

**AMANDA PEREIRA HONÓRIO**

**EFEITO DE EXTRATOS DE *Crotalaria juncea* E *C. ochroleuca* SOBRE  
*Meloidogyne javanica***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientadora: Dalila Sêni Buonicontro

Coorientadores: Eduardo V. Vieira Varejão  
Franklin Jackson Machado

**VIÇOSA – MINAS GERAIS  
2021**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

H774e  
2021 Honório, Amanda Pereira, 1992-  
Efeito de extratos de *Crotalaria juncea* e *C. ochroleuca*  
sobre *Meloidogyne javanica* / Amanda Pereira Honório. –  
Viçosa, MG, 2021.

1 dissertação eletrônica (39 f.): il. (algumas color.).

Inclui apêndice.

Orientador: Dalila Sêni Buonicontro.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 30-36.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2021.095>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Nematóide-das-galhas - Controle. 2. Nematoda em  
plantas. 3. Plantas antagonicas. I. Universidade Federal de  
Viçosa. Departamento de Fitopatologia. Programa de  
Pós-Graduação em Fitopatologia. II. Título.

CDD 22. ed. 632.6257

Bibliotecário(a) responsável: Alice Regina Pinto CRB6 2523

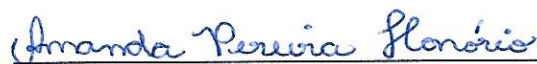
AMANDA PEREIRA HONÓRIO

EFEITO DE EXTRATOS DE *Crotalaria juncea* E *C. ochroleuca* SOBRE  
*Meloidogyne javanica*

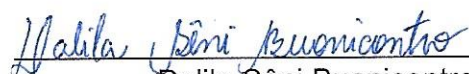
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 16 de julho de 2021.

Assentimento:



Amanda Pereira Honório  
Autora



Dalila Sêni Buonicontro  
Orientadora

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus por nunca me abandonar nessa caminhada, me dando força, coragem e saúde.

Aos meus familiares por me apoiarem, principalmente minha Tia Neusa e meu Tio João, que desde o começo acreditaram no meu sonho de realizar a pós-graduação em fitopatologia.

Aos meus amigos do Departamento de Fitopatologia que sempre estiveram ao meu lado, e são minha família em Viçosa.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Fitopatologia, pela oportunidade de realizar esta pesquisa. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa de Mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por disponibilizar o recurso financeiro (CAPES-Proex) necessário para a realização do trabalho.

À minha orientadora Dalila, pela orientação, disponibilidade, paciência, atenção, motivação, inspiração e ensinamentos. Aos meus coorientadores Eduardo e Franklin pela ajuda, atenção e paciência.

Aos membros da banca examinadora pela disponibilidade e contribuições para o presente trabalho.

Aos professores Antônio e Eduardo pela parceria. À Daiane, Jilma e Ueveton pela síntese dos extratos e por me auxiliarem em minhas dúvidas.

Ao professor Leandro por disponibilizar seu laboratório (Bionema) para condução de parte dos experimentos.

Aos meus colegas de laboratório, Marcela, Andressa e Claudio, pela ajuda, apoio e amizade.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da UFV que contribuíram para a minha formação, e funcionários do Departamento de Fitopatologia, por toda informação e serviços prestados, em especial à Cássia, Guilherme e Sara.

## RESUMO

HONÓRIO, Amanda Pereira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2021. **Efeito de extratos de *Crotalaria juncea* e *C. ochroleuca* sobre *Meloidogyne javanica*.** Orientadora: Dalila Sêni Buonicontro. Coorientadores: Eduardo Vinícius Vieira Varejão e Franklin Jackson Machado.

Os fitonematoides acarretam prejuízos à agricultura. Os extratos vegetais têm sido estudados com o objetivo de se identificar compostos nematicidas. Com a identificação desses compostos, será possível chegar a formulações comerciais à base de extratos vegetais. Assim, compostos nematicidas oriundos de plantas podem tornar-se ferramentas no manejo de fitonematoides. Desse modo, os objetivos do trabalho foram avaliar se os extratos vegetais obtidos de *Crotalaria juncea* e *C. ochroleuca*, apresentam potencial nematicida e avaliar se o efeito da técnica de cultivo do material vegetal afeta tal efeito, comparando extratos provenientes de micropropagação *versus* cultivo convencional. Foram testados extratos metanólicos de raízes de *C. juncea* obtidas sob cultivo convencional (ERCJ\_CC), de raízes de *C. juncea* micropropagadas (ERCJ\_MP), de calos de *C. juncea* micropropagadas (ECCJ\_MP) e calos de *C. ochroleuca* micropropagadas (ECCO\_MP), e extrato de meio de cultivo dos exsudatos radiculares de *C. juncea* micropropagadas (EERCJ\_MP). Os testes consistiram em avaliar os efeitos *in vitro* desses extratos sobre a mortalidade e eclosão de juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne javanica*, e *in vivo* sobre o parasitismo dos J2. Nos testes para avaliar o efeito sobre a mortalidade, os J2 foram tratados com os diferentes extratos nas seguintes concentrações: 0, 100, 200, 300, 400 e 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , e a porcentagem de juvenis mortos foi quantificada em 24 h, 48 h e 72 h. A partir desses resultados foram calculadas as concentrações letais  $CL_{50}$ ,  $CL_{90}$  e  $CL_{95}$ , após 72 h. Já nos testes de eclosão, os ovos foram tratados com cada extrato, exceto com ERCJ\_CC, nas  $CL_{95}$  aos J2, e quantificou-se o número de J2 eclodidos ao longo de dez dias. Para avaliar o efeito dos extratos sobre o parasitismo de *M. javanica*, três ensaios independentes foram montados. Para isso, mudas de tomateiro foram inoculadas com J2, posteriormente, foram aplicados ECCO\_MP e ECCJ\_MP em suas  $CL_{95}$  (ECCO\_MP\_1 e ECCJ\_MP\_1) e em concentrações quatro vezes maiores que as  $CL_{95}$  (ECCO\_MP\_2 e ECCJ\_MP\_2). No primeiro ensaio, quantificou-se o número de J2 que penetraram nas raízes aos 4 dias após inoculação (DAI). No segundo ensaio, aos 20 DAI foram

contadas as fêmeas no interior das galhas. E no terceiro ensaio, foram contados, aos 30 DAI, o número de galhas, massas de ovos e ovos. No teste de mortalidade, ERCJ\_CC apresentou baixa atividade nematicida, enquanto ERCJ\_MP exibiu alta atividade nematicida; ECCO\_MP e ECCJ\_MP foram os extratos mais tóxicos ao nematoide, apresentando CL<sub>95</sub> de 157, 65 e 189,81 µg mL<sup>-1</sup>, depois de 72 h de incubação. Em relação aos efeitos na eclosão de juvenis, todos os extratos levaram a uma supressão na eclosão de pelo menos 82,30%. Nos testes de parasitismo, ECCO\_MP\_1 reduziu em 54,90% a taxa de penetração; ECCO\_MP\_1 e ECCJ\_MP\_2, reduziram o número de galhas em 18,73 e 23,80%; ECCJ\_MP\_2 reduziu o número massas de ovos e ovos em 23,37 e 49,31%. Conclui-se que todos os extratos de *Crotalaria* spp. apresentaram atividade nematicida, exceto ERCJ\_CC, evidenciando que a técnica de cultivo do material vegetal afetou o efeito nematicida. ECCO\_MP e ECCJ\_MP foram os extratos mais promissores.

Palavras-chave: Controle alternativo. Fitonematoides. Plantas antagonistas.

## ABSTRACT

HONÓRIO, Amanda Pereira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2021. **Effect of extracts of *Crotalaria juncea* and *C. ochroleuca* on *Meloidogyne javanica*.** Advisor: Dalila Sêni Buonicontro. Co-advisors: Eduardo Vinícius Vieira Varejão and Franklin Jackson Machado.

Plant-parasitic nematodes cause damage to agriculture. Plant extracts have been studied in order to identify nematicide compounds. With the identification of these compounds, it will be possible to produce commercial formulations based on plant extracts. Thus, nematicide compounds from plants can become tools in the management of plant-parasitic nematodes. Therefore, the objectives of the study were to evaluate whether the plant extracts obtained from *Crotalaria juncea* and *C. ochroleuca* have nematicidal potential and to evaluate whether the effect of the plant material cultivation technique affects the nematicidal action, comparing extract from micropropagation versus conventional cultivation. Methanolic extracts of roots of *C. juncea* obtained under conventional cultivation (ERCJ\_CC), roots of *C. juncea* micropropagated (ERCJ\_MP), callus of *C. juncea* micropropagated (ECCJ\_MP) and callus of *C. ochroleuca* micropropagated (ECCO\_MP), and extract of a culture of root exudates of *C. juncea* micropropagated (EERCJ\_MP). The tests consisted of evaluating the in vitro effects of these extracts on mortality and hatching of second-stage juveniles (J2) of *Meloidogyne javanica*, and in vivo on J2 parasitism. Tests that evaluate the effect on mortality, J2 were treated with the different extracts at the following concentrations: 0, 100, 200, 300, 400, and 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , and the percentage of dead juveniles was quantified in 24 h, 48 h, and 72 h. From these results, lethal concentrations  $\text{LC}_{50}$ ,  $\text{LC}_{90}$ , and  $\text{LC}_{95}$  were calculated after 72 h. For the hatching tests, the eggs were treated with each extract, except with ERCJ\_CC, in  $\text{LC}_{95}$  to J2, and the number of J2 hatched over ten days was quantified. To evaluate the effect of extracts on *M. javanica* parasitism, three independent experiments were installed. For this, tomato seedlings were inoculated with J2, then, ECCO\_MP and ECCJ\_MP were applied in their  $\text{LC}_{95}$  (ECCO\_MP\_1 and ECCJ\_MP\_1) and in concentrations four times higher than  $\text{LC}_{95}$  (ECCO\_MP\_2 and ECCJ\_MP\_2). In the first experiment, the number of J2 that penetrated the roots at 4 days after inoculation (DAI) was quantified. In the second experiment, females were counted inside the galls at 20 DAI. And in the third experiment, the number of galls, eggs masses, and eggs were counted at 30 DAI. In

the mortality test, ERCJ\_CC has low nematicidal activity, while ERCJ\_MP exhibited high nematicidal activity; ECCO\_MP and ECCJ\_MP were the most toxic extracts to the nematode, presenting LC<sub>95</sub> of 157, 65, and 189,81 µg mL<sup>-1</sup>, after 72 h of incubation. Regarding the effects on the hatching of juveniles, all extracts led to a suppression of hatching of at least 82.30%. In the parasitism tests ECCO\_MP\_1 reduced the penetration rate by 54.90%; ECCO\_MP\_1 and ECCJ\_MP\_2, reduced the number of galls by 18.73 and 23.80%; ECCJ\_MP\_2 reduced the number of egg masses and eggs by 23.37 and 49.31%. Therefore, it is concluded that all extracts of *Crotalaria* spp. presented nematicidal activity, except for ERCJ\_CC, evidencing that the plant material cultivation technique affected the nematicide effect. ECCO\_MP and ECCJ\_MP were the most promising extracts.

Keywords: Alternative control. Phytonematodes. Antagonistic plants.

## SUMÁRIO

1. Introdução .....	9
2. Material e Métodos .....	12
2.1) Obtenção, preparo dos extratos vegetais e triagem fitoquímica .....	12
2.1.1) Obtenção do material vegetal .....	12
2.1.2) Micropropagação de <i>C. juncea</i> e <i>C. ochroleuca</i> .....	12
2.1.1.2.1) Cultivo convencional de <i>C. juncea</i> .....	13
2.1.2) Preparo dos extratos vegetais de <i>C. juncea</i> e <i>C. ochroleuca</i> .....	13
2.1.3) Triagem fitoquímica.....	13
2.2) Obtenção e multiplicação do inóculo de <i>M. javanica</i> .....	14
2.3) Avaliação do efeito nematicida: ensaios <i>in vitro</i> .....	15
2.3.1) Efeito dos extratos na mortalidade de <i>M. javanica</i> .....	15
2.3.2) Efeito dos extratos na inibição da eclosão de J2 de <i>M. javanica</i> .....	16
2.4) Avaliação do efeito nematicida: ensaios <i>in vivo</i> .....	16
2.4.1) Efeito dos extratos sobre o parasitismo de <i>M. javanica</i> em tomateiro .....	16
3. Análise estatística .....	18
4. Resultados e Discussão .....	18
4.1) Triagem Fitoquímica .....	18
4.2) Atividade nematicida dos extratos de <i>Crotalaria</i> spp.: ensaios <i>in vitro</i> .....	18
4.2.1) Teste de mortalidade de <i>M. javanica</i> .....	18
4.2.2) Efeito dos extratos na inibição de eclosão dos J2 de <i>M. javanica</i> .....	22
4.3) Ensaios <i>in vivo</i> .....	24
4.3.1) Efeito dos extratos sobre o parasitismo de <i>M. javanica</i> em tomateiro .....	24
5. Conclusão .....	30
6. Referências .....	30
Apêndice A.....	37

## 1.Introdução

Os fitonematoides acarretam grandes prejuízos à agricultura mundial, que excedem 80 bilhões de dólares ao ano (FERRAZ e BROWN, 2016). O gênero *Meloidogyne* spp., denominados nematoides-das-galhas-radiculares, constitui-se no grupo de nematoides mais prejudiciais. Eles são economicamente importantes para a agricultura no Brasil e no mundo, visto que, afetam diversas culturas agrícolas e estão amplamente distribuídos geograficamente (CARNEIRO et al., 2016).

