Meloidogyne incognita* na cultura da soja, em casa de vegetação. Para tanto, foram testadas cinco concentrações dos extratos aquosos de caule e de folha (12,5; 25; 50; 75 e 100 mg mL⁻¹) mais testemunhas inoculada e absoluta (apenas água), com seis repetições. Os extratos foram aplicados em duas formas, uma única aplicação direta no solo e via aplicação foliar, aos 15 e 30 dias após a inoculação. Após a inoculação, as plantas de soja cv. M6410 IPRO foram mantidas em casa de vegetação até a plena floração (75 dias do plantio), seguida da avaliação do número de ovos e/ou juvenis dos nematoides. Os resultados mostraram que os extratos de caule e de folhas de *T. minuta* reduzem as populações de nematoides. Quando aplicados via foliar foram eficientes em controlar o desenvolvimento de *H. glycines*, sendo a melhor concentração de 75 mg mL⁻¹ (para o extrato de caule) e de 25 mg mL⁻¹ (para o extrato de folha). Para o controle de *M. incognita* a aplicação direta no solo foi a melhor forma, com a concentração de 12,5 mg mL⁻¹ para ambos os extratos (caule e folhas).

Palavras-chave: Controle alternativo. Extratos de plantas. Nematóide. Plantas daninhas.

5.2 ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the nematicidal activity of the stem and leaf extracts of *Tagetes minuta* in two forms of application, in soil and foliar spray, to control the reproduction of *Heterodera glycines* and *Meloidogyne incognita* in the soybean vegetation. For this, five concentrations of the aqueous extracts of stem and leaf (12.5; 25; 50; 75 and 100 mg mL⁻¹) More inoculated and absolute controls (water only) with six replicates. The extracts were applied in two forms, a single direct application in the soil and via foliar application, at 15 and 30 days after inoculation. After inoculation, soybean plants cv. M6410 IPRO were kept in a greenhouse until full bloom (75 days of planting), followed by evaluation of the number of eggs and / or juveniles of nematodes. The results showed that stem extracts and leaves of *T. minuta* reduce nematode populations. When applied by leaf, they were efficient in controlling the development of *H. glycines*, being the best concentration of 75 mg mL⁻¹ (for the stem extract) and 25 mg mL⁻¹ (for the leaf extract). For the control of *M. incognita* the direct application to the soil was the best form, with the concentration of 12.5 mg mL⁻¹ for both extracts (stem and leaves).

Key words: Alternative control. Extract of plants. Nematode. Weed.

5.3 INTRODUÇÃO

Dentre os fatores que afetam a qualidade e produção da cultura da soja (*Glycine max*) destacam-se as doenças, entre essas as causadas por nematoides, com mais de 4100 espécies de fitoparasitas descritos (DECRAEMER; HUNT, 2006), e com danos estimados em 80 milhões de dólares ano (NICOL et al., 2011).

No Brasil, os nematoides com maior expressão de danos na cultura da soja são os nematoides do cisto da soja (*Heterodera glycines*), nematoides-de-galhas (*Meloidogyne* spp.) e nematoide das lesões radiculares (*Pratylenchus* spp.) (FERRAZ, 2006). Estes fitonematoides provocam redução do porte das plantas, clorose aparente, com intenso abortamento de vagens durante o florescimento e amadurecimento prematuro das plantas, com isso os danos podem variar de 30 a 50 % em função da intensidade do ataque (GOULART, 2008; DIAS et al., 2010; HENNING et al., 2014).

A erradicação desses fitoparasitas em área infestada é extremamente difícil, portanto torna-se necessário o manejo com práticas integradas, como rotação e/ou sucessão de culturas com espécies não hospedeiras, utilização de cultivares resistente, tratamento químico e/ou biológico (ARAÚJO et al., 2012), entre outros métodos alternativos. Nesta linha, a aplicação de extratos aquosos de plantas, principalmente daquelas conhecidas como antagonistas, tem apresentado resultados eficientes no controle de algumas espécies de fitonematoides, e pode ser utilizada para integrar o (NEVES et al., 2005; GARDIANO et al., 2009; MOREIRA; SANTOS; INNECCO, 2009).

O uso de diferentes extratos aquosos visando o controle do nematoide foi relatado por diversos autores (JOURAND et al., 2004; LOPES et al., 2005; NATARAJAN et al., 2006; FRANZENER et al., 2007; OLABIYI, 2008; JAVED et al., 2008).

As espécies do gênero *Tagetes* são tidas como antagônicas aos fitonematoides e estão entre as plantas com maior eficiência, especialmente, no controle de *Pratyenchus* spp. e *Meloidogyne* spp. (JOURAND et al., 2004; SANTANA et al., 2010). O efeito sobre fitonematoides é atribuído aos compostos nematicidas ‘ α -terthienil-5-(3-buten-1-inil)-2,2’-bithienyl e seus derivados presentes nas raízes (FERREIRA; SILVA; NASCIMENTO, 2013; MOREIRA; FERREIRA, 2015), porém, dependem de fotoativação, ou da ação de peroxidases ou de outros ativadores para que haja a liberação da substância nematicida (CHITWOOD, 2002).

O efeito antagônico de *Tagetes* spp. sobre nematoides tem sido atribuído tanto ao cultivo das plantas em campos infestados (REYNOLDS et al., 2000; PLOEG, 2000; PUDASAINI et al., 2006), como pelo uso de extratos obtidos a partir de tecidos da planta (NATARAJAN et al., 2006). No entanto, o efeito nematicida de extratos de *T. minuta* tem sido pouco explorado.

Scramin et al. (1987) avaliaram *in vitro* o efeito de extratos de 14 espécies vegetais sobre juvenis de *M. incognita* e verificaram que o extrato hexânico de folhas de *T. minuta*, seguido pelo extrato clorofórmico de caule de *T. patula*, apresentaram efeitos nematicida ou nematostático.

Em vista disso, este trabalho teve por objetivo avaliar o efeito nematicida dos extratos aquosos de caule e de folha de *T. minuta* em duas formas de aplicação, direto no solo e via pulverização foliar, a fim de controlar a reprodução de *H. glycines* e *M. incognita* na cultura da soja em casa de vegetação.

5.4 MATERIAL E MÉTODOS

O ensaio foi realizado em condição de casa de vegetação, e delineamento experimental inteiramente casualizado com 12 tratamentos e seis repetições. Foram testados extratos aquosos

obtidos a partir do caule e de folhas de *Tagetes minuta* foram preparados através do processamento em liquidificador na proporção de 1 g de tecido vegetal para cada 10 mL de água (10% m/v), mantendo a suspensão em repouso por 24 horas, em vidro âmbar fechado na temperatura de 26 ± 2 °C. Após esse período, filtrou-se o conteúdo dos vidros obtendo-se uma concentração base de 100 mg mL^{-1} , a partir dessa concentração foram obtidas as demais, diluídas em água destilada e esterilizada (COSTA et al., 2001), 75; 50; 25; 12,5 e 0 mg mL^{-1} , para a testemunha consideramos apenas água.

O inóculo de *H. glycines* foi obtido a partir de raízes de soja cv. M6410 IPRO, mantidas em casa de vegetação por 30 dias. Para a extração dos ovos, as raízes foram processadas em liquidificador e colocadas sobre peneiras acopladas de 850, 250 e 25 mm, lavadas em água. As fêmeas retidas da peneira de 250 mm foram esmagadas com auxílio da base de um béquer e os ovos liberados foram recolhidos em peneira de 25 mm, segundo adaptações na metodologia de Dias-Arieira et al. (2003). Os ovos foram recolhidos em béquer e a suspensão foi calibrada em 350 ovos/mL.

O inóculo de *M. incognita* foi retirado de raízes de tomate cv. Santa Clara 'Kada' mantido em casa de vegetação por 60 dias, seguindo o método de extração proposto por Boneti & Ferraz (1981). E a suspensão de inóculo foi calibrada em 750 ovos/mL.

Os ensaios foram conduzidos separadamente para *H. glycines* e *M. incognita*, em vasos de 0,8 litros contendo uma mistura solo de barranco + areia na proporção 1:3 (v/v), previamente esterilizada em autoclave. Para tanto, utilizou-se uma semente de soja cv. M6410 IPRO por vaso, que recebeu logo após a semeadura a inoculação com 1100 ovos e/ou J2 de *H. glycines* e com 2300 ovos e/ou J2 de *M. incognita* por vaso.

Os extratos foram aplicados de duas formas. A primeira foi realizada em uma única vez, diretamente no substrato, no mesmo dia da inoculação, com a aplicação de 5 mL de cada concentração dos extratos. A segunda forma de aplicação foi através de pulverização foliar,

realizada em duas épocas, sendo aos 15 dias após a inoculação (DAI) e aos 30 DAI. Utilizou-se um pulverizador manual com aplicação até o ponto de escorrimento nas plantas. Durante a condução do ensaio, as plantas foram irrigadas manualmente de acordo com a necessidade diária.

