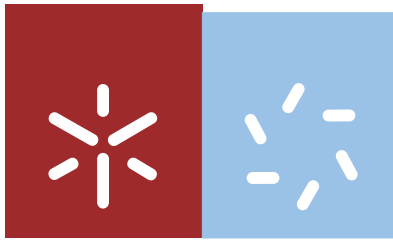


**Universidade do Minho**  
Escola de Ciências

Cláudia Isabel Couto Arantes Vieira da Silva

**Nematodocidas botânicos no controlo  
do nemátode-das-galhas-radiculares,  
*Meloidogyne javanica***



**Universidade do Minho**

Escola de Ciências

Cláudia Isabel Couto Arantes Vieira da Silva

**Nematodocidas botânicos no controlo  
do nemátode-das-galhas-radiculares,  
*Meloidogyne javanica***

Dissertação de Mestrado  
Mestrado em Biotecnologia e Bioempendedorismo  
em Plantas Aromáticas e Medicinais

Trabalho realizado sob a orientação da  
**Doutora Maria Teresa Silva Craveiro Martins Almeida**  
e co-orientação do  
**Doutor Manuel Ferreira**

Outubro de 2012

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO PARCIAL DESTA TESE APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE;

Universidade do Minho, \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

## Agradecimentos

À minha orientadora Doutora Maria Teresa Almeida pela valiosa ajuda prestada durante todo o mestrado. Por toda a amizade, paciência e dedicação, bem como pelo apoio na redacção e revisão desta tese. Muito contribuiu para a minha formação profissional e pessoal.

Ao Doutor Manuel Ferreira, meu co-orientador pela ajuda dada na elaboração da tese.

À Doutora Isabel Abrantes e à Doutora Carla Maleita, do Instituto do Mar – Centro do Mar e Ambiente, Departamento de Zoologia da Universidade de Coimbra pela atenção e enorme disponibilidade, pela cedência, com a maior prontidão, dos isolados de *Meloidogyne javanica* utilizados nos ensaios.

De igual modo não posso deixar de agradecer à Doutora Isabel Cristina Galhano, da Escola Superior Agrária de Coimbra, e à Doutora Cláudia Pascoal, do Departamento de Biologia da Universidade do Minho por todos os conselhos no tratamento estatístico.

O meu agradecimento ao Doutor António Xavier Pereira Coutinho, do Departamento de Ciências da Vida na Faculdade de Ciência e Tecnologia, da Universidade de Coimbra, pela disponibilidade demonstrada aquando da identificação das plantas; ao Sr. Saúl Sendas, de Departamento de Ciências da Terra, da Universidade do Minho, pela amabilidade e boa disposição que evidenciou sempre que necessitei da sua colaboração.

A todas as pessoas que trabalham no Departamento de Biologia, nomeadamente a Cristina Ribeiro, a Manuela Teixeira, a Manuela Rodrigues, a Magda Graça e o Amaro Rodrigues, pela simpatia e disponibilidade.

Não posso deixar de manifestar o meu apreço à Rose Sousa, preciosa ajuda no Laboratório de Biologia Vegetal, pela sua paciência e dedicação.

À Sementeira Alípio Dias & Irmão, Lda pela gentileza que demonstraram ao oferecerem as sementes de tomateiro solicitadas.

A todos os meus amigos e colegas de laboratório, especialmente a Gela, a Teresa, a Joana, a Juliana, o Artur e a Elisabete, por todos os momentos de camaradagem, apoio, desabafos e risos.

Por último, mas não de menos importância, aos meus pais e irmã, pois sempre estiveram ao meu lado com uma boa dose de paciência e ternura, assim como à minha madrinha, pela sua generosidade e boa palavra.

# RESUMO

Muitas das culturas com importância económica são afectadas por nemátodes parasitas das plantas. Entre estes estão os nemátodes-das-galhas-radiculares (NGR), *Meloidogyne* spp., que são os que causam mais prejuízos, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais. *Meloidogyne javanica* uma das espécies mais importantes, pois para além do grande número de culturas que infecta, e do seu efeito patogénico, oferece grandes dificuldades ao seu combate eficaz.

Existem actualmente diversos métodos de controlo destes nemátodes, sendo o uso de químicos o mais eficaz. No entanto, o recurso a estes compostos, altamente tóxicos, foi sendo restringido estando mesmo proibido nalguns casos. Por este motivo é necessário investir na procura de alternativas naturais. As plantas aromáticas e medicinais produzem compostos aleloquímicos que podem ser tóxicos para os nemátodes. Por este motivo, a investigação sobre a acção destas plantas sobre os nemátodes fitoparasitas tem vindo a aumentar.

Neste trabalho pretendeu-se avaliar o possível efeito de algumas plantas, como o funcho (*Foeniculum vulgare*), kiwi (*Actinidia deliciosa*), salsa (*Petroselinum crispum*) e urtiga (*Urtica dioica*) sobre: a) a eclosão e a mortalidade de jovens do segundo estágio (J2) de *M. javanica*, na forma de extrato aquoso; b) a eclosão e a mortalidade de J2 de *M. javanica*, sob o efeito de óleos essenciais; c) a penetração de J2 nas raízes de tomateiro, ao fim de 7 dias, colocando uma pequena camada da parte aérea da planta a testar sobre o solo; d) a população final ao fim de 30 dias, colocando sobre o solo uma pequena camada da parte aérea (triturada) de cada planta. Dos extratos aquosos testados os que tiveram um efeito mais acentuado e significativo foram o de funcho e o de urtiga. Na concentração mais elevada (4 mg/ml) a percentagem de inibição da eclosão cumulativa no funcho foi 35% e, na mortalidade, foi 100%; na urtiga a percentagem de inibição da eclosão cumulativa foi 45% e, na mortalidade, a percentagem foi de 92,9%, para a mesma concentração. Os óleos essenciais testados mostraram ter acção nematotóxica e nematocida sobre os J2 de *M. javanica*. No óleo essencial de funcho, a maior percentagem de inibição da eclosão cumulativa foi 69,1%, registada na concentração de 2000 ppm e a percentagem de mortalidade cumulativa foi 95,88%, na concentração de 3000 ppm. No óleo essencial de salsa, a percentagem da inibição da eclosão foi superior a 90% para todas as concentrações testadas e a percentagem de mortalidade foi 100% em todas as concentrações. Todas as plantas testadas (por aplicação directa da parte aérea no solo) demonstraram ter acção sobre a penetração dos J2 de *M. javanica* nas raízes de tomateiro. A urtiga foi a planta que mais efeito teve sobre a população total no final do ensaio, com o factor de reprodução (FR) <1.