Os fitonematoides não podem ser eliminados de áreas já infestadas, porque isso demandaria a remoção completa do solo da área, uma medida impraticável (FERRAZ e BROWN, 2016). Desse modo, o ideal é a adoção do manejo integrado, que leve a redução dos níveis populacionais destes patógenos, mantendo-os em níveis que não ocasionem altos danos as culturas, ou seja, abaixo do limiar de dano econômico (FERRAZ e BROWN, 2016).

Os extratos vegetais podem agregar às medidas de controle desses patógenos. Assim, extratos obtidos a partir do tecido de plantas antagonistas a nematoides têm sido estudados e caracterizados com o objetivo de se identificar quais são os compostos presentes nessas plantas com ações nematotóxicas (FERRAZ et al., 2010). A busca por novas moléculas nematicidas é uma demanda do mercado agrícola, devido as grandes perdas ocasionadas por esses patógenos (BORGES et al., 2017). Com a identificação desses compostos, será possível chegar a formulações comerciais à base de extratos vegetais (FERRAZ et al., 2010). Esses nematicidas naturais exibem vantagens quando comparado com os sintéticos como, gerar moléculas bioativas e biodegradáveis, mais eficazes contra doenças e pragas e redução ou nenhuma toxicidade ao meio ambiente e saúde humana (NTALLI e CABONI, 2012). Em adição, exibem alta diversidade de componentes químicos que podem expressar um amplo modo de ação, além de serem oriundos de recursos renováveis (CHITWOOD, 2002; FERRAZ et al., 2010).

A maioria das pesquisas realizadas até agora concentram-se em investigar o efeito de extratos vegetais ou óleos essenciais sobre fitonematoides. No entanto, moléculas com ação nematicida já foram identificadas e apresentam potencial para ser utilizadas na agricultura, como: triacontan-1-ol, carvona, ácido butírico, ácido oleico, alicina, isotiocianato de alila,  $\alpha$ -terpineol,  $\alpha$ -tertienil, ascaridol, cineol, citroneol, durrina, eugenol, geraniol, L-Dopa, linalol, linamarina, mentol, monocrotalina, ricina

timol, tetracosanato de triacontila, faltarindiol, punicalagina, anigofurone, furfural, pulegona e dulpracina (CHITWOOD, 2002; NTALLI et al., 2010; WEN et al., 2013; HÖLSCHER et al., 2014; ABDELNABBY et al., 2016; LIU et al., 2016; GUO et al., 2017).

A aplicação de produtos à base de plantas em condições de campo nem sempre é eficiente, devido ao processo de volatilização e degradação dos compostos ativos (BORGES et al., 2018). Em vista disso, o uso de nematicidas botânicos nas lavouras ainda é limitado, devido à necessidade de se buscar tecnologias de aplicação que diminuam as perdas dos compostos ativos quando aplicados ao solo (BORGES et al., 2017).

Contudo, alguns nematicidas botânicos produzidos a partir de plantas já estão disponíveis em alguns países, principalmente nos Estados Unidos (FERRAZ et al., 2010). Alguns exemplos desses nematicidas são: QL Agri® à base de extrato de *Quillaja saponaria* (BASF, 2021), Azamax® à base de azadiractina, composto derivado de *Azadirachta indica* (ADAPAR, 2021), Dazitol® à base de capsaicina composto derivado de *Capsicum* spp. e isotiocianato de alila derivado de *Brassica nigra* (ADAMA, 2021) e Nematimax® à base de flavonoide glicosídico cítrico (MAXEEMA BIOTECH, 2021). Recentemente no Brasil, foi registrado o nematicida Vigga® à base de *Allium sativum*, recomendado para *M. incognita*, *Pratylenchus zae* e *P. brachyurus*, para culturas do tomateiro, soja e cana-de-açúcar (AGROFIT, 2021).

Os extratos vegetais e óleos essenciais estudados com ação nematicida são provenientes de plantas tais como: *Mucuna pruriens* (mucuna-preta); *Tagetes* spp. (cravo-de-defunto); *Crotalaria* spp. (sendo a *C. juncea* a mais estudada); *Azadirachta indica* A. juss (nim); diversas plantas da família Poaceae; *Ricinus communis* (mamona); brássicas e algumas plantas com características medicinais e aromáticas (FERRAZ et al., 2010).

Plantas do gênero *Crotalaria*, abrigadas na família Fabaceae, são conhecidas por serem plantas antagonistas a fitonematoides. Essas plantas podem ser não-hospedeiras ou más-hospedeiras de fitonematoides, elevar a população de microrganismos antagonistas, além de produzirem compostos tóxicos a esses patógenos (WANG et al., 2002). Há diversos trabalhos utilizando espécies de *Crotalaria* spp. no manejo de nematoides, porém como adubo verde e em sucessão de culturas (WANG; MCSORLEY; GALLAHER, 2004; CURTO et al., 2015; SILVA et

al., 2018; NASCIMENTO et al., 2020). Entretanto, há menos trabalhos investigando a ação nematicida de extratos obtidos a partir dessas plantas.

Na literatura é relatada a presença de alcaloides pirrolizidínicos em *Crotalaria* spp., que são metabólitos secundários com atividade nematicida (THODEN; BOPPRÉ; HALLMANN, 2009; THODEN e BOPPRÉ, 2010, COLEGATE et al., 2012; SCUPINARI et al., 2020). De acordo com Pilbeam e Lyon-Joyce (1983) a monocrotalina é um dos alcaloides em maior abundância em espécies de crotalária. Porém, na maioria das pesquisas realizadas investigando-se o efeito dos extratos de *Crotalaria* spp. sobre fitonematoides, não houve a caracterização dos compostos presentes nos mesmos. Contudo, os resultados apresentados nestes trabalhos evidenciam que deve haver moléculas bioativas nessas plantas passíveis de serem exploradas no manejo desses patógenos (JOURAND et al., 2004a; JOURAND et al., 2004b; ALMEIDA et al., 2008; BORGES et al., 2013).

Os metabólitos secundários encontrados em plantas formam complexos que geralmente atuam em alvos múltiplos ou em novos alvos. Assim, reduzem a probabilidade de desenvolvimento de resistência por pragas (ISMAN, 2000; ISMAN, 2006). Diferentes moléculas podem interferir diretamente na biologia e comportamento dos fitonematoides (CHITWOOD, 2002; CABONI e NTALLI, 2014). Ademais, elas podem influenciar nas interações desses patógenos com a microfauna do solo (NTALLI et al., 2020). Todavia, os metabólitos secundários, que em geral apresentam a atividade nematicida encontrada nos extratos, caracterizam uma interface química entre as plantas e o ambiente onde elas estão inseridas, portanto, sua síntese é frequentemente alterada por condições ambientais (KUTCHAN, 2001). Os fatores que podem ocasionar essas alterações são: sazonalidade, ritmo circadiano, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, nutrientes, altitude, poluição atmosférica e indução por estímulos mecânicos ou ataques de patógenos (GOBBONETO e LOPES, 2006).

Diante disso, pesquisas devem ser realizadas para descoberta e caracterização de compostos estáveis com ação nematicida para o desenvolvimento de novas formulações. Desse modo, o objetivo do presente trabalho foi avaliar se os extratos vegetais obtidos a partir de *C. juncea* e *C. ochroleuca*, apresentam potencial nematicida e avaliar se o efeito da técnica de cultivo do material vegetal afeta o efeito nematicida, comparando extrato oriundo de micropropagação *versus* cultivo convencional.

## 2. Material e Métodos

### 2.1) Obtenção, preparo dos extratos vegetais e triagem fitoquímica

#### 2.1.1) Obtenção do material vegetal

As sementes de *C. juncea* e *C. ochroleuca* foram adquiridas da empresa BrSeeds. As plantas de crotalárias foram cadastradas no Patrimônio Genético-CTA (SisGen) sob Número A1C15FC. Os materiais vegetais empregados foram obtidos através de cultivo convencional (*C. juncea*) e cultivo *in vitro* (*C. juncea* e *C. ochroleuca*).

#### 2.1.2) Micropropagação de *C. juncea* e *C. ochroleuca*

O cultivo *in vitro* de *C. juncea* e *C. ochroleuca* foi realizado no Laboratório de Cultivo de Tecido localizado no Bioagro da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Primeiramente as sementes de *C. juncea* e *C. ochroleuca* foram desinfestadas em câmara de fluxo laminar com imersão por 10 min em solução de hipoclorito de sódio comercial (NaOCl) 2% de cloro ativo (p/p) (Super Globo®, Rio de Janeiro, Brasil). Em seguida, foram realizadas lavagens com álcool etílico (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH) 70% por 1 min e 4 enxágues em água autoclavada. Após a desinfestação, 4 sementes de cada espécie foram transferidas separadamente para tubos de ensaio com meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) previamente preparado e deixadas no escuro em prateleira coberta por 15 dias. Após esse período, eles foram transferidos para uma sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C, por um período mínimo de 45 dias sob fotoperíodo de 16 h, com irradiância de 30 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (quantificada por radiômetro LI-COR®, LI-250A Light Meter), fornecida por duas lâmpadas fluorescentes (Luz do Dia Especial, 20W, Osram, Brasil). As observações das culturas foram realizadas diariamente. As plantas germinadas foram transferidas para outro meio de cultivo MS para multiplicação das brotações. Para esta etapa foi preparado meio líquido MS e meio sólido MS sendo que as raízes foram colocadas no meio líquido e os caules no meio sólido. O meio sólido foi preparado para 25 tubos de ensaio e o meio líquido para 5 erlenmeyers. Para o preparo dos meios de cultivo foram pesados os reagentes: 4,4 g de meio de cultura MS, 0,104 g de vitamina, 0,1 g de inositol, 30 g de sacarose e 5,5 g de ágar (Merck) e adicionado 1 L de água

autoclavada. O pH do meio de cultivo foi ajustado para aproximadamente 5,8. Em seguida, o meio foi aquecido até a mistura ficar límpida e transferido uma quantidade de 15 mL para cada tubo. No meio líquido não foi acrescentado 5,5 g de ágar. Então, o meio líquido com 4,4 g de meio de cultivo MS, 0,104 g de vitamina, 0,1 g de inositol, 30 g de sacarose e 1 L de água autoclavada também foi aquecido e adicionado nos erlenmeyers. O mesmo meio foi adicionado nos erlenmeyers e tanto os tubos quanto os erlenmeyers foram fechados e autoclavados. Após a multiplicação foram realizadas as extrações das raízes e calos com metanol no Laboratório de Síntese de Agroquímicos (LASA) da UFV.

#### **2.1.1.2.1) Cultivo convencional de *C. juncea***

O cultivo foi realizado no campus da UFV, utilizando as sementes de *C. juncea*. A colheita foi realizada nos meses de janeiro e fevereiro de 2019, no final do ciclo da cultura, após a colheita as raízes foram separadas para preparação dos extratos.

#### **2.1.2) Preparo dos extratos vegetais de *C. juncea* e *C. ochroleuca***

Após realizado o cultivo *in vitro* das raízes de *C. juncea*, foi realizada a filtração para a obtenção dos exsudatos radiculares dessa espécie contidos no meio de cultivo MS. O meio de cultivo líquido foi liofilizado para a obtenção dos extratos dos exsudatos radiculares. As raízes e calos de *C. juncea* e *C. ochroleuca* micropropagadas e as raízes de *C. juncea* de cultivo convencional, foram trituradas separadamente com auxílio do gral e pistilo e submetidas a extração com 30 mL de metanol. Este procedimento foi realizado três vezes. Após reunião das frações, a solução foi filtrada e concentrada em evaporador rotatório, obtendo o extrato metanólico bruto. Os extratos foram armazenados em frascos hermeticamente fechados em geladeira. Para a detecção dos alcaloides, foi realizada a cromatografia de camada delgada (CCD), utilizando como eluente o diclorometano e metanol (9:1). A presença de alcaloides foi visualizada sob luz ultravioleta e utilizando o reagente revelador Dragendorff. Também foram utilizados outros reveladores como vanilina e solução de permanganato de potássio.

#### **2.1.3) Triagem fitoquímica**

Uma triagem foi realizada com o extrato de meio de cultivo de exsudatos radiculares de *C. juncea* cultivada *in vitro* e os extratos metanólicos das raízes de *C. juncea* do cultivo convencional e raízes e calos de *C. juncea* e calos de *C. ochroleuca* do cultivo *in vitro* para a determinação de metabólitos secundários. Para realização desta análise, foi utilizado o teste de Dragendorff. O reagente de Dragendorff foi preparado, dissolvendo-se 8 g de subnitrito de bismuto ( $\text{BiONO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) em 20 mL de ácido acético. Em seguida, essa solução foi transferida para um béquer contendo 50 mL de solução aquosa de iodeto de potássio (KI)  $3,3 \text{ mols L}^{-1}$  (JIA e TIAN, 2007). Posteriormente, foi transferido para um tubo de ensaio contendo 5 mL de água destilada onde foram adicionados cerca de 2 mg de extrato. Em seguida foi acrescentada, gota a gota, uma solução aquosa de ácido clorídrico  $2 \text{ mols L}^{-1}$  pelas paredes do tubo até a completa dissolução do extrato. A seguir, foi adicionado 1 mL da solução de reagente de Dragendorff. Dessa forma, a presença de alcaloides foi observada pela formação de um precipitado laranja avermelhado (SILVA e LIMA, 2016).