Aos 75 dias após sementeira, com a planta em estágio R2, avaliou-se o número de ovos e/ou J2 de *H. glycines* e *M. incognita* nas raízes das plantas de soja.

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo programa estatístico R (R CORE TEAM, 2017). Foi realizada análise de regressão, com o auxílio do programa Curve Expert Basic, a fim de indicar a concentração mais eficaz contra os nematoides estudados.

5.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com base nas análises dos dados, no ensaio com *H. glycines* e com extratos aquosos de caule de *T. minuta* aplicados no solo, não observou-se diferença entre os tratamentos (12,5; 25; 50; 75 e 100 mg mL⁻¹) e a testemunha controle (0 mg mL⁻¹). E a aplicação no solo, também, não mostrou diferença entre as concentrações testadas, indicando que o extrato não afeta o desenvolvimento e reprodução de *H. glycines* aplicado dessa forma (Figura 1).

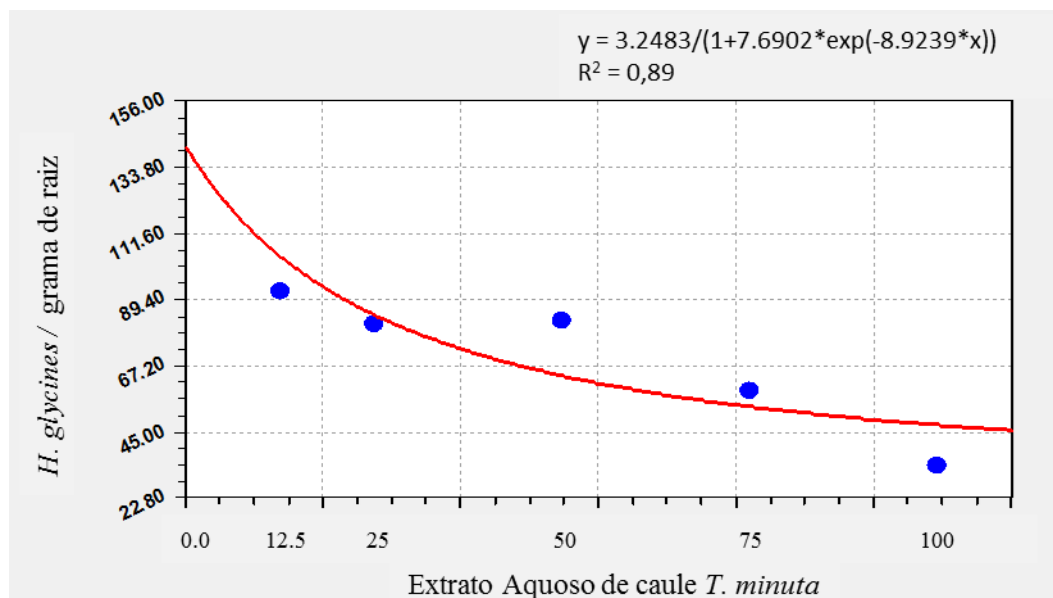


Figura 1: Número de ovos e/ou J2 de *Heterodera glycines* em raiz de soja (*Glycine max* cv. M6410 IPRO) submetida a diferentes concentrações (mg mL^{-1}) do extrato aquoso de caule aplicado no solo.

Com relação ao extrato de caule via aplicação foliar, os resultados mostraram não haver diferença entre as concentrações 75 e 100 mg mL^{-1} , com médias de 12,5 e 15,6 ovos e/ou J2 de *H. glycines*, respectivamente, demonstrando valores superiores a 83% de controle da população (Figura 2).

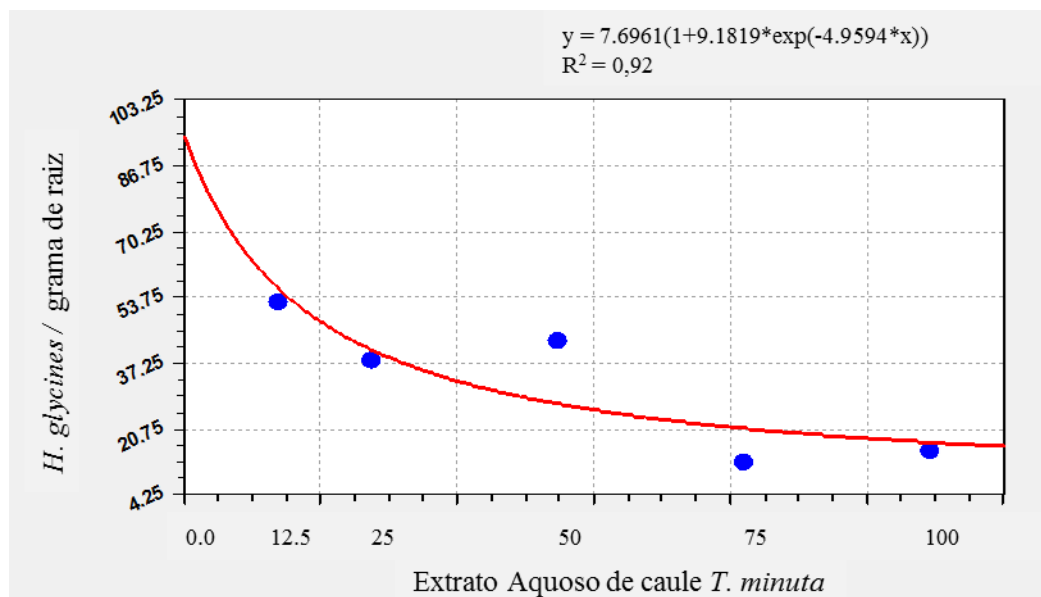


Figura 2: Número de ovos e/ou J2 de *Heterodera glycines* em raiz de soja (*Glycine max* cv. M6410 IPRO) submetida a diferentes concentrações (mg mL^{-1}) do extrato aquoso de caule aplicados em duas aplicações foliares aos 15 e 30 DAI.

Ferraz e Valle (2001), associaram a baixa atividade do extrato de raízes de *T. patula* *in vivo* ao fato da ação nematicida dos compostos ser dependente de foto-ativação pela irradiação na faixa do ultravioleta próximo, assim quando o extrato é aplicado no solo, a ausência de luz impede tal foto-ativação. Isso, também, explica o melhor resultado de controle de *H. glycines* obtido com a aplicação via foliar do extrato de caule de *T. minuta*.

Para o extrato de folha aplicado via solo, os dados mostraram redução da população de *H. glycines* desde a concentração de 12,5 mg mL^{-1} , apresentando diferença para a testemunha (Figura 3), com eficiência de controle para todas as concentrações testadas.

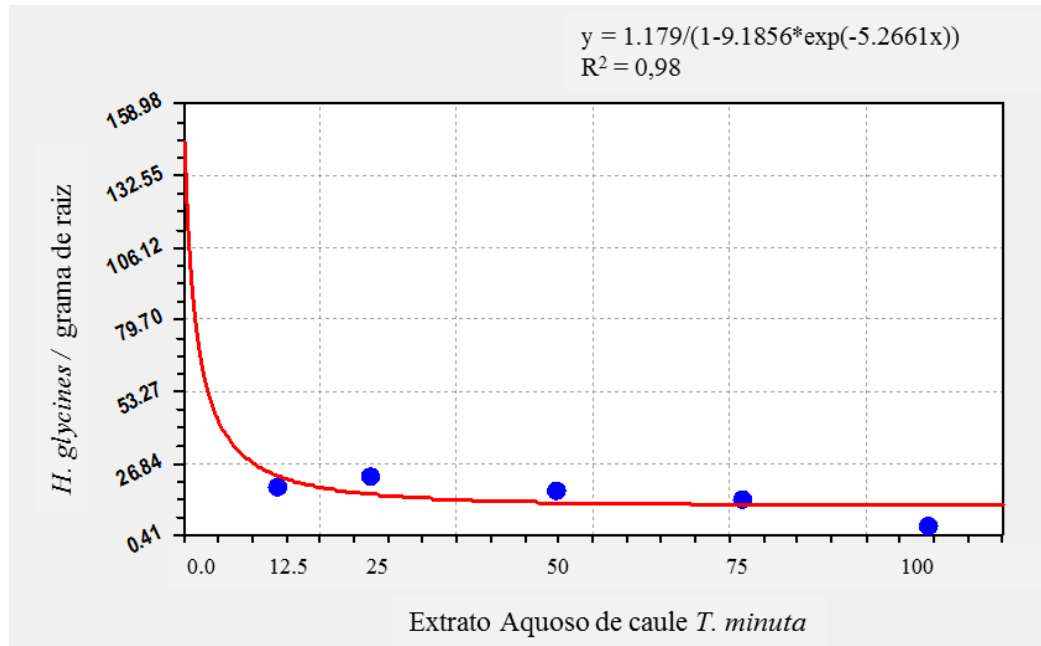


Figura 3: Número de ovos e/ou J2 de *Heterodera glycines* em raiz de soja (*Glycine max* cv. M6410 IPRO) submetida a diferentes concentrações (mg mL⁻¹) do extrato aquoso de folha aplicado no solo.