De acordo com os resultados obtidos, o funcho, a salsa e a urtiga, possuem actividade nematotóxica e nematocida. Apenas o kiwi não demonstrou resultados tão significativos. No entanto, as plantas testadas parecem ser promissoras no controlo de nemátodes fitoparasitas, podendo o seu uso constituir uma alternativa natural ao uso de químicos no controlo de nemátodes parasitas de plantas

**Palavras-chave:** *Actinidia deliciosa*, biopesticidas, eclosão, extratos, fitonemátodes, *Foeniculum vulgare*, mortalidade, óleos essenciais, *Petroselinum crispum*, toxicidade, *Urtica dioica*

# ABSTRACT

Many of the cultures with economical impact are affected by plant parasitic nematodes. Among these are the root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp., which are responsible for the greater damage, mainly in tropical and subtropical regions. One of the most important species of plant parasitic nematodes is *Meloidogyne javanica*, which may affect a large number of cultures and it is very difficult to fight, given its huge pathogenic effect.

There are various control methods, including the use of chemicals. However, the use of this highly toxic method has been restricted and even prohibited in some cases. Thus, the search for natural alternatives has been essential. It is well known that aromatic and medicinal plants produce diverse allelochemical compounds that can be toxic to nematodes. Therefore, studies about the effect of these plants on nematodes are currently increasing.

The purpose of this work was to evaluate the effect of some plants, namely: the fennel (*Foeniculum vulgare*), kiwi (*Actinidia deliciosa*), parsley (*Petroselinum crispum*) and nettle (*Urtica dioica*) on: a) hatching and mortality of second stage juvenile (J2) *M. javanica* under aqueous extract; b) hatching and mortality of J2 *M. javanica* under the essential oils; c) tomato root penetration of J2 after 7 days, through directly placing on the soil a small thin layer of the aerial portions of the testing plant species; d) the final population 30 days after the action, of a placing thin layer of the testing plant species on the soil. Of the tested aqueous extracts, the fennel and the nettle showed a more significant and pronounced effect. At the highest concentration (4 mg/ml), the percentage of cumulative inhibition of hatching was 35% and mortality was 100% for fennel, and for nettle was 45% for cumulative inhibition of hatching and 92,9% for mortality. The tested essential oils showed nematotoxic and nematicidal properties on the J2. With regard to fennel essential oil, the highest percentage of cumulative hatching inhibition was 69,1%, recorded at concentration of 2000 ppm, and the cumulative mortality percentage was 95,9, at the concentration of 3000 ppm. With respect to the parsley essential oil, the percentage of cumulative hatching inhibition was greater than 90% and the mortality percentage was 100% for all tested concentrations. All plant species showed some action on tomato root penetration of J2. The plant that had more effect on the total population was the nettle, with a reproduction factor (RP) <1.

According to the results, the fennel, the parsley and the nettle have nematotoxic and nematicidal properties. Kiwi was the only plant not showing significant statistic results. Nevertheless, all tested plants seem to be promising, as natural alternative to chemical products on the control of plant parasitic nematodes.

**Key words:** *Actinidia deliciosa*, biopesticides, essential oils, fitonematodes, *Foeniculum vulgare*, hatching, mortality, *Petroselinum crispum*, toxicity, *Urtica dioica*

# Índice

Resumo	iv
Abstract	v
<b>I. Introdução</b>	<b>1</b>
1. Considerações gerais	2
2. Nemátodes-das-galhas-radiculares <i>Meloidogyne javanica</i>	4
3. Estratégias de controlo de nemátodes fitoparasitas	6
4. Utilização de plantas no controlo de nemátodes fitoparasitas	9
4.1 Funcho	11
4.2 Kiwi	12
4.3 Salsa	12
4.4 Urtiga	13
5. Objectivos	13
<b>II. Material e Métodos</b>	<b>15</b>
1. Manutenção e multiplicação do isolado de <i>Meloidogyne javanica</i>	16
1.1 Obtenção dos isolados	16
1.2 Obtenção das plantas de tomateiro	16
1.3 Manutenção e multiplicação do isolado de <i>Meloidogyne javanica</i>	16
2. Obtenção das plantas, dos óleos essenciais e dos extratos	17
2.1 Obtenção das plantas	17
2.2 Obtenção dos óleos essenciais	18
2.3 Obtenção dos extratos aquosos	18
2.4 Extração dos compostos da infusão	18
3. Obtenção de ovos e jovens de <i>Meloidogyne javanica</i>	19
4. Efeito dos extratos	20
4.1 Na eclosão de jovens de segundo estágio de <i>Meloidogyne javanica</i>	20
4.2 Na mortalidade de jovens de segundo estágio de <i>Meloidogyne javanica</i>	22
5. Efeito do óleo essencial	23

5.1 Na eclosão de jovens de segundo estágio de <i>Meloidogyne javanica</i>	23
5.2 Na mortalidade de jovens de segundo estágio de <i>Meloidogyne javanica</i>	24
6. Acção da aplicação directa no solo da parte aérea das plantas	24
6.1 Efeito na penetração de jovens de segundo estágio de <i>Meloidogyne javanica</i> em raízes de tomateiro	24
6.2. Efeito na população final de <i>Meloidogyne javanica</i>	26
<b>III. Resultados</b>	28
1. Efeito dos extratos das plantas sobre <i>Meloidogyne javanica</i>	29
1.1 Extrato aquoso de <i>Foeniculum vulgare</i>	29
1.1.1 Na eclosão de jovens de segundo estágio	29
1.1.2 Na mortalidade de jovens de segundo estágio	31
1.2 Extrato aquoso de <i>Actinidia deliciosa</i>	32
1.2.1 Na eclosão de jovens de segundo estágio	32
1.2.2 Na mortalidade de jovens de segundo estágio	34
1.3 Extrato aquoso de <i>Petroselinum crispum</i>	36
1.3.1 Na eclosão de jovens de segundo estágio	36
1.3.2 Na mortalidade de jovens de segundo estágio	37
1.4 Extrato aquoso de <i>Urtica dioica</i>	39
1.4.1 Na eclosão de jovens de segundo estágio	39
1.4.2 Na mortalidade de jovens de segundo estágio	41
2. Efeito do óleo essencial de funcho e de urtiga sobre <i>Meloidogyne javanica</i>	42
2.1 Óleo essencial de <i>Foeniculum vulgare</i>	42
2.1.1 Eclosão de jovens de segundo estágio	42
2.1.2 Mortalidade de jovens de segundo estágio	44
2.2 Óleo essencial de <i>Petroselinum crispum</i>	46
2.2.1 Eclosão de jovens de segundo estágio	46
2.2.2 Mortalidade de jovens de segundo estágio	48
3. Efeito da aplicação directa no solo da parte aérea das plantas	49
3.1 Penetração de jovens de segundo estágio de <i>Meloidogyne javanica</i> em raízes de tomateiro	49
3.2 População final de <i>Meloidogyne javanica</i> em raízes de tomateiro	51