## **2.2) Obtenção e multiplicação do inóculo de *M. javanica***

A população de *M. javanica* utilizada nos ensaios *in vitro* e *in vivo* foi obtida da coleção de fitonematoides do Laboratório de Nematologia da UFV. Essa foi multiplicada em tomateiros cv. Santa Clara e mantida em casa de vegetação por 60 dias. Os juvenis de segundo estágio (J2) de *M. javanica*, usados nos experimentos, foram obtidos da seguinte forma: os ovos foram extraídos das raízes de tomateiros infectados segundo a técnica de Hussey e Barker (1973) modificada por Boneti e Ferraz (1981). Essas foram lavadas, cortadas e trituradas em um liquidificador por cerca de 20 seg em uma solução de hipoclorito de sódio a 0,5 % de cloro ativo. Logo em seguida, a suspensão foi vertida em uma peneira de 200 mesh (abertura de 75  $\mu\text{m}$ ) sobreposta a uma de 500 mesh (abertura de 25  $\mu\text{m}$ ). A suspensão obtida foi colocada em tubos de centrífuga, com adição de 1,9 g de caulim e centrifugada a uma rotação de 1750 rpm por 5 min. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e acrescentou-se aos tubos uma solução de sacarose ( $454 \text{ g L}^{-1}$  de açúcar cristal), ressuspendendo-se os sólidos contidos no fundo dos tubos. Em seguida, foi realizado uma segunda centrifugação na mesma rotação, por 1 min e o sobrenadante foi vertido em uma peneira de 500 mesh, onde os ovos dos nematoides ficaram retidos. Essa

suspensão obtida foi quantificada com auxílio da câmara de contagem de Peters, sob microscópio de luz. Após a contagem, a suspensão com os ovos ou foi empregada na montagem do experimento descrito no item 2.3.2 ou foi colocada em uma câmara de eclosão (CLIFF e HIRSCHMANN, 1985) para obtenção dos J2. A câmara de eclosão foi incubada em estufa incubadora B.O.D. a 25 °C durante 6 h, quando a suspensão contendo os J2 foi descartada, visando homogeneizar o período de eclosão dos juvenis e descartar os possíveis nematoides de vida-livre. Após o descarte e adição de água destilada à câmara de eclosão, essa foi mantida em estufa incubadora B.O.D a 25 °C durante 48 h. Posteriormente, a suspensão contendo os J2 foi recolhida para um béquer e esses foram quantificados e a suspensão calibrada para uso nos ensaios *in vitro* (descrito em 2.3) ou *in vivo* (descrito em 2.4).

### **2.3) Avaliação do efeito nematicida: ensaios *in vitro***

#### **2.3.1) Efeito dos extratos na mortalidade de *M. javanica***

O efeito nematicida dos extratos de crotalárias foi avaliado em placas de 96 poços com fundo chato, sendo que cada poço representou uma parcela experimental. Cada poço da placa recebeu 100 µL de suspensão aquosa, contendo aproximadamente 50 J2, obtidos como descrito no item 2.2, e 100 µL de cada extrato em diferentes concentrações. Os tratamentos foram: extratos metanólicos de raízes de *C. juncea* obtidas sob cultivo convencional (ERCJ\_CC), de raízes de *C. juncea* micropropagadas (ERCJ\_MP), de calos de *C. juncea* micropropagadas (ECCJ\_MP), de calos de *C. ochroleuca* micropropagadas (ECCO\_MP) e extrato de meio de cultivo de exsudatos radiculares de *C. juncea* micropropagadas (EERCJ\_MP). Foi preparado uma solução estoque de cada extrato na concentração de 1000 µg mL<sup>-1</sup>. Todos os extratos foram eluídos em solução aquosa de Tween 80 a 1% (m/v). Esses foram testados nas seguintes concentrações finais de: 100, 200, 300, 400 e 500 µg mL<sup>-1</sup>. O tratamento controle foi constituído de solução aquosa de Tween 80 a 1% (m/v) (representando a concentração 0). O nematicida Nimitz<sup>®</sup> EC também foi eluído em solução aquosa de Tween 80 a 1% (m/v) e foi usado como controle positivo. Foi preparado uma solução estoque de 480 µg mL<sup>-1</sup> do nematicida. Este foi avaliado nas concentrações finais de: 80, 100, 150, 200 e 240 µg mL<sup>-1</sup> para se determinar sua CL<sub>95</sub>, com a finalidade de usá-la no teste de inibição da eclosão. No tratamento controle, foi

usado solução aquosa de Tween 80 a 1% (m/v) (representando a concentração 0). As placas foram seladas com plástico PVC e armazenadas em estufa incubadora B.O.D. a 25 °C no escuro por 3 dias. A mortalidade foi avaliada 24, 48 e 72 h após a aplicação dos tratamentos, utilizando-se uma placa para cada dia de avaliação. Para isso, foi adicionada a cada poço uma gota de solução aquosa de NaOH (1 mol L<sup>-1</sup>, pH=10), fazendo a contagem dos nematoides logo em seguida (CHEN e DICKSON, 2000), com auxílio de um microscópio de luz invertido. Aqueles nematoides que exibiram o corpo retorcido foram considerados vivos e os que apresentaram o corpo reto e imóveis foram classificados como mortos (CHEN e DICKSON, 2000).

O delineamento empregado foi inteiramente casualizado com cinco repetições para cada período avaliado e todo o ensaio foi realizado uma única vez. A partir dos resultados obtidos nesses ensaios, foi calculado as concentrações que mataram 50% (CL<sub>50</sub>), 90% (CL<sub>90</sub>) e 95% (CL<sub>95</sub>) dos J2 após 72 h.

### **2.3.2) Efeito dos extratos na inibição da eclosão de J2 de *M. javanica***

Para testar o efeito dos extratos na inibição da eclosão de J2 de *M. javanica*, os ensaios foram montados de modo similar ao descrito no teste de mortalidade (item 2.3.1), exceto pelo fato de ter sido empregada uma suspensão aquosa de 100 µL, contendo aproximadamente 150 ovos e 100 µL de ERCJ\_MP, ECCJ\_MP, ECCO\_MP e EERCJ\_MP nas CL<sub>95</sub> determinadas como descrito em 2.3.1. ERCJ\_CC não foi testado devido sua porcentagem média de mortalidade máxima ter sido inferior a 20% em sua maior concentração (500 µg mL<sup>-1</sup>). Os tratamentos controles foram constituídos de água destilada, solução aquosa de Tween 80 a 1% (m/v) e Nimitz<sup>®</sup> EC na sua CL<sub>95</sub> a 232,30 µg mL<sup>-1</sup>, determinada em 2.3.1. As placas foram seladas com plástico PVC e armazenadas em B.O.D. a 25 °C por 10 dias, com o número de J2 eclodidos avaliados diariamente. O delineamento empregado foi o inteiramente casualizado com cinco repetições e o ensaio foi realizado duas vezes.

## **2.4) Avaliação do efeito nematicida: ensaios *in vivo***

### **2.4.1) Efeito dos extratos sobre o parasitismo de *M. javanica* em tomateiro**

Foram utilizados tubetes com a capacidade para 50 mL contendo a mistura solo e areia na proporção de 1:1 (v/v) e substrato, com a proporção final de 1:1 (v/v),

previamente autoclavada. Foi transplantado para cada tubete uma muda de tomateiro cv. Santa Clara com dois a três pares de folhas definitivas. Após 3 dias de transplântio, o solo de cada tubete foi infestado com uma suspensão de 3 mL contendo 100 juvenis de *M. javanica* obtidos conforme item 2.2. Essa suspensão foi aplicada em dois orifícios abertos no solo usando uma pipeta semiautomática. Logo após a infestação do solo, foi aplicado na forma de rega, 3 mL dos extratos com as menores CL<sub>95</sub> estabelecidas nos ensaios *in vitro*. Os extratos selecionados foram ECCO\_MP testado nas concentrações de 157,65 e 630,60 µg mL<sup>-1</sup> e ECCJ\_MP testado nas concentrações de 189,81 e 759,24 µg mL<sup>-1</sup>, as concentrações maiores correspondem a quatro vezes a CL<sub>95</sub> determinadas em 2.3.1. Os tratamentos controles foram: água destilada e solução aquosa de Tween 80 a 1% (m/v) e Nimitz<sup>®</sup> EC a 3600 µg mL<sup>-1</sup> (eluído em água destilada na concentração comercial). O controle Nimitz<sup>®</sup> EC foi aplicado na mistura solo e areia mais substrato 7 dias antes do transplântio das mudas. Após a aplicação, foram realizadas irrigações, conforme recomendação do fabricante. As plantas foram mantidas em casa de vegetação. Foram realizados três experimentos independentes, o primeiro foi para avaliar a taxa de penetração dos J2, o segundo para avaliar o desenvolvimento das fêmeas e o terceiro para avaliar o desenvolvimento e reprodução dos nematoides.

No primeiro experimento, após 4 dias da inoculação, os nematoides dentro das raízes foram submetidos à coloração com fucsina ácida (BYBD et al., 1983) para possibilitar a contagem dos mesmos em microscópio de luz invertido, para contabilizar o número de J2 que penetraram nas raízes. A porcentagem de penetração de juvenis nas raízes foi calculada dividindo-se o número de J2 dentro das raízes pelo número total inoculado x 100. No segundo experimento, após 20 dias da inoculação, os nematoides dentro das raízes foram submetidos à coloração como descrito anteriormente para contabilizar o número de fêmeas por sistema radicular. Já no terceiro experimento, após 30 dias da inoculação, as raízes foram coletadas, pesadas e coradas com floxina B (TAYLOR e SASSER, 1978), seguindo-se a contagem do número de galhas e de massas de ovos. Em seguida, foi realizada a extração dos ovos de acordo com Hussey e Barker (1973) modificada por Boneti e Ferraz (1981), para estimativa do número de ovos. O delineamento empregado nos experimentos foi inteiramente casualizado com 5 repetições. Os experimentos foram realizados duas vezes.

### **3. Análise estatística**

Com os dados obtidos nos testes de mortalidade foram calculadas as concentrações letais, por meio do software R (CRAN, 2021), utilizando o pacote *ec50estimator* (ALVES, 2020). Já os dados obtidos nos demais experimentos foram submetidos a análise de variância e ao teste F para verificar sua significância. Quando esses apresentaram normalidade e homogeneidade foram comparados pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, quando não apresentaram normalidade e homogeneidade, foram submetidos ao teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis a 5% de significância, com o auxílio do programa R (CRAN, 2021). No caso dos experimentos realizados duas vezes, quando houve interação significativa entre os ensaios, os dados foram analisados separadamente.

### **4. Resultados e Discussão**

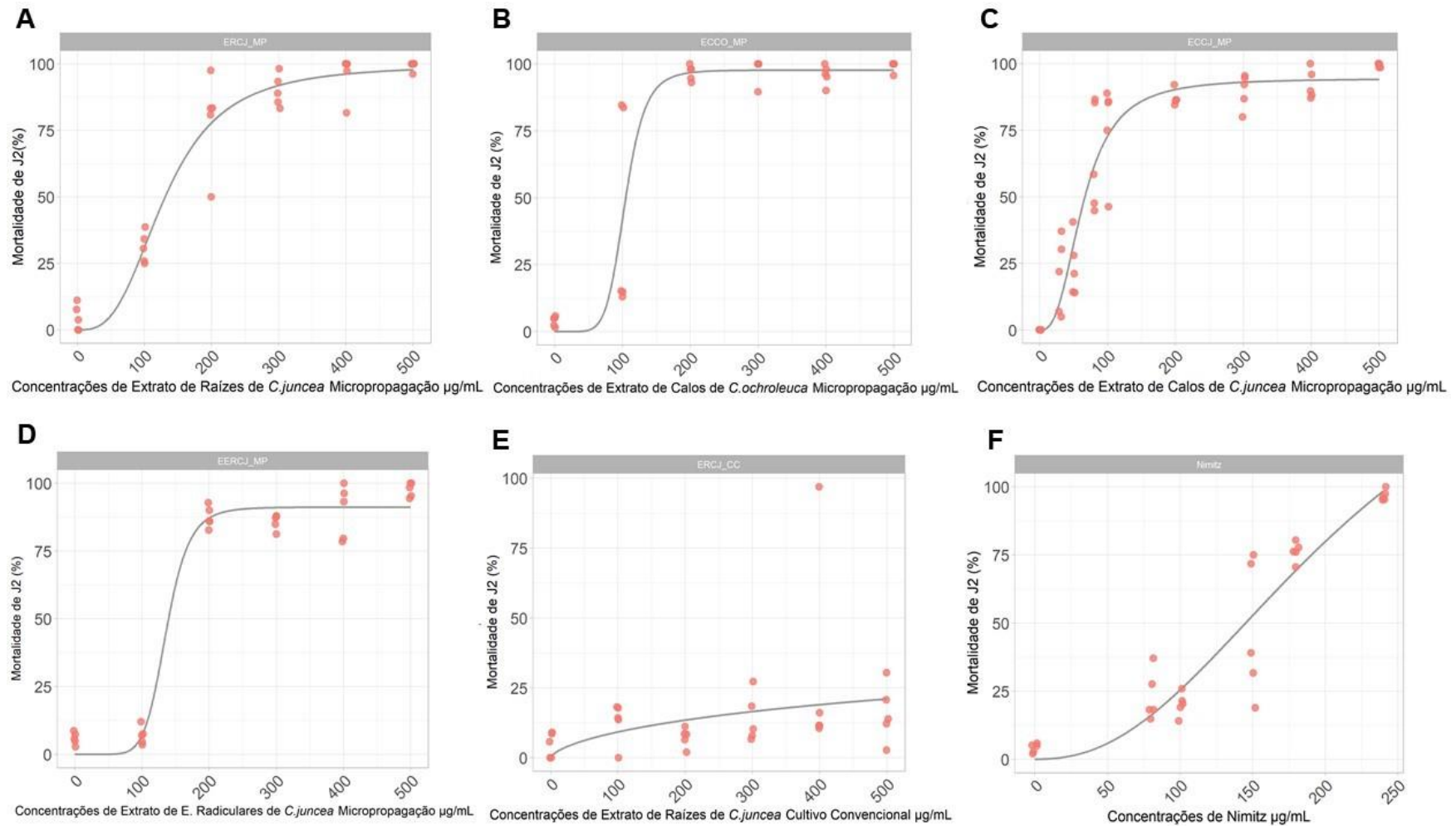
#### **4.1) Triagem Fitoquímica**

De acordo com o Teste de Dragendorff foi observado a presença de alcaloides em todos os extratos.