Quanto à aplicação foliar do extrato de folha de *T. minuta*, verificou-se que as concentrações 25; 50; 75 e 100 mg mL⁻¹ foram diferentes da testemunha (0 mg mL⁻¹), demonstrando que a partir da concentração 25 mg mL⁻¹ existe relativa eficácia de controle com 56 % de redução de *H. glycines* comparado com a testemunha (Figura 4).

Silva et al. (2008), também, observaram resultados satisfatórios com redução de 90 e 84 % no número de ovos e de cistos de *H. glycines*, respectivamente, com a aplicação de extratos aquoso obtido a partir de sementes de Nim, nas dosagens de 41,6 mg L⁻¹ e 1000 mg L⁻¹, respectivamente.

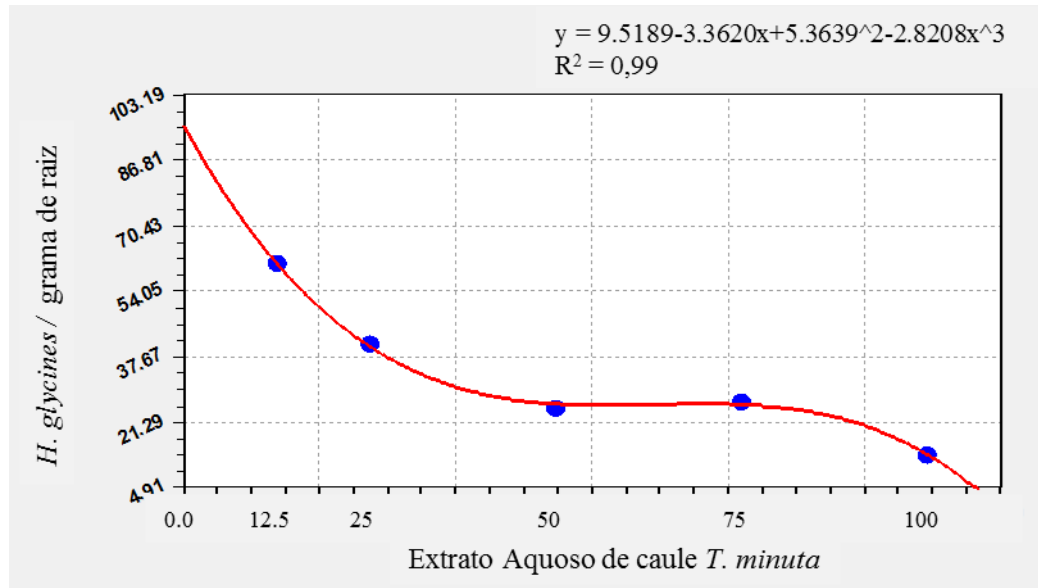


Figura 4: Número de ovos e/ou J2 de *Heterodera glycines* em raiz de soja (*Glycine max* cv. M6410 IPRO) submetida a diferentes concentrações (mg mL⁻¹) do extrato aquoso de folha aplicados em duas aplicações foliares aos 15 e 30 DAI.

Quanto aos resultados para o controle de *M. incognita*, em relação à aplicação em solo do extrato de caule, foi observada uma eficiência no controle maior que 82 % comparado com a testemunha (0,0 g mL⁻¹), com a concentração de 75 mg mL⁻¹ (Figura 5). Entre as concentrações observou-se que com o aumento da concentração houve uma maior eficiência de controle. Nesta forma de aplicação, os níveis de controle satisfatórios para *M. incognita* indica que este extrato pode ser uma alternativa para o manejo de nematoide-das-galhas.

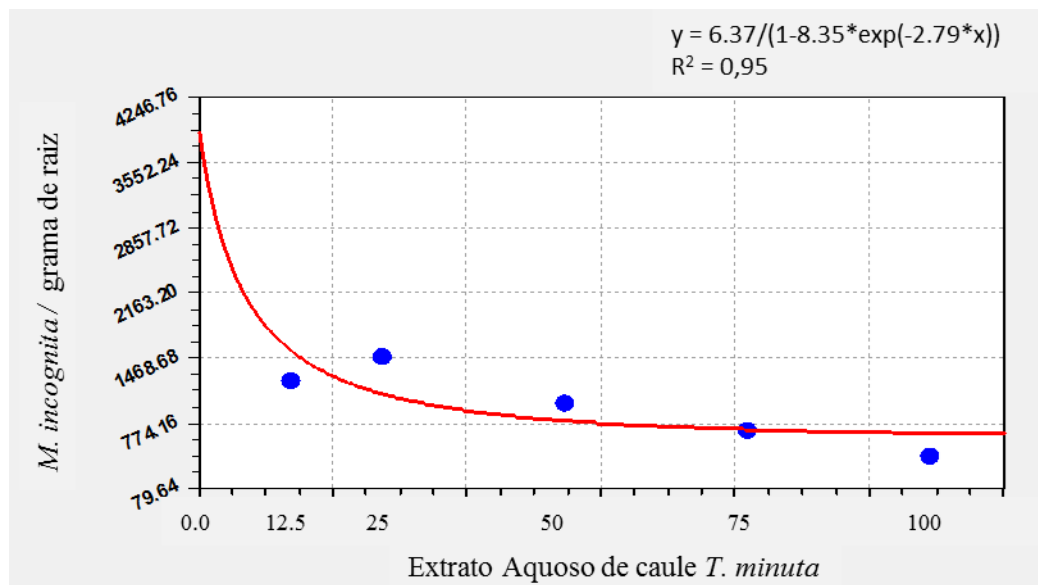


Figura 5: Número de ovos e/ou J2 de *Meloidogyne incognita* em raiz de soja (*Glycine max* cv. M6410 IPRO) submetida a diferentes concentrações (mg mL^{-1}) do extrato aquoso de caule aplicado no solo.

Resultados semelhantes foram encontrados por Jourand et al. (2004) e Natarajan et al. (2006) com a aplicação via solo de extrato aquoso da parte aérea de *T. erecta* e de folhas de *Crotalaria grantiana* Harv., nas dosagens de 0,1 e 1 g mL^{-1} , contra *M. incognita* em tomateiros, e constataram eficiência dos extratos vegetais no controle deste fitoparasita.

A utilização do extrato de caule em aplicação via foliar, nas concentrações 50, 75 e 100 mg mL^{-1} apresentaram diferença para a testemunha, com uma eficácia de mais de 54 % do extrato de caule para controle de *M. incognita*. Podendo atingir um controle acima de 80 % para o extrato de caule na concentração de 75 mg mL^{-1} , considerada uma redução satisfatória, levando em consideração a dificuldade de controle normalmente encontrada para os métodos tradicionais como o químico e físico (Figura 6).

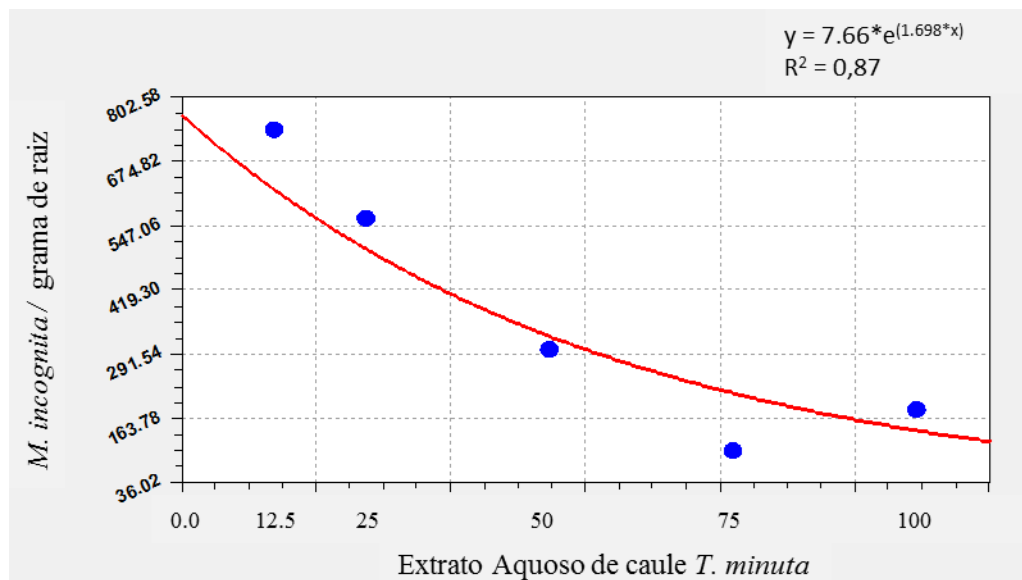


Figura 6: Número de ovos e/ou J2 de *Meloidogyne incognita* em raiz de soja (*Glycine max* cv. M6410 IPRO) submetida a diferentes concentrações (mg mL^{-1}) do extrato aquoso de caule aplicados em duas aplicações foliares aos 15 e 30 DAI.