<b>IV. Discussão</b>	53
1. Efeito dos extratos aquosos das diferentes plantas sobre <i>Meloidogyne javanica</i>	54
2. Efeito dos óleos essenciais de funcho e de salsa sobre <i>Meloidogyne javanica</i>	57
3. Avaliação da acção da aplicação directa da parte aérea das plantas na penetração de jovens de segundo estágio de <i>Meloidogyne javanica</i> em tomateiro	59
4. Avaliação da acção da aplicação directa da parte aérea das plantas na população final de <i>Meloidogyne javanica</i> em tomateiro	59
<b>V. Considerações finais</b>	61
<b>VI. Referências Bibliográficas</b>	63

# Introdução

---

# I - Introdução

## 1. Considerações gerais

Os nemátodes constituem um dos maiores grupos do reino animal, sendo os invertebrados do solo mais numerosos; o filo Nemata inclui os organismos que ocupam o maior número de habitats, a seguir ao filo dos artrópodes. Uma grande parte dos nemátodes apresentam um tipo de vida livre, quer em ambientes aquáticos quer no solo, enquanto outros são parasitas de animais ou de plantas. Embora se consigam mover apenas alguns metros por ano, os nemátodes podem atingir longas distâncias através do transporte por águas correntes ou por meio de outros animais, podendo mesmo chegar a atravessar oceanos por tempestades de areia. Mesmo chegando a um consenso relativamente à amplitude do grupo, o número estimado de espécies de nemátodes ainda não foi possível de determinar (Viglierchio, 1991; De Ley & Blaxter, 2002). Segundo o que é considerado o pai da nematologia, Coob, 1914: “se toda a matéria do mundo, excepto os nemátodes, fosse varrida, o nosso mundo ainda seria reconhecível”. Apesar do seu elevado número, passam geralmente despercebidos uma vez que a maioria tem dimensão microscópica. São organismos estruturalmente simples variando muito no seu comprimento (podendo medir entre 80  $\mu$ m a 80 m), com forma geralmente cilíndrica assemelhando-se a anelídeos mas sem segmentação, sendo fusiformes, filiformes ou esféricos. No entanto os parasitas, podem assumir formas diferentes: de pera, de limão ou globular (Maggenti, 1981; Viglierchio, 1991).

De entre todas as espécies descritas, cerca de 20% são parasitas de plantas ou fitonemátodes. Nos países desenvolvidos, entre 5 a 10% da produção agrícola é perdida devido a este tipo de nemátodes, atingindo percentagens superiores em países menos desenvolvidos. Um exemplo que pode ser citado é o do colapso da indústria do açúcar de beterraba na Alemanha, por volta de 1850, devido a um nemátode formador de quistos, *Heterodera schachtii*, apesar de inicialmente se terem atribuído as perdas ao “solo cansado” (Taylor, 1978; Maggenti, 1981; Viglierchio, 1991; Weischer, 2001).

Os nemátodes fitoparasitas podem ser genericamente organizados consoante a parte da planta onde preferem estabelecer-se como as raízes, os caule e as folhas, e na forma como

---

parasitam, podendo ser ectoparasitas, se o seu ciclo de vida se completa fora da planta, ou endoparasitas, se pelo menos a sua fase reprodutiva ocorre no interior dos tecidos vegetais. A principal característica dos nemátodes fitoparasitas é a presença de um estilete bucal, que é utilizado para perfurar a parede das células vegetais. Após a perfuração da parede, injectam secreções produzidas por glândulas esofágicas e que contêm enzimas que liquefazem o interior da célula, sugando grande parte do conteúdo celular através do bulbo (Maggenti, 1981; Viglierchio, 1991; Weischer, 2001).

O grupo de nemátodes parasitas de plantas com maior importância económica em todo o mundo é o das espécies do género *Meloidogyne*, ou como são mais vulgarmente conhecidos, nemátodes-das-galhas-radiculares (NGR). São endoparasitas sedentários, que se podem encontrar em climas temperados, tropicais e subtropicais. Neste género as espécies que infectam o maior número de culturas são a *M. arenaria* (Neal, 1889) Chitwood, 1949, a *M. hapla* Chitwood, 1949, *M. incógnita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1949 e a *M. javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949. Para além do grande número de culturas que infecta e do seu efeito patogénico, são muito difíceis de combater eficazmente, o que as torna num grupo particularmente importante dentro dos nemátodes fitoparasitas (Sasser, 1980; Abrantes, 2007). A infecção das culturas por este nemátode resulta numa perda económica muito grande, para além de uma produção reduzida, os produtos agrícolas perdem qualidade visual (o que faz baixar o preço) (Hussey, 1985).

Uma planta susceptível infectada por *M. javanica*, para além da formação de células gigantes e de galhas (Fig. 2), tem o seu sistema radicular bastante mais reduzido do que o de uma planta não infectada, apresentando poucas ramificações e muitas raízes secundárias, sendo o crescimento da parte aérea proporcional ao da raiz. A planta não consegue obter do solo quer a água, quer os nutrientes de que necessita devido à ineficiência de absorção da raiz. Os sintomas observáveis geralmente são o fraco desenvolvimento da parte aérea, a murchidão da planta em tempo seco, entre outros sintomas associados à carência de água e de nutrientes. Por essa razão, na maioria das vezes torna-se difícil avaliar se uma planta/ campo se encontra infectado/ infestado por *M. javanica*, recorrendo somente à visualização da parte aérea. Para se poder confirmar a presença deste nemátode é necessário observar a olho nu a parte radicular para verificar a presença de galhas e ao microscópio estereoscópico. A espécie terá que ser confirmada por microscopia óptica e/ou por testes fisiológicos, químicos e de biologia molecular.

Frequentemente associados ao fitonemátode encontram-se outros agentes infecciosos, tais como fungos (ex: *Fusarium*) e bactérias (ex: *Pseudomonas*) (Hussey, 1985; Mai, 1985; Taylor, 1978; Abrantes, 2007).