#### **4.2) Atividade nematicida dos extratos de *Crotalaria* spp.: ensaios *in vitro***

##### **4.2.1) Teste de mortalidade de *M. javanica***

Todos os extratos foram capazes de matar os J2 de *M. javanica* em comparação com o controle solução aquosa de Tween (Figura 1). Houve o efeito de dose dependente, isto significa que o aumento das concentrações e do tempo de incubação dos nematoides nos extratos, levou ao progressivo aumento da mortalidade dos J2 (Apêndice – Figuras 7-10), exceto no tratamento com ERCJ\_CC (Apêndice A, Figura 11).



**Figura 1.** Toxicidade dos extratos de *Crotalaria* spp. a juvenis de segundo estágio (J2) de *M. javanica*. Curva de mortalidade de *M. javanica* após o tratamento com 0, 100, 200, 300, 400 e 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de **(A)** ERCJ\_MP (extrato de raízes de *C. juncea* micropropagada); **(B)** ECCO\_MP (extrato de calos de *C. ochroleuca* micropropagada); **(C)** ECCJ\_MP (extrato de calos de *C. juncea* micropropagada); **(D)** EERCJ\_MP (extrato de exsudatos radiculares de *C. juncea* micropropagada) e **(E)** ERCJ\_CC (extrato de raízes de *C. juncea* de cultivo convencional), após 72 h de incubação. **(F)** Curva de mortalidade de *M. javanica* tratados com 0, 80, 100, 150, 200 e 240  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de Nimitz, após 72 h de incubação. Cada ponto em vermelho em cada gráfico indica a porcentagem de mortalidade observada em cada parcela experimental.

Houve diferença entre as taxas de mortalidade entre os dois extratos de raízes de *C. juncea*, provenientes de raízes cultivadas por micropropagação (ERCJ\_MP) e pelo cultivo convencional (ERCJ\_CC) (Figuras 1A e 1E), sendo que ERCJ\_MP foi mais tóxico aos J2. Essa diferença pode estar relacionada a variações no teor dos metabólitos secundários com ação nematicida presente em cada material. Isso porque, em geral, tais metabólitos secundários constituem-se na interface química entre as plantas e o ambiente onde elas estão inseridas. Assim, a produção desses pode ser alterada sob condições ambientais diferentes (KUTCHAN, 2001).

Há relatos na literatura que apoiam essa hipótese, por exemplo, uma pesquisa realizada com extratos de folhas de *C. prostate* e *C. medicaginea*, oriundos de plantas micropropagadas e de cultivo convencional, verificou-se que ácidos fenólicos estavam presentes em extratos de plantas cultivadas *in vitro* e não estavam presentes nos extratos de plantas cultivadas em campo. Os autores também verificaram que triterpenos foram encontrados em extratos de folhas de *C. retusa*, *C. prostate* e *C. medicaginea*, porém esses metabólitos secundários ocorreram em poucas quantidades ou estavam ausentes em extratos de folhas de *C. medicaginea* cultivadas em campo (DEVENDRA; SRINIVAS; SOLMON, 2012). Devendra; Srinivas e Solmon (2012) observaram que a atividade antimicrobiana dos extratos provenientes de plantas de *Crotalaria* spp. cultivadas em campo contra *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli*, foi menor do que a atividade antimicrobiana dos extratos provenientes de plantas de *Crotalaria* spp. cultivadas *in vitro*. Nakka e Devendra (2012) compararam o teor de metabólitos secundários em plantas de *C. retusa*, *C. prostada* e *C. medicaginea* cultivadas em *in vitro* e *in vivo*. As plantas cultivadas *in vitro* apresentaram maior teor de alcaloides, flavonoides, fenóis e saponinas.

O metabolismo secundário das plantas expressa-se em células e tecidos específicos, em estádios determinados de crescimento, correlacionando uma ligação entre crescimento e diferenciação morfológica das células (ROCHA e CAMPOS, 2004). Dessa forma, o cultivo de células, tecido, órgãos vegetais e plântulas em condições controladas é uma técnica promissora para avaliar o efeito de extratos botânicos, em razão do cultivo livre de microrganismos, nutrição, luz e temperatura adequadas para as plantas. A técnica de cultura *in vitro* fornece indivíduos de boa qualidade genética, além de ser uma maneira de aumentar a multiplicação dessas plantas para a produção de possíveis compostos bioativos de interesse para indústrias

biomédicas, agroindustrial, farmacêuticas e de alimentos (ORTUÑO et al., 2018). A produção de plântulas *in vitro* e posteriormente o cultivo dessas *in vivo* é uma técnica ideal para não ocasionar variações somaclonais e obter uma produção em massa (NAKKA e DEVENDRA, 2012). Entretanto, para confirmação dessa hipótese, é necessário realizar a caracterização e comparação química entre ERCJ\_MP e ERCJ\_CC testados no presente estudo.

As concentrações letais são utilizadas para comparar a ação letal de compostos químicos sobre organismos. As concentrações letais dos extratos e do nematicida foram calculadas por meio dos dados de mortalidade dos J2, após 72 h de incubação (Figura 1), exceto para o tratamento ERCJ\_CC. Isso porque a porcentagem média da mortalidade dos J2 na maior concentração desse extrato ( $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) foi inferior a 20% (Figura 1E).

Os extratos mais tóxicos a *M. javanica* foram ECCJ\_MP e ECCO\_MP, que apresentaram as  $CL_{50}$  de 63,41 e  $103,90 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente. As  $CL_{50}$  de todos os extratos foram menores que a nematicida Nimitz<sup>®</sup> EC (Tabela 1). Entretanto, para a  $CL_{90}$  e  $CL_{95}$  o ERCJ\_MP obteve valores maiores que o controle.

**Tabela 1.** Concentrações letais ( $CL_{50}$ ,  $CL_{90}$  e  $CL_{95}$ ) dos extratos de *Crotalaria* spp. a juvenis de *M. javanica*, após incubação por 72 h a  $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$  estimadas a partir do pacote ec50estimator.

Extratos	$CL_{50} (\mu\text{g mL}^{-1})$	$CL_{90} (\mu\text{g mL}^{-1})$	$CL_{95} (\mu\text{g mL}^{-1})$
ERCJ_MP	130,24	272,25	349,84 ( $\pm 0,516$ )
ECCO_MP	103,90	141,82	157,65 ( $\pm 12,255$ )
ECCJ_MP	63,41	143,71	189,81 ( $\pm 0,529$ )
EERCJ_MP	136,18	179,05	196,52 ( $\pm 1,480$ )
Nimitz <sup>®</sup>	145,25	221,24	232,30 ( $\pm 0,697$ )

ERCJ\_MP: extrato de raízes de *C. juncea* micropropagada; ECCO\_MP: extrato calos de *C. ochroleuca* micropropagada; ECCJ\_MP: extrato de calos de *C. juncea* micropropagada; EERCJ\_MP extrato de exsudatos radiculares de *C. juncea* micropropagada. Os valores entre parênteses representam o erro padrão.

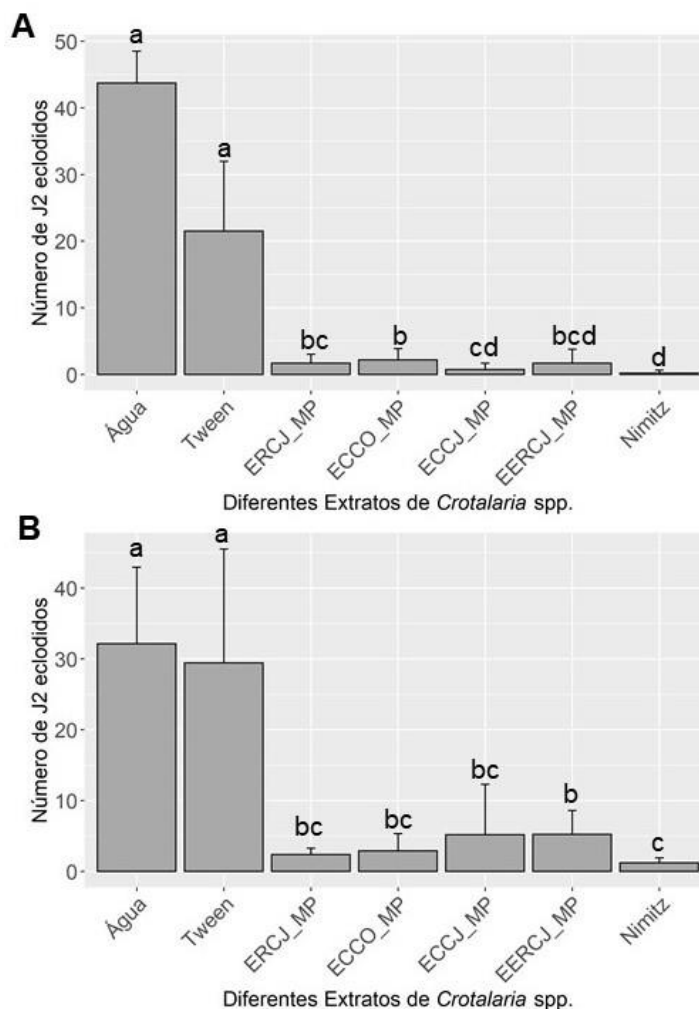
Paravaj et al. (2012) avaliando o efeito de extrato metanólico de folhas de *C. retusa* sobre *M. incognita*, encontraram a  $CL_{50}$  e  $CL_{90}$  de 139,19 ppm e 233,41 ppm,

equivalente a 139,19 e 233,41  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente, após 24 h de incubação. Jourand et al. (2004a) ao testarem o efeito de extrato aquoso de folhas de *C. virgulata* subsp. *grantiana* sobre *M. incognita*, após 48 h encontraram uma  $\text{CL}_{50}$  de 0,5  $\text{mg mL}^{-1}$ , equivalente a 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , porém essa concentração causou 50% da paralisia dos J2, diferente do presente trabalho que em menores concentrações causou a morte dos J2. Rudnick (2020) ao estudar a  $\text{CL}_{50}$  de extratos aquosos de folhas de *C. juncea* e *C. ochroleuca* encontrou os valores de 0,76 e 1,56 ppm, equivalente a 76 e 156  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente, porém esses valores também são referentes a 50% da paralisia dos J2. A distinção dos resultados do presente trabalho com os trabalhos citados anteriormente, provavelmente é em razão das diferenças: espécie da planta, estágio fenológico, tecido vegetal utilizado e da técnica de preparação dos extratos.

#### **4.2.2) Efeito dos extratos na inibição de eclosão dos J2 de *M. javanica***

Todos os extratos diminuíram a taxa de eclosão de J2 de *M. javanica* em comparação com o controle solução aquosa de Tween. As diminuições no primeiro ensaio foram de 89,36; 91,69; 91,73 e 96,53% em ECCO\_MP, ERCJ\_MP, EERCJ\_MP e ECCJ\_MP, respectivamente (Figura 2A). O efeito supressor dos extratos EERCJ\_MP e ECCJ\_MP foi similar ao do nematicida Nimitz<sup>®</sup> EC.

No segundo ensaio, todos os extratos também diminuíram a taxa de eclosão dos J2 de *M. javanica* em comparação com o controle solução aquosa de Tween, sendo essas de 82,30; 82,40; 90,19 e 91,92% em EERCJ\_MP, ECCJ\_MP, ECCO\_MP e ERCJ\_MP, respectivamente (Figura 2B). Os extratos ECCJ\_MP, ECCO\_MP e ERCJ\_MP foram tão eficientes quanto o nematicida Nimitz<sup>®</sup> EC.



**Figura 2.** Supressividade da eclosão de J2 de *M. javanica* tratados com extratos de *Crotalaria* spp. nas suas respectivas  $CL_{95}$ , após 10 dias de incubação a 25 °C. **(A)** Resultados observados no primeiro ensaio. **(B)** Resultados observados no segundo ensaio. Em ambos os ensaios os tratamentos foram: ERCJ\_MP (extrato de raízes de *C. juncea* micropropagada), ECCO\_MP (extrato de calos de *C. ochroleuca* micropropagada), ECCJ\_MP (extrato de calos de *C. juncea* micropropagada) e EERCJ\_MP (extrato de exsudatos radiculares de *C. juncea* micropropagada). Os controles foram: água destilada e solução aquosa de Tween. O nematicida Nimitz foi aplicado na concentração de 232,30  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Médias seguidas pela mesma letra, representam igualdade estatística pelo teste de Kruskal-Wallis a 5% de significância. As barras representam o desvio padrão.

Já há na literatura outros relatos da alta taxa de inibição da eclosão de *Meloidogyne* spp., causada por exsudatos de *Crotalaria* spp. (ROCHA e CAMPOS, 2004; OSEI et al., 2010). Rocha e Campos (2004) observaram uma inibição maior que 70% na eclosão de J2 de *M. incognita* com exsudatos de cultura de células de *C. juncea* em comparação com o tratamento água. Osei et al. (2010) relataram uma inibição na eclosão de 70,79% em J2 de *Meloidogyne* spp. com exsudatos radiculares de *C. spectabilis* em comparação com o tratamento água.