Para o extrato de folha, nas diferentes formas de aplicação houve eficiência de controle do nematoide em relação à testemunha, e assim como para o extrato de caule, a aplicação via

foliar teve uma influência menor do que via solo. Para a aplicação via solo com o uso do extrato aquoso de folha de *T. minuta*, pode ser observado que todas as concentrações testadas foram diferentes da testemunha com menores médias para o número de ovos e/ou J2 de *M. incognita*, podendo ser considerado como uma possível ferramenta de manejo em áreas infestadas. Entre as concentrações avaliadas, a menor concentração (12,5 mg mL⁻¹) do extrato de folha, aplicado em solo, demonstra controle de 62 % da população de *M. incognita* (Figura 7).

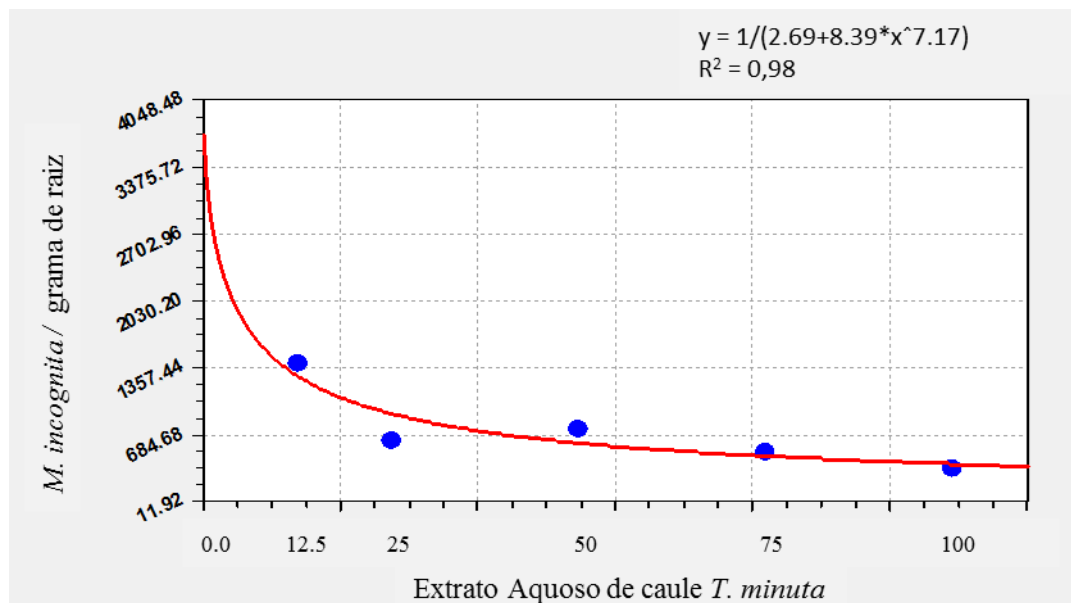


Figura 7: Número de ovos e/ou J2 de *Meloidogyne incognita* em raiz de soja (*Glycine max* cv. M6410 IPRO) submetida a diferentes concentrações (mg mL⁻¹) do extrato aquoso de folha aplicado no solo.

Na aplicação via foliar do extrato de folha, as melhores concentrações com diferenças da testemunha foram 50, 75 e 100 mg mL⁻¹ (Figura 8), com nível de controle de 57 % para *M. incognita*.

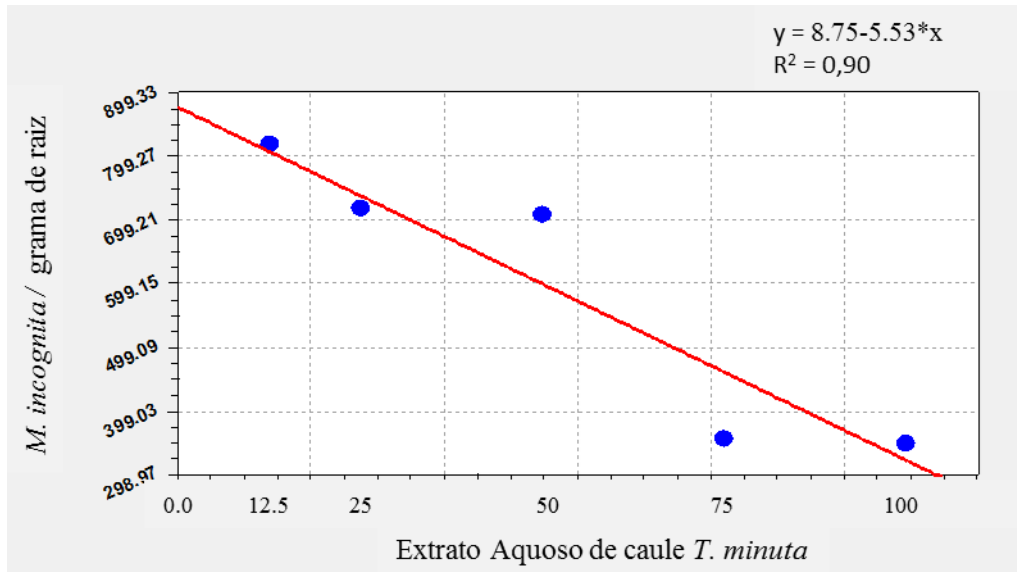


Figura 8: Número de ovos e/ou J2 de *Meloidogyne incognita* em raiz de soja (*Glycine max* cv. M6410 IPRO) submetida a diferentes concentrações (mg mL⁻¹) do extrato aquoso de folha aplicados em duas aplicações foliares aos 15 e 30 DAI.

Os extratos obtidos a partir das plantas de *T. minuta* mostraram ter um potencial efetivo para auxiliar no manejo de áreas infestadas com os nematoides *H. glycines* e *M. incognita*, entretanto, a forma de aplicação necessita ser melhor explorada a fim de se obter estabilidade da ação nematicida dos compostos.

5.6 CONCLUSÃO

Os extratos de caule e de folhas de *Tagetes minuta* reduzem as populações de *Heterodera glycines* e *Meloidogyne incognita*, respectivamente, em plantas de soja e de tomate, em de casa de vegetação.

Para *H. glycines*, a melhor concentração do extrato, aplicado via foliar, foi próxima de 75 mg mL⁻¹ (para o extrato de caule) e de 25 mg mL⁻¹ (para o extrato de folha).

Para o *M. incognita*, a aplicação via solo foi melhor, e com a concentração de 12,5 mg mL⁻¹ para ambos os extratos (caule e folhas).

6. CONCLUSÕES

A melhor forma de obtenção de mudas de *Tagetes minuta* foi a partir de estacas lenhosas, devido a maior taxa de enraizamento.

As plantas de *Tagetes minuta*, no presente estudo, impossibilitam o desenvolvimento do ciclo de vida de *H. glycines* e *M. incognita*, mas não impedem o desenvolvimento de *P. brachyurus*.

Para os ensaios *in vitro* com *H. glycines*, a melhor concentração foi de 75 mg mL⁻¹ pelo fato de reduzir em 70 % a população em planta de soja. E para *M. incognita*, a concentração de 12,5 mg mL⁻¹ foi a mais eficaz com eficiência de 91 %.

Quanto a forma de aplicação para o controle de *H. glycines*, a melhor aplicação foi via foliar nas concentrações de 75 mg mL⁻¹ (extrato de caule) e de 25 mg mL⁻¹ (extrato de folha). Para o *M. incognita*, a aplicação direta no solo foi a mais eficaz, na concentração 12,5 mg mL⁻¹ para ambos os extratos (caule e folhas).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABAD, P.; GOUZY, J.; AURY, J.M.; CASTAGNONE-SERENO, P.; DANCHIN, E.G.; DELEURY, E.; PERFUS-BARBEOCH, L.; ANTHOUARD, V.; ARTIGUENAVE, F.; BLOK, V.C. 2008. Genome sequence of the metazoan plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. **Natural Biotechnology**, 26: 909- 915.
- AGRIOS, G. N. 2005. **Plant pathology**. Burlington, MA: Elsevier Academic, 922p.
- AKHTAR, M.; MALIK, A. 2000. Roles of organic soil amendments and soil organisms in the biological control of plant-parasitic nematodes: a review. **Bioresource Technology**, v.74, p. 35-47.
- ALSTON, D.G.; SCHMITT, D.P. 1988. Development of *Heterodera glycines* Life Stages as Influenced by Temperature. **Journal of Nematology**, Lawrence, v. 20, n. 3, p. 366-372.
- ALMEIDA, A. M. R.; CARDOSO, J. B. N. 1997. Doenças da soja (*Glycines max* L. Merrill) In: KIMATI, H. **Manual de fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v. 2, p. 642-664.
- ALVES, T. C. U.; DA SILVA, R. A.; BORGES, D. C.; MOTTA, L. C. C.; KOBAYASTI, L. 2011. Reação de cultivares de soja ao nematoide das lesões radiculares *Pratylenchus brachyurus*. **Biodiversidade**, 10(1).
- ARAUJO, F. F.; SILVA, J. F. V.; ARAUJO, A. S. F. 2002. Influência de *Bacillus subtilis* na eclosão, orientação e infecção de *Heterodera glycines* em soja. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 2, p. 197-203.
- ARAUJO, F. F. de; BRAGANTE, R. J.; BRAGANTE; C. E. 2012. Controle genético, químico e biológico de meloidoginose na cultura da soja. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 42, n. 2, p. 220-224.
- ASMUS, G. L.; ISHIMI, C. M. 2009. Flutuação populacional de *Rotylenchulus reniformis* em solo cultivado com algodoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 1, p. 51-57.
- ASMUS, G. L.; TELES, T. S.; ANSELMO, J.; ROSSO, G. T. 2012. Raças de *Heterodera glycines* na região Nordeste de Mato Grosso do Sul. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 37, n. 2, p. 146-148.
- BATISH, D.R.; ARORAA, K.; SINGHB H. P.; KOHLIA, R.K. 2007. Potential utilization of dried powder of *Tagetes minuta* as a natural herbicide for managing rice weeds. **Crop Protection**. 26: 566-571.
- BRAZ, G. B. P.; OLIVEIRA JR.; R. S. DE, CONSTANTIN; J.; RAIMONDI, R. T.; RIBEIRO, L. M.; GEMELLI, A.; TAKANO, H. K. 2016. Plantas daninhas como hospedeiras alternativas para *Pratylenchus brachyurus*. **Summa Phytopathologica**, 42(3), 233-238.