**Figura 1.** Raiz de *Solanum lycopersicum* infectada por *M. javanica* 60 dias após a inoculação com 5 massas de ovos

O controlo dos nemátodes do género *Meloidogyne*, nomeadamente a *M. javanica*, é necessário essencialmente por motivos económicos, não só devido às perdas de rentabilidade das culturas, mas também porque o produtor muitas vezes acaba por utilizar quantidades exageradas de fertilizantes e de água. É necessário recorrer ao método mais eficiente para reduzir a população de fitonemátodes para níveis que não sejam prejudiciais. As medidas a adoptar deverão ter em consideração o factor económico, ser eficazes e específicas, e não ter efeitos nocivos sobre o ambiente. (Taylor, 1978; Sasser, 1985; Abrantes, 2007).

## **2. Nemátode das galhas radiculares *Meloidogyne javanica***

A espécie *M. javanica* é um endoparasita sedentário e o seu ciclo de vida, assim como o das outras espécies de *Meloidogyne*, pode ser classificado em pré-parasitário e parasitário. O ciclo de vida pode completar-se entre 22 a 30 dias, em condições favoráveis, com temperaturas entre os 25 e os 30 °C, e inicia-se no ovo, normalmente no estágio unicelular. Os ovos são depositados por uma fêmea que se encontra no interior da raiz de uma planta hospedeira. Em média, cada fêmea pode depositar 400 a 500 ovos, que ficam aglomerados numa massa

---

gelatinosa, junto do corpo da fêmea mas no exterior da raiz. Para além de proteger os ovos contra ataques de predadores, a matriz que os envolve actua como sinalizador de eventuais condições externas desfavoráveis. Se houver um défice hídrico acentuado, a massa fica desidratada, e o desenvolvimento embrionário dentro do ovo fica suspenso (Ferraz, 2001). Os ovos iniciam o seu desenvolvimento algumas horas depois da sua deposição até formarem um juvenil de 1º estágio ou J1. Em seguida ocorre a primeira muda ou ecdise, ainda dentro do ovo, dando origem ao jovem de 2º estágio, ou J2. É nesta forma que o jovem eclode, empurrando repetidamente o estilete na extremidade do ovo até abrir um pequeno orifício. Quando abandonam a massa de ovos, os J2 dispersam no solo, afastando-se apenas alguns centímetros, sendo posteriormente guiados por alguns compostos que emanam das raízes das plantas. Logo após a penetração inicia-se a fase parasitária do ciclo de vida. Os J2 penetram pela extremidade da raiz até ao cilindro vascular, onde se fixam. Para se alimentarem, perfuram a parede celular com o estilete, e injectam secreções esofágicas. Estas secreções vão provocar um aumento de volume das células no cilindro vascular e aumentar a taxa de divisão celular no periciclo, dando origem a células cenocíticas, também designadas por células gigantes. Ao mesmo tempo, em redor da cabeça do juvenil ocorre uma intensa multiplicação celular (hiperplasia). Estas modificações normalmente são acompanhadas por um alargamento da raiz nesta zona, formando uma galha (Taylor, 1978; Maggenti, 1981; Sasser, 1985; Eisenback, 1991; Ferraz, 2001)

Enquanto se formam as células gigantes e as galhas, o jovem continua a alimentar-se, alargando o seu diâmetro. É nesta fase que se dão a terceira e a quarta mudas até ser atingido o estado adulto, diferenciando-se então em macho ou fêmea, nesta fase o processo de alimentação é interrompido. Como a reprodução se dá por partenogénese (mitótico), o número de machos é normalmente muito reduzido, variando consoante as condições ambientais, como a disponibilidade de alimento (uma vez que aparentemente não se alimentam) entre outros factores (Taylor, 1978; Maggenti, 1981; Sasser, 1985; Abrantes, 2007).

A morfologia entre machos e fêmeas de *M. javanica* é distinta. Os machos são filiformes, com o corpo delgado, sendo mais arredondados na parte posterior. Têm estilete bem desenvolvido, a sua cauda é curta e sem bursa, com espículas bem visíveis na extremidade. A sua sobrevivência provavelmente não é muito extensa, durando apenas algumas semanas. As fêmeas são globosas, com o corpo de cor esbranquiçada e brilhante e com um pescoço saliente

---

e simétrico. O estilete, o bulbo esofágico e o canal excretor, são normalmente visíveis. Conseguem produzir ovos durante dois a três meses, podendo permanecer vivas durante algum tempo (meses) depois de cessarem a deposição dos ovos (Taylor, 1978; Sasser, 1985; Weischer, 2001).

### **3. Estratégias de controlo de nemátodes fitoparasitas**

As primeiras tentativas para controlar os fitonemátodes foram feitas por Kühn (1871). Para além da tradicional rotatividade de culturas, também tentou a fumigação do solo com carbono dissulfido. Kühn estudou igualmente a viabilidade de culturas intercalares e armadilha. As primeiras consistem em plantas que atraem os nemátodes para as suas raízes e, que por vários mecanismos de inibição, não permitem que o nemátode se desenvolva ou se reproduza. As segundas são plantas que atraem o nemátode, sendo boas hospedeiras; são plantadas por um curto período de tempo na área afectada, sendo removidas após a invasão mas antes da deposição dos ovos ter iniciado. Este parece ser um método eficaz e económico, no entanto requer uma vigilância rigorosa, uma vez que se a planta permanecer demasiado tempo no solo, a população de *Meloidogyne* ao invés de diminuir pode aumentar consideravelmente (Maggenti, 1981; Viglierchio, 1991).

Das diversas práticas existentes, existem algumas mais eficazes do que outras, nem sempre sendo, algumas, a melhor opção económica ou ambiental. Um dos factores a ter em consideração, é que *M. javanica* poderá estar não somente no solo mas, também, em sementes, nos rebentos, tubérculos e outras plantas a transplantar (Taylor, 1978). Se um solo não cultivado for tratado para a diminuição da população de nemátodes, for semeado/ plantado com sementes/ plantas infectadas, esse tratamento terá sido em vão.

Algumas das práticas remontam já a tempos muito antigos, como a rotação de culturas, outras são mais recentes, como o uso de pesticidas ou de variedades geneticamente modificadas resistentes à infecção por nemátodes.