Colegate et al. (2012) observaram que os principais alcaloides pirrolizidínicos em extratos metanólicos de folhas, hastes, raízes e sementes de *C. juncea* são junceine, trichodesmine, isohemijunceine, isohemijunceines B e C,

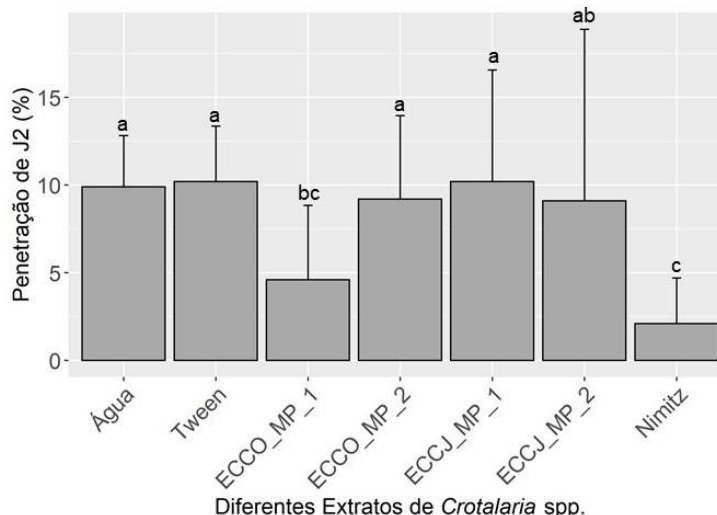
acetylisohehijunceines 1 e 2. Esses alcaloides pirrolizidínicos possivelmente apresentam atividade nematicida (BRAZ et al., 2016). Ademais, foi relatado a presença de monocrotalina nas sementes e extrato etanólico de folhas de *C. juncea* (SAKAMOTO et al., 2017; EXPOSITO et al., 2018). Em *C. ochroleuca* não foi relatado a presença de monocrotalina no extrato de sementes, porém foi constatada a presença de outros alcaloides pirrolizidínicos (PILBEAN e LYON-JOYCE, 1983; WILLIAMS e MOLYNEUX, 1987). Em folhas dessa espécie foi constatado a presença de alcaloides, saponinas, esteroides e flavonoides (SIKOLIA e OMONDI, 2017).

O resultado da supressão da eclosão dos J2 no presente estudo pode ser devido à ocorrência de ovos que apresentavam juvenis completamente formados internamente, e os extratos conterem substâncias que afetaram a enzima acetilcolinesterase, ocasionando a redução de movimento dos juvenis que é necessário para a eclosão dos ovos (NELMES, 1970). Visto que, a monocrotalina, alcaloide presente em espécies de *Crotalaria* spp., inibe o movimento dos juvenis (WANG et al., 2002). A monocrotalina já foi relatada inibindo a eclosão de J2 de *M. incognita*, o metabólito secundário inibiu 46,30 e 70,37% na forma de base livre e *N*-óxido, respectivamente, comparado com o controle (THODEN; BOPPRÉ; HALLMANN, 2009). Além disso, provavelmente há a presença de outros compostos com ação nematicida nos extratos que inibiram a eclosão dos J2, como fenóis, saponinas, flavonoides e outros alcaloides, compostos que tem atividade nematicida comprovada (CHITWOOD, 2002).

### **4.3) Ensaios *in vivo***

#### **4.3.1) Efeito dos extratos sobre o parasitismo de *M. javanica* em tomateiro**

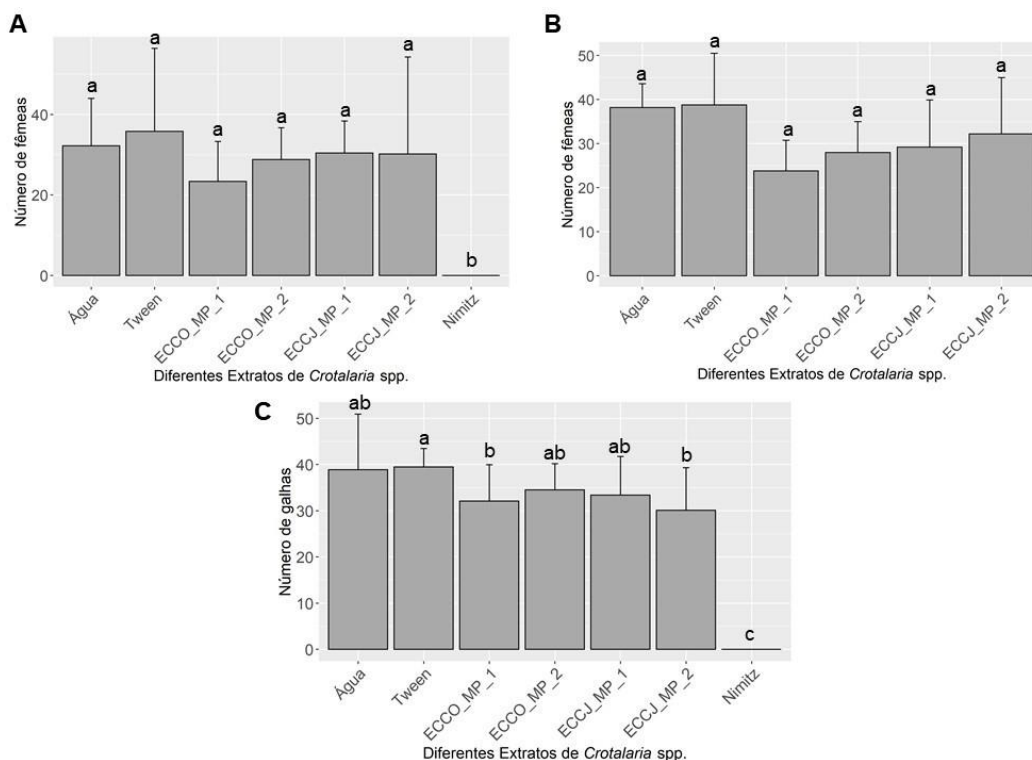
No ensaio de penetração de J2 de *M. javanica*, o extrato ECCO\_MP aplicado na CL<sub>95</sub> foi o único que diferiu dos controles água e solução aquosa de Tween (Figura 3). Houve uma redução de 54,90% na taxa de penetração dos J2 comparado com o controle solução aquosa de Tween (Figura 3).



**Figura 3.** Efeito dos extratos de *Crotalaria* spp. sobre a penetração de J2 de *M. javanica* em raízes de tomateiro. Os tratamentos foram ECCO\_MP\_1 (extrato de calos de *C. ochroleuca* micropropagada a 157,65  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), ECCO\_MP\_2 (extrato de calos de *C. ochroleuca* micropropagada a 630,60  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), ECCJ\_MP\_1 (extrato de calos de *C. juncea* micropropagada a 189,81  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), ECCJ\_MP\_2 (extrato de calos de *C. juncea* micropropagada a 759,24  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Os controles foram: água destilada, solução aquosa de Tween e 3600  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de Nimitz. Médias seguidas pela mesma letra, representam igualdade estatística pelo teste de Kruskal-Wallis a 5% de significância. As barras representam o desvio padrão.

Extratos de quatorze espécies de *Crotalaria* spp. apresentaram um alto efeito nematostático sobre J2 de *M. incognita*, *M. javanica* e *M. enterolobii* (= *M. mayaguensis*). Destacando-se o efeito nematostático de 100% dos extratos aquosos de brotos de *C. comosa* e *C. cylindrocarpa* e extratos aquosos de raízes de *C. goreensis* e *hyssopifolia* sobre J2 de *M. javanica* (JOURAND et al., 2004b). Jourand et al. (2004a) ao testarem o extrato aquoso de folhas de *C. virgulata* subsp. *grantiana* sobre *M. incognita* encontraram um efeito nematostático de 100%. No caso do presente estudo, esse efeito foi mais expressivo no tratamento com ECCO\_MP aplicado na CL<sub>95</sub> já que nesse houve a diminuição em 54,90% na taxa de penetração de J2 no sistema radicular comparado ao tratamento com solução aquosa de Tween. Essa diferença entre o efeito dos extratos pode estar relacionada à composição de metabólitos secundários presentes em cada um deles.

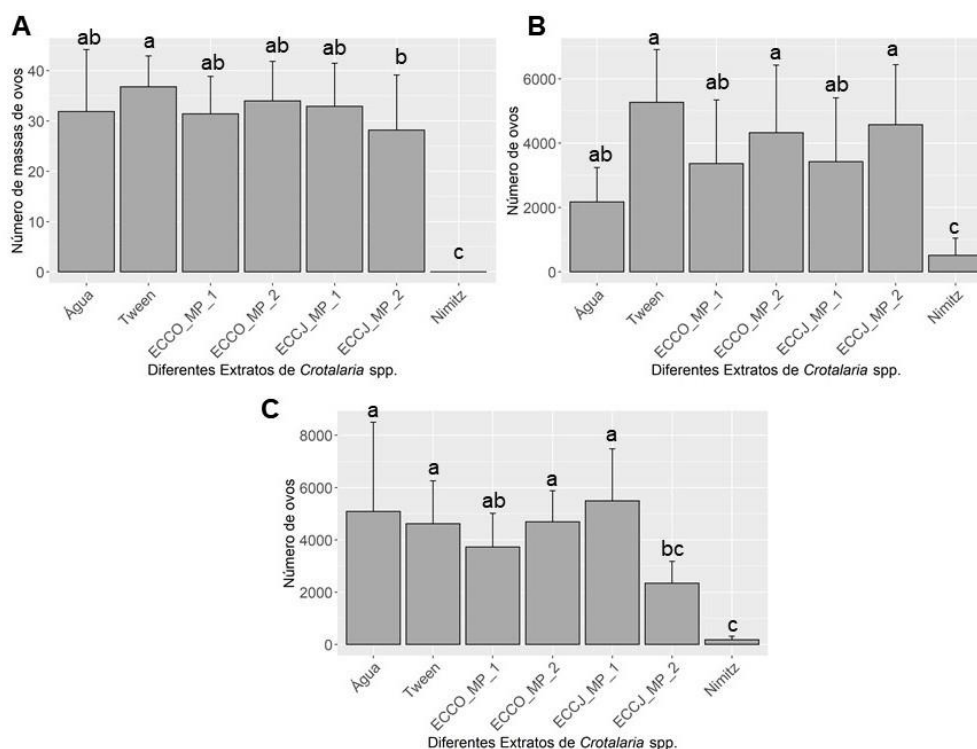
Os ensaios para avaliar o efeito sobre o desenvolvimento de fêmeas não foram analisados juntamente devido à morte das plantas do controle Nimitz® EC no segundo ensaio, em razão da ocorrência de fitotoxicidade do nematicida (Figura 4B). Nos dois ensaios, nenhum extrato diminuiu o desenvolvimento de *M. javanica* nas raízes de tomateiro (Figura 4AB).



**Figura 4.** Efeito dos extratos de *Crotalaria* spp. sobre o desenvolvimento de *M. javanica* em raízes de tomateiro. **(A)** Número de fêmeas no primeiro experimento. Médias seguidas pela mesma letra, representam igualdade estatística pelo teste de Kruskal-Wallis a 5% de significância. **(B)** Número de fêmeas no segundo experimento. Médias seguidas pela mesma letra, representam igualdade estatística pelo teste de Tukey a 5% de significância. **(C)** Número de galhas. Médias seguidas pela mesma letra, representam igualdade estatística pelo teste de Kruskal-Wallis a 5% de significância. Em ambos os ensaios os tratamentos foram ECCO\_MP\_1 (extrato de calos de *C. ochroleuca* micropropagada a 157,65  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), ECCO\_MP\_2 (extrato de calos de *C. ochroleuca* micropropagada a 630,60  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), ECCJ\_MP\_1 (extrato de calos de *C. juncea* micropropagada a 189,81  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), ECCJ\_MP\_2 (extrato de calos de *C. juncea* micropropagada a 759,24  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Os controles foram: água destilada, solução aquosa de Tween e 3600  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de Nimitz. As barras representam o desvio padrão.

Observou-se que o número de fêmeas no interior das galhas foi maior do que o de J2 nas raízes (Figura 3), em todos os tratamentos com os extratos vegetais (Figura 4AB). Esse resultado deve-se provavelmente, devido ao curto período de contato dos J2 com os extratos, visto que, ainda não se sabe o período residual destes no solo. Portanto, os juvenis podem ter se recuperado e obtiveram sucesso na infecção. Desta forma, futuros ensaios devem ser realizados em microcosmos para avaliar se há recuperação progressiva dos J2 e realizar a reaplicação dos extratos, com o intuito de aumentar a eficiência de controle. No ensaio de desenvolvimento de *M. javanica*, os extratos ECCO\_MP\_1 e ECCJ\_MP\_2 (630,60  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), reduziram o número de galhas em 18,73 e 23,80% em comparação com o controle solução aquosa de Tween, respectivamente (Figura 4C). Os extratos ECCO\_MP\_1 e ECCJ\_MP\_2 podem ter inibido a movimentação de juvenis de *M. javanica* no solo, resultando em menor número de galhas. Porém, uma vez no interior das raízes, o desenvolvimento dos juvenis até a fase adulta pode não ter sido afetado.

Quanto ao número de massas de ovos, no ensaio de reprodução, ECCJ\_2 reduziu o número em 23,37% em comparação com o controle solução aquosa de Tween (Figura 5A). No primeiro ensaio de reprodução, nenhum extrato diferiu dos controles água e solução aquosa de Tween, em relação ao número de ovos (Figura 5B). Contudo, no segundo ensaio, ECCJ\_MP\_2 diferiu dos controles água e solução aquosa de Tween. ECCJ\_MP\_2 reduziu o número de ovos em 49,31% em comparação ao controle solução aquosa de Tween (Figura 5C).