- BRASS, F. E. B.; VERONEZZE, N. C.; PACHECO, E.; BOSQUÊ, G. G. 2008. Aspectos biológicos do *Meloidogyne* spp. relevantes a cultura do café. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**, Garça, v. 7, n. 14, p. 1-7.
- BONETI, J. I. S; FERRAZ, S. 1981. Modificação do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de raízes de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**. 6 (3): 553.
- BORGES, F.G.; KUHN, O.J.; BATTISTUS, A.G.; ESTEVEZ, R.L.; COLTRO, S. 2013. Toxicidade de tratamentos alternativos e químicos *in vitro* sobre *Tubixaba tuxaua* e *Meloidogyne incognita*. **Scientia Agraria Paranaensis**, Marechal Cândido Rondon, v. 12, Suplemento, p. 440-449.
- BUENA, A. P.; DIÉZ-ROJO, M. A.; LÓPEZ-PÉREZ, J. A.; ROBERTSON, L.; ESCUER, M.; BELLO, A. 2008. Screening of *Tagetes patula* L. on diferent populations of *Meloidogyne*. **Crop Protection**. v. 27, p. 96-100.
- BYRD, D. W.; KIRKPATRICK, T.; BARKER, K. R. 1983. An improved technique for clearing and staining plant tissues for detection of nematodes. **Journal Nematology**. v. 15, p. 142-143.
- CARBONI, R. Z.; MAZZONETTO, F. 2013. Efeito do extrato aquoso de diferentes espécies vegetais no manejo de *Meloidogyne incognita* em tomateiro em ambiente protegido. **Revista Agroambiental**, v. 5, n. 2, p. 61-66,
- CASTAGNONE-SERENO, P. 2002. Genetic variability in parthenogenetic root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp., and their ability to overcome plant resistance genes. **Nematology**, v. 4, n. 5, p. 605-608.
- CASTILHO, P.; VOVLAS, N. 2007. Diagnosis and descriptions of *Pratylenchus* species. In: **Pratylenchus (Nematoda: Pratylenchidae): diagnosis, biology, pathogenicity and Management**. 1 ed. Córdoba, v. 6, cap. 4, p. 51-280.
- CARNEIRO, R. D. G.; ALMEIDA, M. R. A. 2001. Técnica de eletroforese usada nos estudos de enzimas dos nematoides de galhas para identificação de espécies. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 1, n. 25, p. 35-44.
- CARNEIRO, R. M. D. G.; COFCEWICZ, E.T. 2008. **Taxonomy of coffee-parasitic root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp.** In: SOUZA, R. M. Plant parasitic nematodes of coffee. Springer, Holand, 87-122.
- CARNEIRO, R. M. D. G.; ALMEIDA, M. R. A.; BRAGA, R. S.; ALMEIDA, C. D.; GIORIA, R. 2006. Primeiro registro de *Meloidogyne mayaguensis* parasitando plantas de tomate e pimentão resistentes à meloidoginose no estado de São Paulo. **Nematologia Brasileira**, 30(1), 81-86.
- CAMPOS, H.D.; CAMPOS, V.P.; POZZA, E.A. 2006. Efeito do tempo e da temperatura de incubação de juvenis do segundo estágio (J2) no teor de lipídio corporal e no parasitismo de *Meloidogyne javanica* em soja. **Fitopatologia Brasileira**. 31:387- 393.

- CANTERI, M. G.; ALTHAUS, R. A.; VIRGENS FILHO, J. S.; GIGLIOTI, E. A.; GODOY, C. V. 2001. SASM - Agri: Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scott - Knott, Tukey e Duncan. **Revista Brasileira de Agrocomputação**, V.1, N.2, p.18-24.
- CETINTAS, R.; YARBA, M.M. 2010. Nematicidal Effects of Five plants essential oils on the southern root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* race 2. **Journal of Animal and Veterinary Advances**. 9(2): 222-225.
- CHAMORRO, E. R.; BALLERINI, G.; SEQUEIRA, A. F.; VELASCO, G. 2008. Chemical composition of essential oil from *Tagetes minuta* L. leaves and flowers. **Journal Arg. Chemichal Soc.**, 96:80-86.
- CHITWOOD, D. J. 2002. Phytochemical based strategies for nematode control. **Annual Review of Phytopathology**, v. 40, p. 221-249.
- CLARKE, D. B. 2010. Glucosinolates, structures and analysis in food: critical review, Analytical Methods: advancing methods and applications. v. 2, n. 4, p. 310–325.
- CLIFF, G. M.; HIRSCHMANN, H. 1985. Evaluation of morphological variability in *Meloidogyne arenaria*. **Journal of Nematology**, v. 17, p. 445-459.
- COIMBRA, J. L.; SOARES, A. C. F.; GARRIDO, M. DA S.; SOUSA, C. DA S.; RIBEIRO, F. L. B. 2006. Toxicidade de extratos vegetais a *Scutellonema bradys*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 41(7), 1209-1211. <https://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2006000700020>
- COSTA, M.J.N.; CAMPOS, V.P.; OLIVEIRA, D.F.; PFENNING, L.H. 2001. Toxicidade de extratos vegetais e de esterco a *Meloidogyne incognita*. **Summa Phytopathologica** 27:245-250.
- CUNHA, F.R.; OLIVEIRA, D.F.; CAMPOS, V.P. 2003. Extratos vegetais com propriedades nematicidas e purificação do princípio ativo do extrato de *Leucaena leucocephala*. **Fitopatologia Brasileira**, 28 (4): 438-441.
- DECRAMER, W.; HUNT, D. J. 2006. Structure and classification. In: PERRY, R.N.; MOENS, M. E. D. **Plant nematology**. Wallingford; Oxfordshire: CAB International, p.3-32.
- DIAS-ARIEIRA, C.R.; FERRAZ, S.; FREITAS, L.G.; MIZOBUTSI, E.H. 2003. Avaliação de gramíneas forrageiras para o controle de *Meloidogyne incognita* e *M. javanica* (Nematoda). **Acta Scientiarum**, v.25, n.2, p.473-477.
- DIAS, W. P.; SILVA, J. F. V.; CARNEIRO, G. E. S.; GARCIA, A.; ARIAS, C. A. A. 2009. Nematóide de cisto da soja: Biologia e manejo pelo uso da resistência genética. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, n.1,v.33,p.1-16.
- DIAS, W. P.; GARCIA, A.; SILVA, J. F. V.; CARNEIRO, G. E. S. 2010. Nematóides em soja: identificação e controle – **Circular Técnica. Embrapa** 76: 1-8.