A rotação de culturas envolve sempre uma variedade mais lucrativa intercalada com outra, que embora de menor valor comercial, é resistente à infecção pelo nemátode. Embora haja estudos que confirmam que a rotatividade por 4 anos é largamente mais vantajosa do que

---

por 2 ou 3 anos, sabe-se que nem sempre é lucrativo, o que leva a alguma resistência por parte dos agricultores. Actualmente, sabe-se que este método é eficaz, porque se baseia no conhecimento de que os J2 de *Meloidogyne* spp., quando eclodem têm uma reserva energética limitada e não conseguem deslocar-se a distâncias superiores a 50 cm. Se não encontrarem uma raiz em que se possam alimentar, ficam exaustos e perdem a capacidade de penetração, tornando-os não infectivos. Uma população de *Meloidogyne* spp. num campo sem plantas hospedeiras irá tornar-se não infectiva ou então os nemátodes morrerão de fome, reduzindo o seu número substancialmente, para um nível considerado aceitável. Para este método resultar, o controlo de ervas daninhas tem que ser feito, uma vez que existem algumas variedades susceptíveis à infecção por fitonemátodes. Terá ainda que ser exercida uma vigilância do solo para que quando a cultura mais lucrativa (normalmente a mais susceptível) for plantada, a população de *M. javanica* esteja no seu nível mais baixo. O uso de plantas geneticamente modificadas, intercaladas com as culturas de interesse, chegou a ser utilizado nos finais de século XIX e início do século XX, mas caiu em desuso devido ao aparecimento de outras técnicas, nomeadamente o uso de químicos (Taylor, 1978; Sasser, 1985; Viglierchio, 1991). No entanto, nos últimos anos, o desenvolvimento de plantas melhoradas geneticamente tem ganho terreno, apesar do seu uso ainda ser muito controverso devido ao desconhecimento sobre futuras implicações.

O uso de nematocidas químicos e fumigantes, apesar de serem eficazes e inicialmente economicamente atraentes, o seu uso foi sendo restringido até actualmente a maioria ser proibida. Os fumigantes, apesar dos seus bons resultados, implicam danos no ambiente com custos que podem ser incalculáveis. Os nematocidas químicos foram desenvolvidos posteriormente mas têm pouca especificidade, sendo tóxicos e voláteis. Além da contaminação do solo e do lençol freático, alguns desses químicos, permanecem nos produtos vegetais que posteriormente podem ser ingeridos pelo homem, directa ou indirectamente. Outro dos inconvenientes é a possibilidade de adaptação do nemátode, aos compostos químicos, podendo entretanto adquirir resistência. O desenvolvimento de novos nematocidas químicos fica muito dispendioso às empresas agroquímicas, de modo que não tem havido um grande investimento nesta área (Viglierchio, 1991; Weischer, 2001; Chitwood, 2002).

Existem ainda outros métodos de controlo de nemátodes parasitas de plantas que consistem em: Inundação do terreno. Este método só pode ser aplicado em locais em que a



---

água seja abundante. O terreno é inundado a uma profundidade mínima de 10 cm, durante alguns meses. Apesar de não matar nem os ovos nem os nemátodes, estes deixam de poder reproduzir-se e não conseguem infectar a raiz; Dessecação. Em alguns climas, as populações de NGR podem ser reduzidas arando o campo com intervalos de duas a quatro semanas durante a estação seca. Este método expõe os ovos e os jovens dos nemátodes, que acabam por morrer; Uso de predadores naturais ou antagonistas: fungos, outros nemátodes, turbelários, enquitreídos, rotíferos, insectos e ácaros, e de parasitas: vírus, protozoários, bactérias e fungos; Temperaturas elevadas. O tratamento térmico pode ser usado de duas formas: a) Imersão das sementes e/ou plantas em água muito quente. A temperatura e o tempo de imersão dependem da variedade vegetal. b) Aquecimento do solo. Pode ser feito de forma mais económica em países quentes, recorrendo somente a uma película de polietileno de forma a aumentar a temperatura no solo ou, então, tratando o solo com ondas micro-ondas, mas este tratamento tem custos elevados (Taylor, 1978; Brown, 1987; Viglierchio, 1991; Weischer, 2001).

O uso de plantas antagonistas é também um método económico e não poluente. Existem algumas plantas que produzem substâncias tóxicas para os fitonemátodes, nomeadamente *Tagetes spp.*, *Chrysanthemum spp.*, *Ricinus communis.*, *Azadirachta indica.*, entre outras. Os jovens de *Meloidogyne spp.* quando conseguem penetrar na raiz, morrem ao fim de alguns dias, o que torna este método muito mais vantajoso que outros que utilizam plantas que apenas inactivam os nemátodes. Outra vantagem é a incorporação destas plantas no solo, como adubo verde, o que torna este método mais atractivo do ponto de vista económico. A sua incorporação no solo também vai aumentar o teor de matéria orgânica, favorecendo o crescimento de alguns microrganismos, nomeadamente fungos antagonistas aos fitonemátodes (Taylor, 1978; Viglierchio, 1991; Kokalis-Burelle, 2006). Alguns estudos têm surgido nesta área, nomeadamente com espécies aromáticas e medicinais, revelando um enorme potencial no controlo destes organismos. Os estudos incidem na utilização da planta inteira como adubo ou então, de partes da planta, extratos vegetais, óleos essenciais e compostos.

Para um controlo mais eficaz da população de um nemátode fitoparasita podem ser usados mais do que um método em simultâneo (Maggenti, 1981).

#### 4. Utilização de plantas no controlo de nemátodes fitoparasitas

Sabe-se que as plantas superiores desenvolveram mecanismos de defesa/resistência bastante eficazes contra certas pragas, predadores e factores abióticos. O tipo de resistência a pragas pode ser passiva ou activa. O primeiro diz respeito a uma característica inerente à planta, que ocorre quer haja ou não infecção por parte da praga, neste caso do nemátode. Um dos exemplos que pode ser dado é a não produção de exsudatos atractivos, ausência ou insuficiência de nutrientes essenciais ao nemátode e produção de substâncias tóxicas ou repelentes. No segundo tipo de resistência, a planta reage a um ataque por parte de um nemátode através de um mecanismo fisiológico de defesa como resposta às secreções glandulares produzidas e libertadas pelos nemátodes, tais como a necrose das células vegetais afectadas pelas secreções. Estas células acabam por envolver o nemátode, que fica impossibilitado de se alimentar. O jovem do nemátode migra de novo para o solo, se ainda tiver energias ou, então, acaba por morrer de inanição. Outro exemplo é a inibição total ou parcial da formação de células nutritivas que, dependendo do seu grau, impede o jovem de se alimentar e completar o seu ciclo de vida ou, então, provoca um aumento do número de machos (Huang, 1985). No entanto, é preciso ter em consideração que uma planta resistente a uma espécie de nemátode pode ser susceptível ao ataque de outras espécies (Chitwood, 2002).