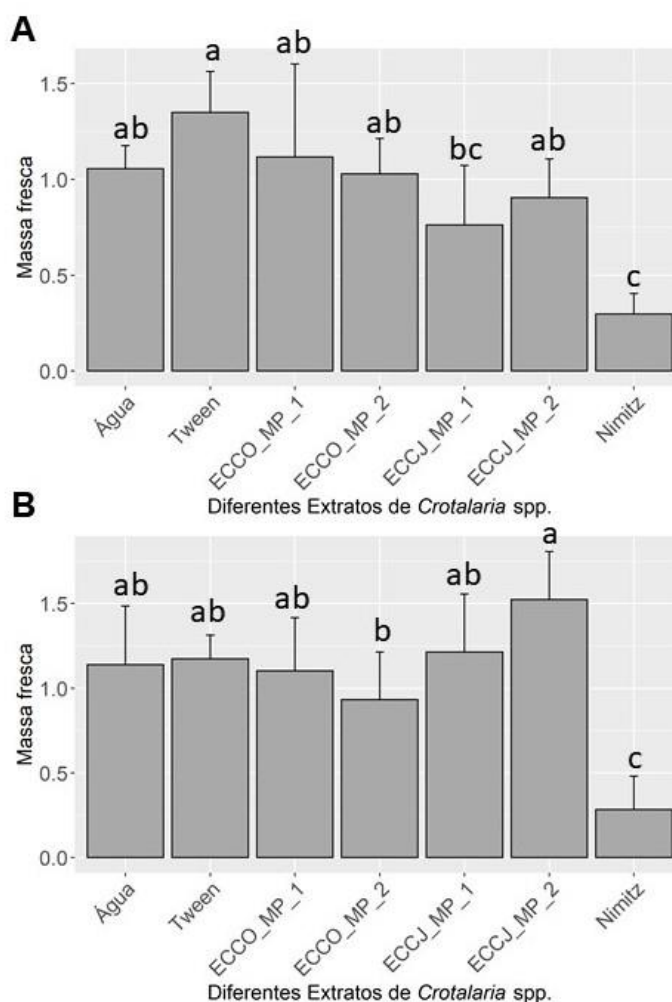


**Figura 5.** Efeito dos extratos de *Crotalaria* spp. sobre a reprodução de *M. javanica* em raízes de tomateiro. **(A)** Massas de ovos. Médias seguidas pela mesma letra, representam igualdade estatística pelo teste de Kruskal-Wallis a 5% de significância. **(B)** Número de ovos no primeiro ensaio. Médias seguidas pela mesma letra, representam igualdade estatística pelo teste de Tukey a 5% de significância. **(C)** Número de ovos no segundo ensaio. Médias seguidas pela mesma letra, representam igualdade estatística pelo teste de Kruskal-Wallis a 5% de significância. Em ambos os ensaios os tratamentos foram ECCO\_MP\_1 (extrato de calos de *C. ochroleuca* a 157,65  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), ECCO\_MP\_2 (extrato de calos de *C. ochroleuca* a 630,60  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), ECCJ\_MP\_1 (extrato de calos de *C. juncea* a 189,81  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), ECCJ\_MP\_2 (extrato de calos de *C. juncea* a 759,24  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Os controles foram: água destilada, solução aquosa de Tween e 3600  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de Nimitz. As barras representam o desvio padrão.

Resultados semelhantes ao número de ovos do primeiro ensaio, foram encontrados por Gardiano et al. (2011) que testaram extrato aquoso de folhas de *C. spectabilis* na redução de ovos de *Rotylenchulus reniformis*. Entretanto, o extrato aumentou a porcentagem de número de ovos em 37% comparado com o controle água. O efeito de extratos aquosos de sementes de *C. breviflora*, *C. juncea*, *C. mucronata* e *C. spectabilis* foram testados sobre *M. javanica*. Somente o extrato aquoso de sementes de *C. mucronata* teve efeito supressor sobre *M. javanica*,

diminuindo em 33% o número de galhas em comparação ao tratamento com água (GARDIANO et al., 2010). Borges et al. (2013) também observaram resultados parecidos ao testarem extrato aquoso de folhas de *Crotalaria* spp. sobre *M. incognita*, houve uma redução de 43,36% no número de J2, 42,71% no número de galhas e 42,31% no número de ovos comparado com o controle sem aplicação de tratamento.

Nos ensaios de reprodução, as raízes frescas foram pesadas. No primeiro ensaio, houve uma diferença significativa entre o controle Nimitz® EC e os demais tratamentos, exceto ECCJ\_MP\_1, devido à fitotoxidez das plantas que o nematicida ocasionou (Figura 6A). No segundo ensaio, houve uma diferença significativa entre o controle Nimitz® EC e os demais tratamentos (Figura 6B).



**Figura 6. (A)** Massa fresca das raízes de tomateiro no primeiro ensaio. **(B)** Massa fresca das raízes de tomateiro no segundo ensaio. Em ambos os ensaios os tratamentos foram ECCO\_MP\_1 (extrato de calos de *C. ochroleuca* a 157,65  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), ECCO\_MP\_2 (extrato de calos de *C. ochroleuca* a 630,60  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), ECCJ\_MP\_1 (extrato de calos de *C. juncea* a 189,81  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), ECCJ\_MP\_2 (extrato de calos de *C. juncea* a 759,24  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Os controles foram: água destilada, solução aquosa de Tween e 3600  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de Nimitz. Médias seguidas pela mesma letra, representam igualdade estatística pelo teste de Tukey a 5% de significância. As barras representam o desvio padrão.

Os resultados encontrados nesse trabalho, mostram evidências da presença de compostos nematicidas nos diferentes extratos de *C. juncea* e *C. ochroleuca*. Os extratos apresentam potencial para o desenvolvimento de nematicidas botânicos, a fim de introduzi-los como uma ferramenta no manejo integrado de fitonematoides. Pois apresentaram  $CL_{50}$  baixa, comparada àquelas relatadas em outros trabalhos (JOURAND et al., 2004a; PARAVAJ et al., 2012; RUDNICK, 2020) com materiais provenientes de *Crotalaria* spp..

A multiplicação de plantas *in vitro* como ocorreu no presente estudo, é uma técnica essencial para a produção isenta de doenças, multiplicação rápida e transformação do genoma para a produção de metabólitos secundários de alto valor comercial (ALTPETER et al., 2016). Foi observado que houve diferença no efeito nematicida dos extratos provenientes de raízes de *C. juncea* cultivados por meio das diferentes técnicas, extrato obtido através do material vegetal cultivado *in vitro* (ERCJ\_MP) apresentou alto efeito nematicida, enquanto o extrato proveniente de material do cultivo convencional (ERCJ\_CC) exibiu baixo efeito. Porém, o cultivo *in vitro* tem um custo mais alto comparado com o cultivo tradicional (PENCE, 2011). Para a produção de extrato de calos e raízes de *C. juncea* e *C. ochroleuca* por micropropagação, foram necessários 0,2 e 0,34 g de tecido vegetal para a produção de 1000 µg de extrato (resultados não apresentados).

Deve-se ressaltar que as diferenças observadas entre os resultados obtidos em laboratório e aqueles conduzidos em casa de vegetação ou campo não são raras (GARDIANO et al., 2010). O principal fator que pode ocasionar tais diferenças é a volatilização e degradação dos compostos ativos presentes nos produtos à base de plantas (BORGES et al., 2018). Desse modo, é necessário a busca de tecnologias de aplicação que reduzam as perdas dos compostos ativos aplicados ao solo, garantindo-se assim uma entrega mais eficiente (BORGES et al., 2017). Há trabalhos na literatura com utilização de nanopartículas na aplicação de extratos vegetais sobre nematoides *in vitro* e *in vivo* que apresentaram bons resultados (KALAISELVI et al., 2017; EL-DEEN e EL-DEEB, 2018; HEFLISH et al., 2021). Dessa forma, essa tecnologia poderia ser usada em futuros ensaios com extratos de *C. juncea* e *C. ochroleuca* utilizados no presente estudo.

Portanto, mesmo com os bons resultados encontrados no trabalho, principalmente *in vitro*, é necessário a repetição dos ensaios *in vivo* com ênfase para ECCO\_MP e ECCJ\_MP, com propósito de diminuir a discrepância entre os ensaios

realizados em laboratório e casa de vegetação. Os futuros ensaios devem ocorrer em condições diferentes como: conter mais parcelas, testar maiores concentrações dos extratos mais promissores, avaliá-los em misturas, avaliar o efeito empregando-se uma aplicação *versus* várias aplicações, avaliar se o tipo de inóculo (ovos ou juvenis de *Meloidogyne* spp.) influência nos efeitos observados, avaliar diferentes modos de aplicação (ex: rega, nanopartículas).

Adicionalmente, é necessário a realização da caracterização química dos compostos presentes nos extratos, com a finalidade de se identificar e avaliar o efeito nematicida dos compostos purificados, avaliar diferentes métodos de extração dos extratos vegetais, determinar seus modos de ação, as concentrações efetivas de uso, o modo de aplicação mais eficiente e custo médio do produto.

## 5. Conclusão

Conclui-se que todos os extratos de *Crotalaria* spp. apresentam atividade nematicida, exceto o extrato proveniente de raízes de *C. juncea* de cultivo convencional, destacando-se como mais promissores os extratos provenientes de micropropagação de calos de *C. ochroleuca* e *C. juncea*, pois foram os mais tóxicos a *M. javanica*, nas condições testadas.

## 6. Referências

ADAMA. **Ficha Técnica DAZITOL**. Disponível em: <[https://www.adama.com/documents/369693/375404/DAZITOL+FT+2017\\_tcm58-93713.pdf](https://www.adama.com/documents/369693/375404/DAZITOL+FT+2017_tcm58-93713.pdf)> Acesso em: 31 jan. 2021.

ABDELNABBY, H.; WANG, Y.; XIAO, X.; WANG, G.; YANG, F.; XIAO, Y. Impact of direct and indirect application of rising furfural concentrations on viability, infectivity and reproduction of the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* in *Pisum sativum*. **Microbial Pathogenesis**, v. 96, p. 26-34, 2016.

ADAPAR. **Azamax**. Disponível em: <[http://www.adapar.pr.gov.br/sites/adapar/arquivos\\_restritos/files/documento/2020-10/azamax0120.pdf](http://www.adapar.pr.gov.br/sites/adapar/arquivos_restritos/files/documento/2020-10/azamax0120.pdf)> Acesso em: 31 jan. 2021.

AGROFIT. **Consulta de Produtos Formulados**. Disponível em: <[http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons!/ap\\_produto\\_form\\_detalhe\\_cons?p\\_id\\_produto\\_formulado\\_tecnico=15695&p\\_tipo\\_janela=NEW](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons!/ap_produto_form_detalhe_cons?p_id_produto_formulado_tecnico=15695&p_tipo_janela=NEW)> Acesso em: 22 ago. 2021.

ALMEIDA, C. D. S.; SOUZA, D. S. L.; SARTO, R. P.; FIRMINO, A. A. P.; SILVA, T. S.; MAGALHÃES, J. C. C.; SÁ, M. F. G.; ROCHA, T. L. Fracionamento de extrato aquoso de sementes de *Crotalaria spectabilis* efetivo no controle de juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita*. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, Brasília, n. 78, p. 11, 2008

ALVES, K. S. **Ec50estimator**: An easy way to estimate EC<sub>50</sub> for multi isolate datasets. Disponível em: <<https://alvesks.github.io/ec50estimator/>> Acesso em: 20 mar. 2021.

ALTPETER, F.; SPRINGER, N. M.; BARTLEY, L. E.; BLECHL, A. E.; BRUTNELL, T. P.; CITOOSKY, V.; CONRAD, L. J.; GELVIN, S. B.; JACKSON, D. P.; KAUSCH, A. P.; LEMAUX, P. G.; MEDFORD, J. I.; OROZCO-CÁRDENAS, M. L.; VAN-ECK, T. J.; VOYTAS, D. F.; WALBOT, V.; WANG, K.; ZHANG, Z. J.; STEWART-JR, C. N. Advancing crop transformation in the era of genome editing. **The Plant Cell**, v. 28, n. 7, p. 1510-1520, 2016.

BASF. **QL Agri®35, nematicida natural, acaricida e inseticida à base de extrato de Quillay**. Disponível em: <<https://agriculture.basf.com/cl/es/proteccion-de-cultivos-ysemillas/productos/ql-agri-35.html>> Acesso em: 31 jan. 2021.

BRAZ, G. B. P.; OLIVEIRA-JÚNIOR, R. S.; CROW, W. T.; CHASE, C. A. Susceptibility of different accessions of *Crotalaria juncea* to *Belonolaimus longicaudatus*. **Nematropica**, v. 46, n. 1, p. 31-37, 2016.

BONETI, J. I. S.; FERRAZ, S. Modificação do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de raízes de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 6, n. 3, 1981.

BORGES, F. G.; BATTISTUS, A. G.; MÜLLER, M. A.; MIORANZA, T. M.; KUHN, O. J. Manejo alternativo de nematoides de galha (*Meloidogyne incognita*) em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*). **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 12, p. 425-433, 2013.

BORGES, D. F.; LOPES, E. A.; SOARES, M. S.; PINHEIRO, L. M.; ALBINO, R. E. A.; DIAS, W. M. L.; INÁCIO, F. M.; BORGES, E. J. S. Substâncias de origem vegetal e seu potencial para controlar fitonematoides. In: LOPES, E. A.; FILHO, A. C.; NOBRE, D. A. C.; MENDES, F. Q.; FERNANDES, F. L.; PINTO, F. G.; SILVA, H. G.; TRONTO, J.; VISÔTTO, L. E.; BORGES, P. D.; GOOD-GOD, P. I. V.; RUAS, R. A. A.; NOVAIS, R. F. (org.). **A Química na Produção Vegetal**. Rio Paranaíba: Editora UFV, 2017. cap. 7, p. 227-262.