- DIAS, C.R.; SCHWAN, A.V.; EZEQUIEL, D.P.; SARMENTO, M.C.; FERRAZ, S. 2000. Efeito de extratos aquosos de plantas medicinais na sobrevivência de juvenis de *Meloidogyne incognita*. **Nematologia Brasileira**, Viçosa, v.24, n.2, p.203-210.
- EL-HAMAWI, M.H.; YOUSSEF, M.M.A.; ZAWAM, H.S. 2004. Management of *Meloidogyne incognita*, the root-knot nematode, on soybean as affected by marigold and sea ambrosia (damsisa) plants. **Journal of Pest Science**, 77: 95-98.
- EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. 2000. **Recomendações Técnicas para a Cultura da Soja na Região Central do Brasil**. Embrapa Soja, Londrina: Embrapa Soja/Fundação MT, 245p.
- EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. 2011. **Tecnologias de Produção de Soja Região Central do Brasil 2012 e 2013**. Londrina, Embrapa - Soja, 262 p.
- FARIA, C. M. O. R. et al. 2003. Mecanismos de ataque e defesa na interação nematóide-planta. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 11, p. 373-410.
- FERRAZ, S.; VALLE, L. A. C. 2001. **Controle de Fitonematoides por plantas antagonicas**. Editora UFV, Viçosa, 73p.
- FERRAZ, S.; FREITAS, L. G. 2004. **Use of antagonistic plants and natural products**. In: CHEN, Z.X.; CHEN, S.Y.; DICKSON, D.W. (Ed.) *Nematology: advances and perspectives*. Wallingford UK: CABI Publishing. p. 931-977.
- FERRAZ, L. C. C. B. 2006. O nematoide *Pratylenchus brachyurus* e a soja sob plantio direto. **Revista Plantio Direto**, Passo Fundo, v. 96, p. 23-27.
- FERRAZ, S.; FREITAS, L. G. de; LOPES, E. A.; DIAS- ARIEIRA, C. R. 2010. **Manejo sustentável de fitonematoide**. Viçosa: Editora UFV, 306 p.
- FERRAZ, L.C.C.B.; BROWN, D.J.F. 2016. **Nematologia de plantas: fundamentos e importância**. Brown (Orgs.). Manaus: NORMA EDITORA, 1 ed., 251 p.
- FILETI, M.S; SIGNORI, G.; BARBIERI, M.; GIROTO, M.; FELIPE, A.L.S.; JUNIOR, C.E.I.; SILVA, D.P. ; EPIPHANIO, P.D. ; LIMA, F.C.C. 2011. Controle de nematoides utilizando adubos verdes. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**. 10:1-8.
- FINIGUERRA, M. G.; IORI, R.; PALMIERI, S. 2001. Soluble and total myrosinase activity in defatted *Crambe abyssinica* Meal. **Journal Agriculture Food Chemistry**. v. 49, p. 840-845.
- FRANZENER, G., MARTINEZ-FRANZENER, A. S., STANGARLIN, J. R., FURLANETTO, C., SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. 2007. Proteção de tomateiro a *Meloidogyne incognita* pelo extrato aquoso de *Tagetes patula*. **Nematologia Brasileira** 31(1): 27-36.
- FREITAS, L. G. 2006. Manejo sustentável de Fitonematoides. **Fitopatologia Brasileira** 31(Supl.): 29-30.

- FREITAS, L. G.; LIMA, R. D'ARC; FERRAZ, S. 2009. **Introdução à Nematologia**. Cadernos didáticos, Viçosa: UFV, n. 58, 90p.
- FERREIRA, I.C.M.; SILVA, G.S.; NASCIMENTO, F.S. 2013. Efeito de extratos aquosos de espécies de Asteraceae sobre *Meloidogyne incognita*. **Summa Phytopathologica**, v.39, n.1, p.40-44.
- FREIRE, C.R.; DAVIDE, L.C.; CAMPOS, V.P.; SANTOS, C.D.; FREIRE, P.W. 2002. Cromossomos de três espécies brasileiras de *Meloidogyne*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, MG, v. 26, n. 5, p. 900-903.
- FURLANETO, C.; DAVI, J. J. S.; GRABOWSKI, M. M. S.; DIAS-ARIEIRA, C. R.; LAYTEN, N. A.; SEIFERT, K. E. 2008. Reação de adubos verdes de verão ao nematoide *Tubixaba tuxaua*. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 33, n. 6, p. 403-408.
- FURTADO, R. F.; LIMA, M. G. A.; NETO, M. A. 2005. Atividade larvicida de óleos essenciais contra *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). **Neotropical Entomology**, v. 34, n. 5, p. 843-847.
- GARDIANO, C.G.; MURAMOTTO, S.P.; KRZYZANOWSKI, A.A.; ALMEIDA, W.P.; SAAB, O.J.G.A. 2011. Efeito de extratos aquosos de espécies vegetais sobre a multiplicação de *Rotylenchulus reniformis* Linford & Oliveira. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.78, n.4, p.553-556.
- GARCÍA, D. A.; PERILLO, M. A.; ZYGADLO, J. A.; MARTIJENA, I. D. 1995. The essential oil from *Tagetes minuta* L. modulates the binding of [3H]flunitrazepam to crude membranes from chickbrain. **Lipids** 30(12):1105-10.
- GARCÍA, A. A.; CARRIL, E. PÉREZ-URRIA. 2009. Metabolismo secundário de plantas. Reduca (Biología). **Serie Fisiología Vegetal**, v. 2, n. 3, p. 119-145.
- GAOFU, Q.; SHIQUING, M.; FAYIN, Z.; ZHINIU, Y.; XIUYUN, Z. 2008. *In vitro* assessment of plant lectins with anti-pinewood nematode activity. **Journal of Invertebrate Pathology**, Maryland Heights, v.98, p.40-45.
- GARDIANO, C.G.; FERRAZ, S.; LOPES, E. A.; FERREIRA, P. A.; AMORA, D.X.; FREITAS, L.G. 2009. Avaliação de extratos aquosos de várias espécies vegetais, aplicados ao solo, sobre *Meloidogyne javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.30, v.3, p.551-556.
- GOULART, A. M. C. 2008. **Aspectos gerais sobre nematoides-das-lesões-radiculares (gênero *Pratylenchus*)**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 27 p. (Embrapa Cerrados. Documentos, 219).
- HAEGEMAN, A.; MANTELIN, S.; JONES, J. T.; GHEYSEN, G. 2012. Functional roles of effectors of plant-parasitic nematodes. **Gene**, v. 492(1): 19-31.
- HADJIAKHOONDI, A.; VATANDOOST, H.; KHANAVI, M.; ABAEE, M. R.; KARAMI, M. 2005. Biochemical Investigation of Different Extracts Sehrish and Larvicidal Activity of

Tagetes minuta L. on *Anopheles stephensi* larvae. **Iranian Journal Pharmaceut. Sci.** 1(2): 81- 84.

HAMBLEEN, M. L.; SLACK, D.A.; RIGGS, R.D. 1972. Temperature Effects on Penetration and Reproduction of Soybean-Cyst Nematode. **Phytopathology**, St Paul, v. 62, p. 762.

HATTORI, E. K. O. Asteraceae da estação ecológica do Panga, Uberlândia, Minas Gerais. Uberlândia: UFU, 2009. 169p. **Dissertação** (Mestrado em Ecologia e Conservação de Recursos Naturais), Instituto de Biologia, Universidade Federal de Uberlândia, 2009.

HENNING, A. A.; ALMEIDA, A. M. R.; GODOY, C. V. G.; SEIXAS, C. D. S; YORINORI, J. T.; COSTAMILAN, L. M.; FERREIRA, L. P.; MEYER, M. C.; SOARES, R. M.; DIAS, W. P. 2014. **Manual de identificação de doença de soja**. 5 Ed. Londrina: Embrapa Soja, 76p.

HOOKS, C. R. R.; WANG, K.-H.; PLOEG, A.; McSORLEY, R. 2010. Using marigold (*Tagetes* spp.) as a cover crop to protect crops from plant-parasitic nematodes. **Applied Soil Ecology**, v. 46, p. 307-320.

HULINA N. 2008. Wild Marigold *Tagetes minuta* L., New Weed on the Island of Hvar, and New Contribution to the Knowledge of its Distribution in Dalmatia (Croatia). **Agriculturae Conspectus Scientificus**, n. 73: 23-26.

HUNT, D. J.; HANDOO, Z. A. **Taxonomy, identification and principal species**. In: Root-knot Nematodes. PERRY, R. N.; MOENS, M.; STARR, J. L. (eds.). CABI International, Cambridge, MA, USA: 1-17, 2009.

HUSSEY, R.S.; BARKER, R.K. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. **Plant Disease**. Reporter, St. Paul, v.57, n.12, p. 1025-1028, 1973.

INOMOTO, M. M.; MOTTA, L. C. C.; BELLUTI, D. B.; MACHADO, A. C. Z. Reação de seis adubos verdes a *Meloidogyne javanica* e *Pratylenchus brachyurus*. **Nematologia Brasileira**. 30:39-44. 2006.

IRERI, L. N.; KONGORO, J.; NGURE, P. 2010. The potential of the extracts of *Tagetes minuta* Linnaeus (Asteraceae), *Acalypha fruticosa* Forssk (Euphorbiaceae) and *Tarchonanthus camphoratus* L. (Compositae) against *Phlebotomus duboscqi* Neveu Lemaire (Diptera: Psychodidae), the vector for *Leishmania major* Yakimoff and Schokhor. **Journal of Vector Borne Diseases**, v. 47, n. 3, p. 168-174.

JAVED, N.; GOWEN, S. R.; INAM-UL-HAQ, M.; ABDULLAH, K.; SHAHINA, F. 2008. Systemic and persistent effect of neem (*Azadirachta indica*) formulations against root-knot nematodes, *Meloidogyne javanica* and their storage life. **Crop Protection**, Reino Unido, v. 26, p. 911-916.