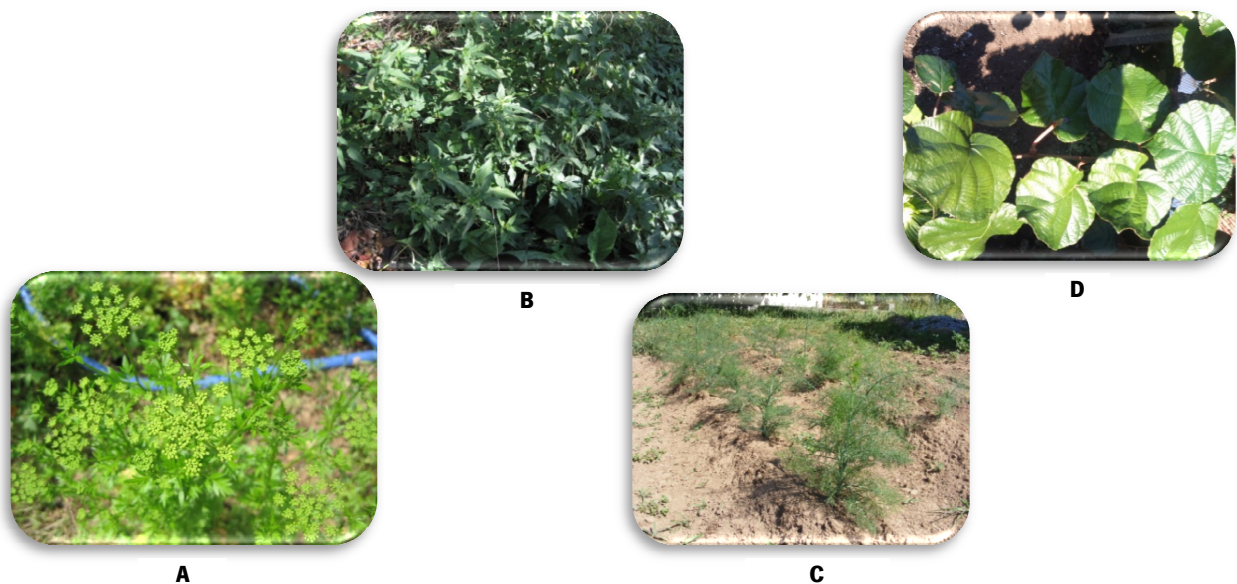
Envolvidos nesses mecanismos de defesa estão os aleloquímicos, que podem ser definidos como metabolitos de plantas ou os seus produtos, libertados no ambiente através da volatilização, exsudação das raízes, lixiviação das plantas ou resíduos de plantas, e decomposição de resíduos (Kokalis-Burelle, 2006). Nos últimos anos, o aumento da investigação em aleloquímica deveu-se ao facto de se tentar perceber melhor o complexo químico entre plantas e animais. Os compostos produzidos pelas plantas, envolvidos nesta interacção, incluem repelentes, atraentes, estimulantes ou inibidores da eclosão, nematotóxicos e nematodicidas. Geralmente, as plantas da mesma família usam estruturas químicas semelhantes ou relacionadas com a defesa, por exemplo os isoflavonóides nas Leguminosae e os sesquiterpenos nas Solanaceae (Balandrin, 1988; Chitwood, 2002; Dixon 2001). Dos fitoquímicos produzidas pelas plantas destacam-se os alcaloides, os compostos fenólicos e os terpenóides (Bolougne *et al.*, 2012). Os adubos verdes colocados em camada ou incorporados no solo provocam um impacto físico e biológico nas propriedades do solo o que, para além da toxicidade fitoquímica, fomenta um ambiente favorável a microrganismos antagonistas dos

---

nemátodes. O isolamento e a identificação dos fitoquímicos envolvidos, pode ter como objectivo a sua utilização como nematodocidas ou servir como modelo para o desenvolvimento de derivados químicos sintetizados. Estes derivados, ao contrário dos químicos já mencionados, possuem uma boa actividade, são mais específicos, não são tão poluentes e, não se degradam tão facilmente como os compostos naturais, o que é uma vantagem se for necessário um tempo de exposição mais prolongado. No entanto nem todos os fitoquímicos se poderão considerar seguros; alguns são tóxicos para os mamíferos, dependendo das quantidades utilizadas. A acção destes fitoquímicos, biológica e bioquimicamente, é de interpretação difícil, pois em certos extratos podem agir sinérgica ou antagonisticamente, além de poderem actuar directamente na planta hospedeira (Hostettmann, 1995; Chitwood, 2002).

A União Europeia, assim como outros organismos mundiais, têm lançado regulamentos e directivas que visam garantir um nível elevado de protecção da saúde humana e do ambiente. Um destes regulamentos, 1907/2006, controla e impõe limites ao uso de químicos no solo. Face a estas medidas, têm surgido algumas investigações que visam minorar a acção das pragas. O uso de plantas aromáticas está entre elas, com diversos métodos de extração e de aplicação. Destacam-se algumas investigações em Portugal: Galhano *et al.* (1997), sobre as interacções entre *Xanthosoma sagittifolium* e *M. megadora* e *M. javanica*; Luques (2009) sobre a acção de *Hypericum* spp. Sobre *M. javanica* e *Bursaphelenchus xylophilus*; Barbosa *et al.* (2010), que estudaram o efeito de várias plantas da flora portuguesa sobre *Bursaphelenchus xylophilus*. A nível mundial têm surgido muitas mais investigações sobre a utilização de plantas aromáticas e medicinais (PAM) e o seu efeito como nematodocidas, insecticidas, fungicidas e antiviricos. Bhyand & Das (2012) publicaram uma revisão sobre os extratos das plantas como biopesticidas; Boulogne *et al.* (2012) também publicaram uma revisão sobre os químicos das plantas e o seu potencial como insecticidas e fungicidas. A aplicação de outros métodos com PAM, também foi alvo de investigação, Ibrahim & Traboulsi (2009) estudaram o efeito combinado da solarização com *Allium sativum*, e *Mentha microphylla*, potenciando os seus efeitos.