BORGES, D. F.; MORAES, A. R. F.; SOARES, M. S.; VISÔTTO, L. E.; OLIVEIRA, C. R.; VALENTE, V. M. M. Formulation of botanicals for the control of plant-pathogens: A review. **Crop Protection**, v. 110, p. 135-140, 2018.

BYBD, D. W.; KIRKPATRICK, T.; BARKER, K. R. An improved technique for clearing and staining plant tissues for detection of nematodes. **Journal of Nematology**, v. 15, n. 1, p. 142-143, 1983.

CABONI, P.; NTALLI, N. G. Botanical nematicides, recent findings. In: GROSS, A. D.; COATS, J. R.; DUKE, S. O.; SEIBER, J. N. (org.). **Biopesticides: State of the art**

**and future opportunities.** Washington: Editora American Chemical Society, 2014. cap. 11, p. 145-157.

CARNEIRO, R. M. D. G.; MONTEIRO, J. M. S.; SILVA, U. C.; GOMES, G. Gênero *Meloidogyne*: diagnose através de eletroforese de isoenzimas e marcadores SCAR. In: OLIVEIRA, C. M. G.; SANTOS, M. A.; CASTRO, L. H. S. (org.). **Diagnose de Fitonematoides.** Campinas: Millennium Editora, 2016. cap. 3, p. 47-70.

CRAN. R-4.1.1 for Windows. Disponível em: <<https://cran.rproject.org/bin/windows/base/>>. Acesso em: 18 mar. 2021.

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

CHITWOOD, D. J. Phytochemical based strategies for nematode control. **Annual Review of Phytopathology**, v. 40, n. 1, p. 221-249, 2002.

CLIFF, G. M.; HIRSCHMANN, H. Evaluation of morphological variability in *Meloidogyne arenaria*. **Journal of Nematology**, v. 17, n. 4, p. 445, 1985.

COLEGATE, S. M.; GARDNER, D. R.; JOY, R. J.; BETZ, J. M.; PANTER, K. E. Dehydropyrrolizidine alkaloids, including monoesters with an unusual esterifying acid, from cultivated *Crotalaria juncea* (Sunn Hemp cv. 'Tropic Sun'). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 14, p. 3541-3550, 2012.

CURTO, G.; DALLAVALLE, E.; SANTI, R.; CASADEI, N.; D'AVINO, L.; LAZZERI, L. The potential of *Crotalaria juncea* L. as a summer green manure crop in comparison to Brassicaceae catch crops for management of *Meloidogyne incognita* in the Mediterranean area. **European Journal of Plant Pathology**, v. 142, n. 4, p. 829-841, 2015.

DEVENDRA, B. N.; SRINIVAS, N.; SOLMON, K. S. A comparative pharmacological and phytochemical analysis of *in vivo* & *in vitro* propagated *Crotalaria* species. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 5, n. 1, p. 37-41, 2012.

EL-DEEN, A. H. N.; EL-DEEB, B. A. Effectiveness of silver nanoparticles against root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* infecting tomato under greenhouse conditions. **Journal of Agricultural Science**, v. 10, n. 2, p. 148-156, 2018.

EXPOSITO, L.; LOIOLA, G.; POLISELI, C.; SCUPINARI, T.; VERONEZZI, G.; DIAS, W. P.; HOFFMANN-CAMPO, C. B.; LOPES, I. de O. N.; NUNES, E.O. Extratos de espécies de *Crotalaria* e seu potencial no controle do nematoide de cisto. In: **Embrapa Soja-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: JORNADA ACADÊMICA DA EMBRAPA SOJA, 13., 2018, Londrina. Resumos expandidos... Londrina: Embrapa Soja, 2018., 2018.

FERRAZ, S.; FREITAS, L. G.; LOPES, E. A; DIAS-ARIEIRA, C.R. **Manejo Sustentável de Fitonematoides.** Viçosa: Editora UFV, 2010. 306 p.

FERRAZ, L. C. C. B.; BROWN, D. J. F. **Nematologia de Plantas**: fundamentos e importância. Manaus: Norma Editora, 2016. 251 p.

GARDIANO, C. G.; DALLEMOLE-GIARETTA, R.; LOPES, E. A.; ZOOCA, R. J. F.; FERRAZ, S.; FREITAS, L. G. Atividade nematicida de extratos de sementes de espécies de *Crotalaria* sobre *Meloidogyne javanica*. **Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 4, n. 1, p.3-7, 2010.

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

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

GUO, Q.; DU, G.; QI, H.; ZHANG, Y.; YUE, T.; WANG, J.; LI, R. A nematicidal tannin from *Punica granatum* L. rind and its physiological effect on pine wood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 135, p. 64-68, 2017.

HEFLISH, A. A.; ANSARI, M. J.; DESSOKY, E. S.; ATTIA, A. O.; ELSHAER, M. M.; GABER, M. K.; KORDY, A.; DOMA, A. S.; ABDELKHALEK, A.; BEHIRY, S. I. Green biosynthesized silver nanoparticles mediated by *Acalypha wilkesiana* extract control root-knot nematode. **Journal of King Saud University-Science**, v. 33, n. 6, p. 101516, 2021.

HÖLSCHER, D.; DHAKSHINAMOORTHY, S.; ALEXANDROV, T.; BECKER, M., BRETSCHNEIDER, T.; BUERKERT, A., CRECELIUS, A. C.; WAELE, D.; ELSSEN, A.; HECKEL, D. G.; HEKLAU, H.; HERTWECK, C., KAI, M.; KNOP, K.; KRAFFT, C.; MADDULA, R. K.; MATTHÄUS, C., POPP, J.; SCHNEIDER, B., SCHUBERT, U. S.; SIKORA, R. A.; SVATOŠ, A.; SWENNEN, R. L. Phenalenone-type phytoalexins mediate resistance of banana plants (*Musa* spp.) to the burrowing nematode *Radopholus similis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 1, p. 105-110, 2014.

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

ISMAN, M. B. Plant essential oils for pest and disease management. **Crop Protection**, v. 19, n. 8-10, p. 603-608, 2000.

ISMAN, M. B. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. **Annual Review Entomology**, v. 51, p. 45-66, 2006.

JIA, Z.; TIAN, C. Quantitative determination of polyethylene glycol with modified Dragendorff reagent method. **Desalination**, v. 247, n. 1-3, p. 423-429, 2009.

- JOURAND, P.; RAPIOR, S.; FARGETTE, M.; MATEILLE, T. Nematostatic effects of a leaf extract from *Crotalaria virgulata* subsp. *grantiana* on *Meloidogyne incognita* and its use to protect tomato roots. **Nematology**, v. 6, n. 1, p. 79-84, 2004a.
- JOURAND, P.; RAPIOR, S.; FARGETTE, M.; MATEILLE, T. Nematostatic activity of aqueous extracts of West African *Crotalaria* species. **Nematology**, v. 6, n. 5, p. 765-771, 2004b.
- KALAISELVI, D.; SUNDARARAJ, P.; PREMASUDHA, P.; HAFEZ, S. L. Nematicidal activity of green synthesized silver nanoparticles using plant extracts against root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. **International Journal of Nematology**, v. 22, n. 1, p. 81-94, 2017.
- KUTCHAN, T. M. Ecological arsenal and developmental dispatcher. The paradigm of secondary metabolism. **Plant Physiology**, v. 125, n. 1, p. 58-60, 2001.
- LIU, G.; LAI, D.; LIU, Z. Q.; ZHOU, L.; LIU, L. Z. Identification of nematicidal constituents of *Notopterygium incisum* rhizomes against *Bursaphelenchus xylophilus* and *Meloidogyne incognita*. **Molecules**, v. 21, n. 10, p. 1276, 2016.
- MAXEEMA BIOTECH. **Nematimax**. Disponível em: <<http://www.maxeemabiotech.com/nematimax.html>> Acesso em: 31 jan. 2021.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.
- NAKKA, S.; DEVENDRA, B. N. A rapid *in vitro* propagation and estimation of secondary metabolites for *in vivo* and *in vitro* propagated *Crotalaria* species, a Fabaceae member. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 2, n. 3, p. 897-916, 2012.
- NASCIMENTO, D. D.; VIDAL, R. L.; PIMENTA, A. A.; CASTRO, M. G. C.; SOARES, P.L.M. *Crotalaria* and millet as alternative controls of root-knot nematodes infecting okra. **Bioscience Journal**, v. 36, n. 3, 2020.
- NELMES, A. J. Behavioral responses of *Heterodera rostochiensis* larvae to aldicarb and its sulfoxide and sulfone. **Journal of Nematology**, v. 2, n. 3, p. 223, 1970.
- NTALLI, N.; ADAMSKI, Z.; DOULA, M.; MONOKROUSOS, N. Nematicidal amendments and soil remediation. **Plants**, v. 9, n. 4, p. 429, 2020.
- NTALLI, N. G.; CABONI, P. Botanical nematicides: A review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 40, p. 9929–9940, 2012.
- NTALLI, N. G.; FERRARI, F.; GIANNAKOU, I.; MENKISSOGLU-SPIROUDI, U. Phytochemistry and nematicidal activity of the essential oils from 8 Greek Lamiaceae aromatic plants and 13 terpene components. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 13, p. 7856-7863, 2010.
- ORTUÑO, A.; DIAZ, L.; PEREZ, I.; SANCHEZ, F.; DEL RIO, A. Active Compounds from *Limonium insigne* and Alternative Methods for its Micropropagation. **Scientia Horticulturae**. v. 230, p. 78-85, 2018.

OSEI, K.; GOWEN, S. R.; PEMBROKE, B.; BRANDENBURG, R. L.; JORDAN, D. L. Potential of leguminous cover crops in management of a mixed population of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). **Journal of Nematology**, v. 42, n. 3, p. 173, 2010.

PAVARAJ, M.; BAKAVATHIAPPAN, G.; BASKARAN, S. Evaluation of some plant extracts for their nematicidal properties against root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. **Journal of Biopesticides**, v. 5 (Supplim), p. 106–110, 2012.

PENCE, V. C. Evaluating costs for the in vitro propagation and preservation of endangered plants. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 47, n. 1, p. 176-187, 2011.

PILBEAM, D. J.; LYON-JOYCE, A. J.; BELL, E. A. Occurrence of the pyrrolizidine alkaloid monocrotaline in *Crotalaria* seeds. **Journal of Natural Products**, v. 46, n. 5, p. 601-605, 1983.

ROCHA, F. S.; CAMPOS, V. P. Efeito de exsudatos de cultura de células de plantas em juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne incognita*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n. 3, p. 294-299, 2004.

RUDNICK, V. S. Estratégias de controle para nematoide das galhas (*Meloidogyne incognita*) no cafeeiro. 2020. Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia) – Núcleo de Ciências Exatas e da Terra, Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, RO, 2020.

SILVA, A. C.; LIMA, R. A Identificação das classes metabólitos secundários no extrato etanólico dos frutos e folhas de *Eugenia uniflora* L. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 20, p. 381-388, 2016.

SILVA, R. A.; NUNES, N. A.; SANTOS, T. F. S.; IWANO, F. K. Efeito da rotação e sucessão de culturas no manejo de nematoides da soja em área arenosa. **Nematropica**, v. 48, n. 2, p. 198-206, 2018.

SAKAMOTO, S.; NAGAMITSU, R.; NAGAMITSU, G.; MIYAMOTO, T.; TANAKA, H.; MARIMOTO, S. Ultrasensitive immunoassay for monocrotaline using monoclonal antibody produced by N, N'-carbonyldiimidazole mediated hapten-carrier protein conjugates. **Talanta**, v. 168, p. 67-72, 2017.

SCUPINARI, T., RUSSO, H. M.; FERRARI, A. B. S.; BOLZANI, V. S.; DIAS, W. P.; NUNES, E. O.; HOFFMANN-CAMPO, C. B.; ZERAIL, M. L. *Crotalaria spectabilis* as a source of pyrrolizidine alkaloids and phenolic compounds: HPLC-MS/MS dereplication and monocrotaline quantification of seed and leaf extracts. **Phytochemical Analysis**, v. 31, n. 6, p. 747-755, 2020.

SIKOLIA, S. F.; OMONDI, S. Phytochemical analysis of some selected plants and families in the university botanic garden Of Maseno, Kenya. **IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences**, v. 12, n. 4, p. 31-38, 2017.

TAYLOR, A. L.; SASSER, J. N. Biology, identification and control of root-knot nematodes. **North Carolina State University Graphics**, v. 111, 1978.

THODEN, T. C.; BOPPRÉ, M.; HALLMANN, J. Effects of pyrrolizidine alkaloids on the performance of plant-parasitic and free-living nematodes. **Pest Management Science**, v. 65, n. 7, p. 823-830, 2009.

THODEN, T.; BOPPRÉ, M. Plants producing pyrrolizidine alkaloids: sustainable tools for nematode management? **Nematology**, v. 12, n. 1, p. 1-24, 2010.

WANG, K. H.; MCSORLEY, R.; GALLAHER, R. N. Effect of *Crotalaria juncea* amendment on squash infected with *Meloidogyne incognita*. **Journal of Nematology**, v. 36, n. 3, p. 290, 2004.