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

- JOHANSEN, D. A. 1940. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill Book, 523 p.
- JOURAND, P.; RAPIOR, S.; FAGRGETTE, M.; MATEILLE, T. 2004. Nematicidal effect of a leaf extract from *Crotalaria virgulata* subsp. *grantiana* on *Meloidogyne incognita* and its use to protect tomato roots. **Nematology**. 6:79-84
- LOAÍZA, J.; ESQUIVEL, A.; RODRIGUEZ, I.; CHAVARRÍA, P.L. 1996. **Potencial ovicida de extractos de *Tagetes filifolia* contra *Meloidogyne incognita***. In: X CONGRESSO NACIONAL AGRONÓMICO/III CONGRESSO DE FITOPATOLOGIA. Resúmen 181.
- LOPES, E. A.; FERRAZ, S.; FREITAS, L. G.; FERREIRA, P. A.; AMORA, D. X. 2005. Efeito de extratos aquosos de mucuna preta e de manjeriço sobre *Meloidogyne incognita* e *M. javanica*. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 29, n. 1, p. 67-74.
- LOPES, E.A.; FERRAZ, S.; FERREIRA, P.A.; FREITAS, L.G.; GARDIANO, C.G.; DHINGRA, O.D.; DALLEMOLE-GIARETTA, R. 2008. Efeito da incorporação da parte aérea de quatro espécies vegetais sobre *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v.32, n.1, p.76-80.
- LOPES, E. A.; FERRAZ, S.; FERREIRA, P. A.; FREITAS, L. G.; DALLEMOLE-GIARETTA, R. 2011. Soil amendment with chopped or ground dry leaves of six species of plants for the control of *Meloidogyne javanica* in tomato under greenhouse conditions. **Ciência Rural**, 41(6), 935-938.
- LORDELLO, L. G. E. 1988. **Nematoides das plantas cultivadas**. 6. ed. São Paulo: Nobel, 314 p.
- LOVATTO, P.B. 2012. As plantas bioativas como estratégia tecnológica a transição agroecológica na agricultura familiar. **Tese de Doutorado**. Universidade Federal de Pelotas. 390p.
- MATEUS, M. A. F.; FARIA, C. M. D. R.; BOTELHO, R. V.; DALLEMOLE-GIARETTA, R.; FERREIRA, S. G. M.; ZALUSKI, W. L. 2014. Extratos aquosos de plantas medicinais no controle de *Meloidogyne incognita* (Kofoid e White, 1919) Chitwood, 1949. **Bioscience Journal**, v. 30, n. 3, p. 730-736.
- MARTINS, M. DA C. B.; SANTOS, C. D. G. 2016. Ação de extratos de plantas medicinais sobre juvenis de *Meloidogyne incognita* raça 2. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 47, n. 1, p. 135-142.
- MOGHADDAM, M.; OMIDBIAGI, R.; SEFIDKON, F. 2007. Chemical composition of the essential oil of *Tagetes minuta* L. **Journal Essent Oil Res**; 19(1): 3-4.
- MOHN, T.; CUTTING, B.; ERNST, B.; HAMBURGER, M. 2007. Extraction and analysis of intact glucosinolates - A validated pressurized liquid extraction/liquid chromatography–mass spectrometry protocol for *Isatis tinctoria*, and qualitative analysis of other cruciferous plants. **Journal of Chromatography A**.v. 1166, p. 142-151.
- MOORE, W.F.; BOST, S.C.; BREWER, L.F.; DUNN, R.A. 1990. **Soybean Cyst Nematode**. American Soybean Association and the Southern Disease Works, 23p.

- MOREIRA, C. F. J.; FERREIRA, A. C. S. 2015. Controle alternativo de nematoide das galhas (*Meloidogyne enterolobii*) com cravo de defunto (*Tagetes patula* L.), em solo. **HOLO**, v. 1, p. 99-110. DOI:<http://dx.doi.org/10.15628/holos>.
- MOREIRA, F.J.C.; SANTOS, C.D.G.; INNECCO, R.; SILVA, G.S. 2015. Controle alternativo de nematoide das galhas (*Meloidogyne incognita*) raça 2, com óleos essenciais em solo. **Summa Phytopathologica**, v.41, n.3, p.207-213.
- MOURA, R. M. 1998. Reedição do relatório sobre a moléstia do cafeeiro na Província do Rio de Janeiro, 1987. **Museu Emílio Augusto Goeldi**. Recife: UFRPE, 121 p.
- MOYO, B.; MASIKA, P.J. 2009. Tick control methods used by resource-limited farmers and the effect of ticks in cattle in rural areas of the Eastern Cape Province, South Africa. **Tropical Animal Health Prod**; 41(4): 517-523.
- NAQINZHAD, A.; S. S. MEHRVARZ. 2007. Some new records for Iran and flora Iranica area collected from Boujagh National Park, N. Iran. **Iranica Journal Bot**. 13(2): 112- 119.
- NATARAJAN, N; CORKB, A.; BOOMATHIA, N.; PANDIA, R.; VELAVANA, S.; DHAKSHNAMOORTHY, G. 2006. Cold aqueous extracts of African marigold, *Tagetes erecta* for control tomato root knot nematode, *Meloidogyne incognita*. **Crop Protection**, v. 25, p. 1210- 1213.
- NEVES, W. S.; FREITAS, L. G.; DALLEMOLE-GIARETTA, R.; FABRY, C.F.S.; COUTINHO, M. M.; DHINGRA, O. D.; FERRAZ, S.; DEMUNER, J. A. 2005. Atividade de extratos de alho (*Allium sativum*), mostarda (*Brassica campestris*) e pimenta malagueta (*Capsicum frutescens*) sobre eclosão de juvenis de *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, v. 29, p. 273-278.
- NEVES, W. S.; FREITAS, L. G.; LOPES, E. A.; COUTINHO, M. M.; DALLEMOLE-GIARETTA, R.; FERRAZ, S. 2008. Efeito, *in vitro*, do extrato de sementes de mamão sobre a eclosão e juvenis de *Meloidogyne* spp. **Revista Trópica - Ciências Agrárias e Biológicas**. v. 2, n. 3, p. 9-14.
- NICOL, J. M.; TURNER, S. J.; COYNE, D. L.; NIJS, L. DEN.; HOCKLAND, S. 2011. Current Nematode Threats to World Agriculture. In: JONES, J.; GHEYSEN, G.; FENOLL, C. **Genomics and Molecular Genetics of Plant-Nematode Interactions**. New York: Springer, p. 27-49.
- NICOLOSO, F. T.; FORTUNATO, R. P.; FOGAÇA, M. A. F. 1999. Influência da posição da estaca no ramo sobre o enraizamento de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen em dois substratos. **Ciência Rural**, v. 29, n. 2, p. 277-283.
- O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; MCCULLY, M. E. 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. **O Protoplasma**, Vienna, v. 59, n. 2, p. 368-373.
- OLABIYI, T. I. 2008. Pathogenicity study and nematotoxic properties of some plant extracts on the root-knot nematode pest of tomato, *Lycopersicon esculentum* (L.). **Plant Pathology Journal**, Inglaterra, v. 7, n. 1, p. 45-49.

- OLIVEIRA, S. A. de; TOMAZINI, M.; CALDAS, P. E. A.; OLIVEIRA, D. M. de; OLIVEIRAJÚNIOR, V. F. de; RODRIGUES, E. M.; SILVA JÚNIOR, E. F. da; COSTA, F. R. da. 2007. Germinação de sementes de *Tagetes erecta*. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v.13, p. 1594-1597.
- OOSTENBRINK, M. 1966. Major characteristics of the relation between nematodes and plants. **Mendelingen Landbouwhogeschool**, Wageningen, v.66, n.4, p. 1- 46.
- OSMAN, H.A.; AL-GINDI, A.Y.; TAHA, H. S.; AL-KAZZAZ, A. A.; YOUSSEF, M. M.A.; AMEEN, H. H.; LASHEIN, A. M. 2008. Biological control of root knot nematode *Meloidogyne incognita*: Evaluation of the nematicidal effects of *Tagetes erecta* tissue culture under laboratory and greenhouse conditions. **Egypt Journal Phytopathology** n. 35(1- 2): p. 33-44.
- PIMENTEL, D; BURGESS, M. 2014. Environmental and economic costs of application of pesticides primarily in the United States. In: PIMENTEL, D; PESHIN, R. **Integrated Pest management**. New York: Springer, v. 3, p 47-66.
- PANDEY, R.; KALRA, A.; TANDON, S.; MEHROTRA, N.; SINGH, H.N.; KUMAR, S. 2002. Essential oils as potent sources of nematicidal compounds. **Journal of Phytopathology**, v. 148, p. 501-502.
- PENÃ, R.P. 2000. **A nutrição das plantas e seus efeitos na sanidade vegetal**. Agricultura Biodinâmica, v.17, p.26-30.
- PÉREZ, M. P.; NAVAS-CORTÉS, J. A.; PASCUAL-VILLALOBOS, M. J.; CASTILHO, P. 2003. Nematicidal activity of essential oils and organic amendments from Asteraceae against root-knot nematodes. **Plant Pathology**, v. 52, p. 395-401.
- PLOEG, A.T. 2000. Effects of amending soil with *Tagetes patula* cv. Single Gold on *Meloidogyne incognita* infestation of tomato. **Nematology**, v.2, p.489.
- PUDASAINI, M.P.; SCHOMAKER, C.H.; BEEN, T.H.; MOENS, M. 2006. The vertical distribution of the plant-parasitic nematode, *Pratylenchus penetrans* , under four field crops. **Phytopathology**. v. 96, p.226–233.
- RESTELLO, R. M.; MENEGATT, C.; MOSSI, A. J. 2009. Efeito do óleo essencial de *Tagetes patula* L. (Asteraceae) sobre *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera, Curculionidae). **Revista Brasileira de Entomologia** 53: 304–307.
- REYNOLDS, L.B.; POTTER, J.W.; BALL-COELHO, B.R. 2000. Crop rotation with *Tagetes* sp. is an alternative chemical fumigation for control of root-lesion nematodes. **Agronomy Journal**, v.92, n.5, p.957-966.
- RICHTER, J.M. 2011. Investigation into alternative wheat aphid control strategies for emerging farmers. **Dissertation (Magister)**. The Faculty of Natural and Agricultural Sciences Department of Zoology and Entomology (Entomology Division), University of the Free State, Bloemfontein, South Africa.