As propriedades conhecidas de algumas variedades de plantas, quer ao nível de actividade farmacológica, quer como biopesticidas, teve alguma influência na escolha das plantas escolhidas para este estudo; outro factor foi o estudo sobre a caracterização de algumas variedades de plantas e o seu potencial como biopesticidas, que está em curso no Laboratório de Biologia Vegetal, no Departamento de Biologia da Universidade do Minho. A salsa e o funcho fazem parte desse projecto de doutoramento. A escolha da urtiga foi devido a alguns estudos existentes, como sobre as suas propriedades antifúngicas (Carvalho, 2010; Tapwal *et al.*, 2011).



**Figura 2.** Plantas utilizadas no presente trabalho, salsa no estado florido (A), urtiga (B), funcho (C) e kiwi (D).

#### 4.1 Funcho

O funcho, *Foeniculum vulgare* Mill., uma planta da família das Apiáceas (Umbelíferas) é original da região mediterrânica mas cultivado em todo o mundo. Tanto os frutos, como as folhas, a raiz e o óleo essencial, são ricos em compostos aromáticos e utilizados como fonte para fitoquímicos. Os principais constituintes do óleo são o anetol, a fenchona, o estragol, anisaldeídos e terpenos. A variedade doce é mais rica em anetol (mínimo de 80%) e mais pobre em fenchona (máximo de 7,5%), do que a variedade amarga que possui mais fenchona (mínimo

15%) e menos anetol (mínimo de 60%). Como a fenchona é tóxica, a variedade amarga torna-se mais aliciante na procura de fitoquímicos que possam actuar como nematodocidas. No entanto, com qualquer das variedades utilizadas, é necessário precaução uma vez que quantidades superiores a 2 ml de óleo essencial, tem efeito convulsionante no homem adulto, devido à neurotoxicidade do anetol (Bajaj, 1989; Cunha, 2009). As propriedades farmacológicas do funcho são, essencialmente devido ao óleo essencial que se encontra maioritariamente nos frutos; várias são as aplicações encontradas para esta planta, Cantore *et al.* (2004) demonstraram o seu poder antibacteriano; Kim & Ahn (2001) demonstraram a actividade insecticida do funcho e Rather *et al.* (2012) publicaram uma revisão sob o uso tradicional do funcho como antifúngico, antibacteriano, antioxidante e anti-inflamatório.

## 4.2 Kiwi

O Kiwi, *Actinidia deliciosa* Chevall., é uma planta da família das Actinidiaceas, com origem na China (Mattiuz, 1996). A sua introdução em Portugal é relativamente recente (anos 70). As propriedades do fruto têm sido amplamente estudadas, mas relativamente às folhas não têm havido muitas investigações. No entanto existe um trabalho de revisão (Saquet e Brackmann, 1995) que refere que a planta do kiwi não parece ser muito susceptível a pragas, apesar de se terem registado casos por infecção de nemátodes no Brasil. Esta aparente resistência natural torna a planta interessante para estudo e a infecção detectada pode ser o resultado de outros factores.

## 4.3 Salsa

A salsa, *Petroselinum crispum* Mill., é uma planta da família das Apiáceas (Umbelíferas), com possível origem no sudeste da Europa ou da Ásia Ocidental, é cultivada em quase todo o mundo. Nas folhas pode-se encontrar flavonóides, furanocumarinas, ftálicos, políinas e óleo essencial (0,02 a 0,7%). Nos frutos também existem flavonóides e a percentagem de óleo essencial é superior (2 a 6%), contendo este apiol, miristicina,  $\alpha$ - e  $\beta$ -pinenos, outros monoterpenos e sesquiterpenos. Nas raízes há somente vestígios de óleo essencial, conhecendo-se flavonóides e poliacetilenos. As partes da planta mais utilizadas são as folhas, os frutos e o

óleo essencial obtido a partir dos frutos. A presença de apiol e miristicina conferem aos frutos propriedades digestiva e espasmolítica sobre o organismo, mas, sobre o útero, tem uma acção estimulante. O óleo essencial e os flavonóides provocam diurese, a raiz tem um efeito diurético mais suave (Cunha, 2009). O poder antioxidante da salsa foi demonstrado por Zhang *et al.* (2006).

#### **4.4 Urtiga**

A urtiga, *Urtica dioica* L., é uma planta da família das Lamiáceas (Labiadas), sendo natural das regiões temperadas da Europa, África Austral, Andes e Austrália. É constituída, essencialmente, por flavonóides, sais minerais e ácidos orgânicos. Nos tricomas os constituinte maioritários são a acetilcolina, histamina, serotonina e ácido fórmico. A parte mais utilizada da planta são as folhas, podendo a raiz ser usada em alguns casos. Possui propriedades remineralizantes e tonificantes do tecido conjuntivo. (Cunha, 2008). As suas propriedades insecticidas foram evidenciadas por Brudea (2009).

### **5. Objectivos**

O estudo da acção de bio-produtos de urtiga, de salsa e de kiwi sobre nemátodes parasitas de plantas, ainda é escasso. Com o presente trabalho pretendeu-se colmatar essa falta na área, adicionando, igualmente, mais dados sobre o potencial do funcho como nematodocida. A escolha das plantas foi essencialmente económica; são plantas abundantes no território português, surgindo espontaneamente, na maioria dos casos.

O objectivo geral do trabalho desenvolvido foi a avaliação da capacidade nematotóxica de compostos naturais produzidos por algumas espécies vegetais, para a sua utilização no controlo de nemátodes fitoparasitas.

Os objectivos mais específicos consistiram em:

- 1) Avaliar os efeitos de extratos aquosos de funcho, de urtiga, de salsa e de kiwi, sobre a eclosão e a mortalidade de jovens do segundo estágio (J2) de *M. javanica*.
- 2) Avaliar o efeito dos óleos essenciais de funcho e de salsa, sobre a eclosão e a mortalidade de J2 de *M. javanica*.
- 3) Avaliar os efeitos da aplicação directa no solo, da parte aérea das espécies vegetais em estudo, sobre a penetração radicular de J2 de *M. javanica* em tomateiros mantidos em vaso.
- 4) Avaliar os efeitos da aplicação directa no solo, da parte aérea das espécies vegetais em estudo, sobre a população total de *M. javanica* em tomateiros mantidos em vaso.

# Material e Métodos



## II - MATERIAL E MÉTODOS

### 1. Manutenção e multiplicação do isolado de *Meloidogyne javanica*

#### 1.1 Obtenção dos isolados

Os isolados P086 e P018 de *Meloidogyne javanica*, foram gentilmente cedidos pelo Laboratório de Nematologia, Instituto do Mar – Centro do Mar e Ambiente. Departamento de Zoologia da Universidade de Coimbra.