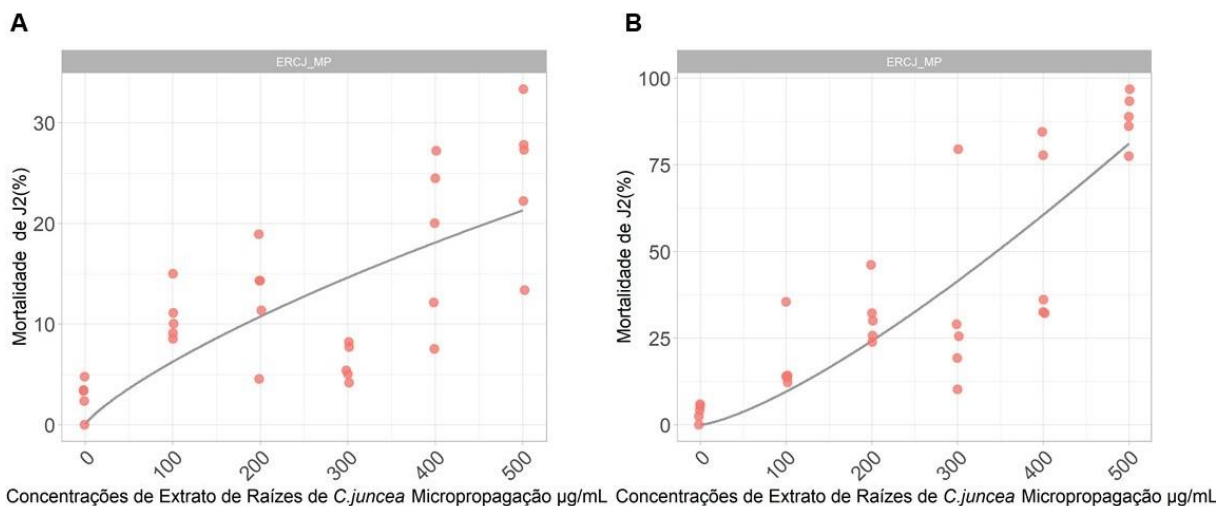
WANG, K. H.; SIPES, B. S.; SCHMITT, D. P. *Crotalaria* as a cover crop for nematode management: a review. **Nematropica**, v. 32, n. 1, p. 35-58, 2002.

WEN, Y.; MEYER, S. L. F.; MASLER, E. P.; ZHANG, F.; LIAO, J.; WEI, X.; CHITWOOD, D. J. Nematotoxicity of drupacine and a *Cephalotaxus* alkaloid preparation against the plant-parasitic nematodes *Meloidogyne incognita* and *Bursaphelenchus xylophilus*. **Pest Management Science**, v. 69, n. 9, p. 1026-1033, 2013.

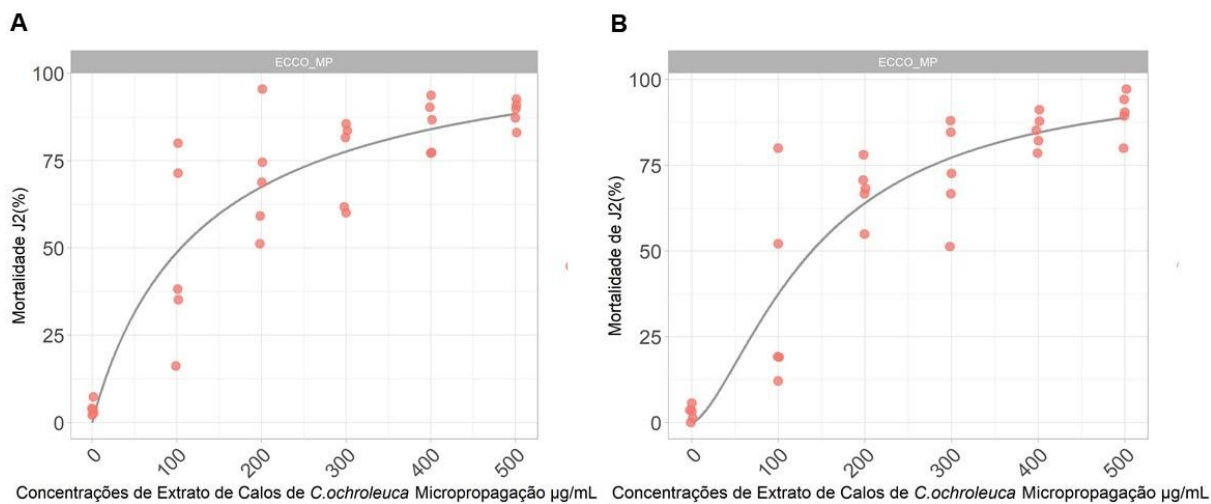
WILLIAMS, M. C.; MOLYNEUX, R. J. Occurrence, concentration, and toxicity of pyrrolizidine alkaloids in *Crotalaria* seeds. **Weed Science**, v. 35, n. 4, p. 476-481, 1987.

## Apêndice A

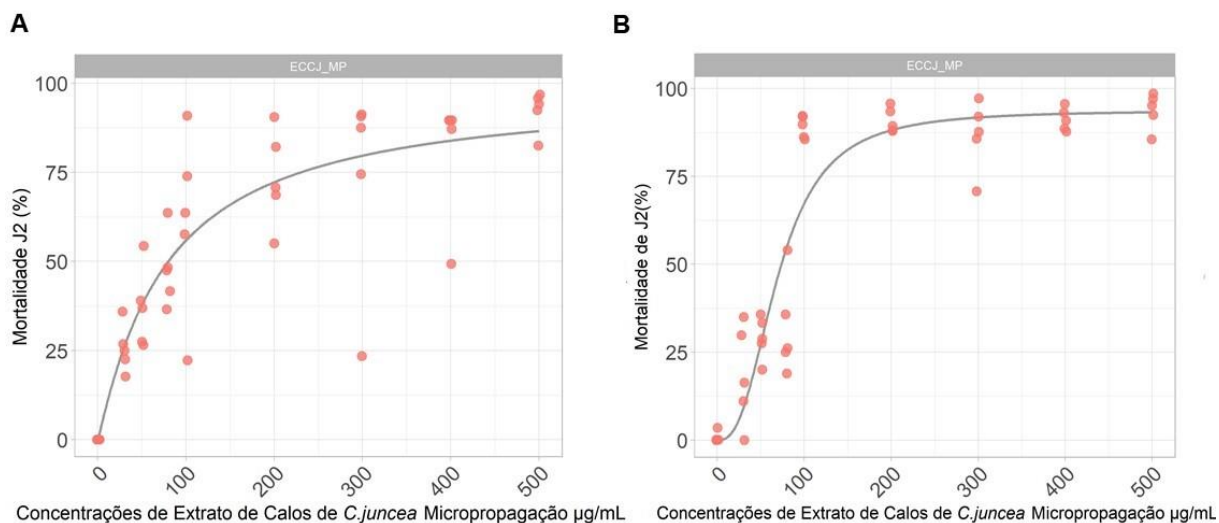
### Toxicidade dos extratos de *Crotalaria* spp. a J2 de *M. javanica* após 24 e 48 horas de incubação



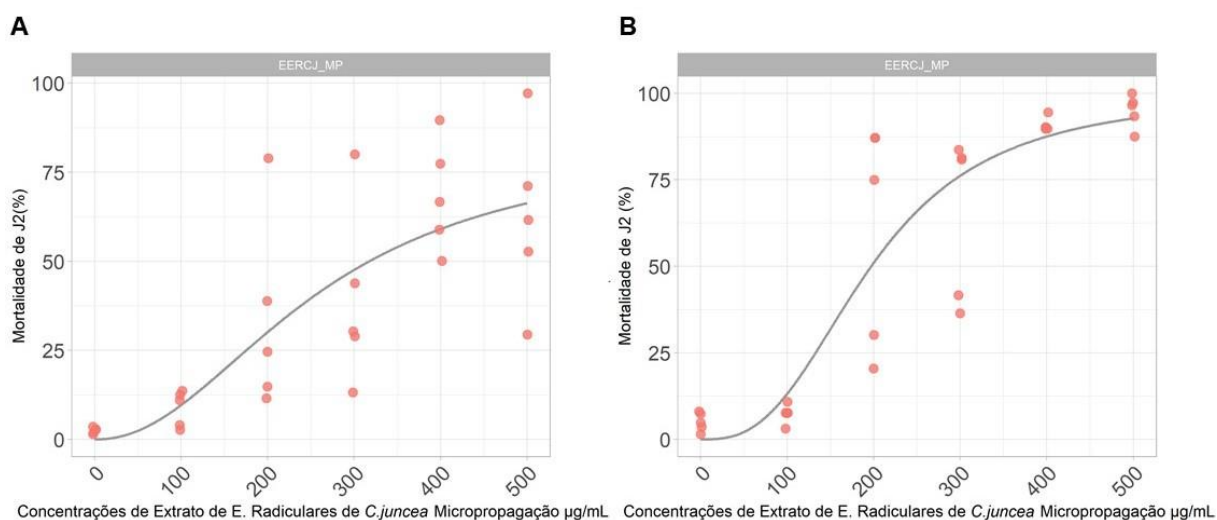
**Figura 7.** Toxicidade dos extratos de *Crotalaria* spp. a juvenis de segundo estágio (J2) de *M. javanica*. Curva de mortalidade de *M. javanica* tratados com 0, 100, 200, 300, 400 e 500 µg mL<sup>-1</sup> de (A) ERCJ\_MP (extrato de raízes de *C. juncea* micropropagada) após 24h de incubação. (B) ERCJ\_MP (extrato de raízes de *C. juncea* micropropagada) após 48h de incubação. Cada ponto em vermelho em cada gráfico indica a porcentagem de mortalidade observada em cada parcela experimental.



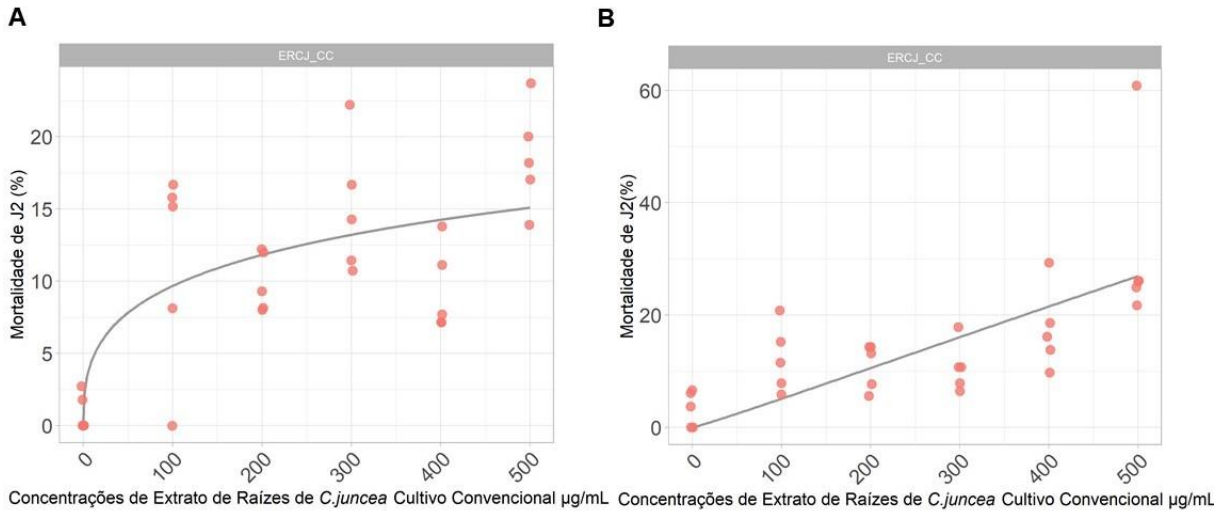
**Figura 8.** Toxicidade dos extratos de *Crotalaria* spp. a juvenis de segundo estágio (J2) de *M. javanica*. Curva de mortalidade de *M. javanica* tratados com 0, 100, 200, 300, 400 e 500 µg mL<sup>-1</sup> de (A) ECCO\_MP (extrato de calos de *C. ochroleuca* micropropagada) após 24h de incubação. (B) ECCO\_MP (extrato de calos de *C. ochroleuca* micropropagada) após 48h de incubação. Cada ponto em vermelho em cada gráfico indica a porcentagem de mortalidade observada em cada parcela experimental.



**Figura 9.** Toxicidade dos extratos de *Crotalaria* spp. a juvenis de segundo estágio (J2) de *M. javanica*. Curva de mortalidade de *M. javanica* tratados com 0, 100, 200, 300, 400 e 500 µg mL<sup>-1</sup> de (A) ECCJ\_MP (extrato de calos de *C. juncea* micropropagada) após 24h de incubação. (B) ECCJ\_MP (extrato de calos de *C. juncea* micropropagada) após 48h de incubação. Cada ponto em vermelho em cada gráfico indica a porcentagem de mortalidade observada em cada parcela experimental.



**Figura 10.** Toxicidade dos extratos de *Crotalaria* spp. a juvenis de segundo estágio (J2) de *M. javanica*. Curva de mortalidade de *M. javanica* tratados com 0, 100, 200, 300, 400 e 500 µg mL<sup>-1</sup> de (A) EERCJ\_MP (extrato de exsudatos radiculares de *C. juncea* micropropagada) após 24 h de incubação. (B) EERCJ\_MP (extrato de exsudatos radiculares de *C. juncea* micropropagada) após 48h de incubação. Cada ponto em vermelho em cada gráfico indica a porcentagem de mortalidade observada em cada parcela experimental.



**Figura 11.** Toxicidade dos extratos de *Crotalaria* spp. a juvenis de segundo estágio (J2) de *M. javanica*. Curva de mortalidade de *M. javanica* tratados com 0, 100, 200, 300, 400 e 500 µg mL<sup>-1</sup> de **(A)** ERCJ\_CC (extrato de raízes de *C. juncea* cultivo convencional) após 24h de incubação. **(B)** ERCJ\_CC (extrato de raízes de *C. juncea* cultivo convencional) após 48h de incubação. Cada ponto em vermelho em cada gráfico indica a porcentagem de mortalidade observada em cada parcela experimental.