ROCA, L. B.; GUZMÁN, B. H.; GÓMEZ, A. M. B. 2009. Caracterización física y tamizaje fitoquímico de la especie *Tagetes erecta* Lin. **Revista Cubana de Química**, v. 21, n. 2, p. 10-15.

R CORE TEAM (2017). **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL: <https://www.R-project.org/>.

ROESE, A.D.; ROMANI, R.D.; FURLANETTO, C.; STANGARLIN, J.R.; PORTZ, R.L. 2001. Levantamento de doenças na cultura da soja [*Glycine max* (L.) Merrill] em municípios da região Oeste do Paraná. **Acta Scientiarum**, v.23, p.1293-1297.

RUPPERT, E. E.; FOX, R. S.; BARNES, R. D. 2005. **Zoologia dos invertebrados: uma abordagem funcional-evolutiva**. 7ª ed. São Paulo: Roca, 1145 p.

SADIA, S.; KHALID, S.; QURESHI, R.; BAJWA, A. A. 2013. *Tagetes minuta*, a useful underutilized plant of family asteraceae: a review. **Pak. Journal Weed Science Res.**, 19(2): 179-189.

SCHIDLOWSKI, E. N.; SANTIAGO, D. C.; ARIEIRA, G. O. 2016. Efeito de extratos vegetais aquosos sobre *Heterodera glycines* raça 1. **Nematropica**, v. 46, p. 81-84.

SILVA, G. S.; PEREIRA, A. L.; BASTOS, C. N.; MENDONÇA, V. C. M. 2006. Efeito da incorporação de resíduos foliares de *Piper aduncum* ao solo sobre o parasitismo de *Meloidogyne incognita* em tomateiro. **Nematologia Brasileira**, v. 30, n. 2, p. 219-222.

SILVA, J. C. T.; OLIVEIRA, R. D. L.; JHAM, G. N.; AGUIAR, N. D. C. 2008. Effect of neem seed extracts on the development of the soybean cysts nematode. **Tropical Plant Pathology**, v. 33, n. 3, p. 171-179.

SILVA, G. S. 2012. Métodos alternativos de controle de fitonematóides. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 19, p. 81-152.

SCHIAVON, D. B. A.; SCHUCH, L. F. D.; FACCIN, A.; GONÇALVES, C. L.; VIEIRA, V. S. C.; GONÇALVES, H. P. 2015. Revisão Sistemática de *Tagetes minuta* L.(asteraceae): uso popular, composição química e atividade biológica. **Science and Animal Health**. Issn: 2318-356x v.3 n.2 p. 192-208.

SCHMITT, D. P.; RIGGS, R. D. 1991. Influence of Selected Plant Species on Hatching of Eggs and Development of Juveniles of *Heterodera glycines*. **Journal of Nematology**, Lawrence, v.23, n.1, p.1-6.

SCRAMIN, S.; FERNANDES, L. M. S.; SILVA, H. P.; YAHN, C. 1987. Atividade nematicida de extratos vegetais sobre *Meloidogyne incognita*. **Fitopatologia Brasileira**, v.12, n.2, p.151.

SHAHZADI, I.; HASSAN, A.; KHAN, U. W.; SHAH, M. M. 2010. Evaluating biological activities of the seed extracts from *Tagetes minuta* L. found in Northern Pakistan. **Journal of Medicinal Plants Research**. v. 4(20), pp. 2108-2112.

- SIDDIQUI, M. A.; ALAM, M. M. 1987. Control of plant parasitic nematodes by intercropping with *Tagetes minuta*. **Nematologia Mediterrânea**, v. 15, n. 2, p. 205-211.
- SIGNORINI, S. R.; MANNINO, A.; NAJJAR JR., R.G.; FRIEDRICHS, M.A.M.; CAI, W. J.; SALISBURY, J.; WANG, Z.A.; THOMAS, H.; SHADWICK, E. 2013. Surface ocean CO₂ seasonality and sea air CO₂ flux estimates for the North American east coast. **Journal of Geophysical Research**, v. 118 (5), p. 439-460.
- SOUZA, C.A.S.; AVANCINI, C.A.M.; WIEST, J.M. 2000. Atividade antimicrobiana de *Tagetes minuta* L. – Compositae (Chinchilho) frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, ano 6, n. 37.
- STANGARLIN, J. R.; KUHN, O. J.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. 2008. Controle de doenças de plantas por extratos de origem vegetal. In: LUZ, W.C. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 16, p. 265-304.
- STEFFEN, R.B.; ANTONIOLLI, Z.I.; BOSENBECKER, V.K.; STEFFEN, G.P.K.; LUPATINI, M.; CAMPOS, A.D.; GOMES, C.B. 2008. Avaliação de óleos essenciais de plantas medicinais no controle de *Meloidogyne graminicola* em arroz irrigado. **Nematologia Brasileira**, v. 32, n. 2, p. 126-134.
- TIHOHOD, D. 2000. **Nematologia agrícola aplicada**. Jaboticabal: FUNEP, 372 p. 49
- TIHOHOD, D.; SANTOS, J. M. 1993. *Heterodera glycines*: Novo Nematóide da Soja no Brasil. Detecção e Medidas Preventivas. FUNEP, **Boletim Técnico**, n. 4, Jaboticabal, 23 p.
- TOMOVA, B.S; WATERHOUSE, J.S; DOBERSKI J. 2005. The effect of fractionated *Tagetes* oil volatiles on aphid reproduction. **Entomol Exp Applied.**; 115(1): 153-159.
- VALLE, L. A. C.; FERRAZ, S.; TEIXEIRA, D. A. 1997. Estimulo á eclosão de juvenis, penetração e desenvolvimento de *Heterodera glycines* nas raízes de mucuna preta (*Mucuna aterrima*) e guandu (*Cajanus cajan*). **Nematologia Brasileira**, 21(1): p. 67-83.
- VIEIRA, P. C.; MAFEZOLI, J.; BAVATTI, M. W. 2001. **Inseticidas de Origem Vegetal**. In: FERREIRA, J. T. B; CORRÊA, A. G.; VIEIRA, P. C. (Ed.). Produtos naturais no controle de insetos. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos.
- ZHAO, X.; SCHMITT, M.; HAWES, C. M. 2000. Species-dependent effects of border cell and root tip exudates on nematodes behavior. **Phytopathology**, St. Paul, v. 90, n. 11, p. 1239-1245.
- ZAMBOLIM, L.; COSTA, H.; JESUS JUNIOR, W. C. 2007. **Manejo integrado das doenças de hortaliças**. In: Zambolim, L.; Lopes CA., Picanço, MC., Costa H. Manejo integrado de doenças e pragas de hortaliças. Viçosa: Editora UFV, Cap. 07, p. 225-318.
- WEAVER, D.B.; RODRIGUEZ-KÁBANA, R.; GARDEN, E.L. 1998. Velvetbean and Bahiagrass as Rotation Crops for Management of *Meloidogyne* sp. and *Heterodera glycines* in Soybean. **Journal of Nematology**, v. 30, suplemento, n. 4, p. 563-568.

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

YOUNG, L. D. Epiphytology and Life Cycle. In: RIGGS, R.D. & WRATHER, J.A. 1992. (Eds.). **Biology and Management of the Soybean Cyst Nematode**. St. Paul, APS, p. 27-36.

ZASADA, I. A.; FERRIS, H. 2003. Sensitivity of *Meloidogyne javanica* and *Tylenchulus semipenetrans* to isothiocyanates in laboratory assays. **Phytopathology**. v.93, n. 6, p. 747-750.