#### 1.2 Obtenção das plantas de tomateiro

Foram colocadas sementes de tomateiro, *Solanum lycopersicum*, das variedades “Easypeel” e “Tiny Tim”, a germinar em caixas de petri forradas com papel humedecido, no interior de uma estufa a 24°C, sem luz. Depois de germinarem, as sementes foram transferidas individualmente para pequenos copos de plástico de capacidade aproximada de 75 cm<sup>3</sup>, contendo uma mistura de areia e de solo esterilizados, na proporção de 1:1. Os vasos foram mantidos numa sala climatizada com a temperatura entre os 20,2 e os 24,7°C, com uma humidade relativa que variou entre 31,7 e 76,5% e com fotoperíodo de 12 horas. As plantas foram regadas diariamente com água da torneira e adubadas uma vez por semana com solução nutriente (7% N, 5% P2O5 e 6% K2O). Quando os tomateiros formaram um par de folhas verdadeiras, foram transplantados para vasos de plástico com capacidade aproximada de 450 cm<sup>3</sup>, contendo a mistura de areia e solo na mesma proporção.

#### 1.3 Manutenção e multiplicação do isolado

O isolado de *M. javanica* foi mantido e multiplicado em raízes de tomateiro, *S. lycopersicum*, cv. “Easypeel” e “Tiny Tim”.

A inoculação de novas plantas foi feita com novos tomateiros, quando possuíam 2 pares de folhas verdadeiras. O inóculo consistiu de 5 a 10 massas de ovos por cada vaso, retiradas de uma raiz infectada, com o auxílio de agulhas de dissecação e uma pinça. Estas massas de ovos foram colocadas em pequenos orifícios no solo, em torno da raiz, os quais foram depois preenchidos com a mistura de solo e areia. As plantas foram mantidas numa sala climatizada e regadas como anteriormente descrito.

Após 30 dias, as raízes foram desenvasadas para se observar se ocorreu formação de galhas, tendo sido, nesse caso, novamente envasadas. Decorridos mais 30 dias, as raízes foram novamente desenvasadas e lavadas cuidadosamente com água da torneira, de forma a eliminar o solo envolvente, para se verificar o estado das massas de ovos (translúcidas e gelatinosas) num microscópio estereoscópico. As massas de ovos, foram retiradas das raízes com o auxílio de agulhas de dissecação e uma pinça, e usadas para a inoculação de novos tomateiros com 5 a 10 massas de ovos como anteriormente descrito.

## **2. Obtenção das plantas, dos óleos essenciais e dos extratos**

### **2.1 Obtenção das plantas**

As plantas utilizadas nos ensaios foram colhidas na zona de Braga (a urtiga e a salsa) e na zona de Barcelos (o Kiwi e o Funcho). Uma parte foi utilizada fresca, enquanto as porções restantes foram secas num local escuro, seco e arejado.

A identificação das plantas foi feita pelo Dr. António Xavier Pereira Coutinho, do Departamento de Ciências da Vida na Faculdade de Ciência e Tecnologia, da Universidade de Coimbra.

## **2.2 Obtenção dos óleos essenciais**

O óleo essencial do funcho foi obtido, a partir das umbelas, por meio da hidrodestilação. Para os ensaios com a salsa foi utilizado um óleo comercial (SIGMA-ALDRICH). Do kiwi e da urtiga não foi possível a extração de óleo essencial a partir das folhas.

Para a extração do óleo essencial de funcho, foram colocados 100g de funcho seco (caules e umbelas) num hidrodestilador do tipo Clevenger, com 2L de água destilada durante 2h30. O óleo foi recolhido da coluna de destilação para um frasco vial, onde foi armazenado no frio (-20°C) até ser utilizado.

## **2.3 Obtenção dos extratos secos**

Foi preparada inicialmente uma infusão com 68,8 de umbelas e caules secos de funcho em 1L de água destilada fervida, durante 20 minutos. Após este tempo, a mistura foi coada para um novo copo, para eliminação das partes vegetais de maiores dimensões. Às umbelas e aos caules da infusão anterior, foi ainda adicionado mais 0,5 L de água destilada fervida e aguardados mais 20 minutos sendo depois também coada para o mesmo copo utilizado anteriormente. A mistura foi filtrada, através de papel de filtro Whatman® e em seguida, foi novamente filtrada numa membrana de 0,2 µm, em sistema de vácuo, para eliminação de partículas pequenas, em suspensão. O líquido foi então vertido para pequenos copos de vidro e colocado no congelador (-20 °C) antes de ser submetido à liofilização. O pó resultante foi guardado num exsiccador até ser necessário para a preparação de diferentes concentrações.

Para os restantes extratos procedeu-se da mesma forma, variando somente a quantidade de material vegetal. Para a salsa foram usadas 60 g de folhas frescas, para o kiwi 70,0 g e, para a urtiga, 20 g de folhas secas.

## **2.4 Extração dos compostos da infusão**

A extração dos compostos foi feita a partir de uma infusão de 20 g da parte aérea das plantas, em 0,5 l de água destilada previamente fervida, durante 20 minutos. Depois de arrefecida foi vertida para um decantador. Em seguida foram adicionados 100 ml de pentano,

rolhou-se bem o decantador e procedeu-se a uma agitação vigorosa, tirando de vez em quando cuidadosamente a rolha de modo a que o gás fosse libertado. Depois de todo o gás ter sido removido, a solução foi deixada em repouso durante 15 minutos, findos os quais a fase sobrenadante do decantador foi recolhida com uma pipeta, para um balão de fundo redondo. À infusão restante foram adicionados mais 100 ml de pentano e aguardou-se mais 45 minutos, procedendo-se da mesma forma e recolhendo o extrato para o mesmo balão de fundo redondo, obtendo-se assim o extrato de pentano. Após o pentano, foram adicionados 100mL de diclorometano e o procedimento foi o mesmo utilizado anteriormente, embora neste caso, o extrato se encontrasse no fundo do decantador. Por último, foram adicionados 100mL de acetato de etil, tendo o tempo de espera para cada uma das adições sido de 30 minutos. A recolha de cada solvente foi feita para uma balão diferente, que depois foi concentrado num evaporador rotativo até atingir um volume de 2-3 ml, tendo sido seco sob fluxo de azoto gasoso. O volume final foi transferido para um vial e armazenado a -20 °C até ser utilizado.

### **3. Obtenção de ovos e jovens de *Meloidogyne javanica***

Os ovos de *M. javanica* foram obtidos a partir da raiz de um tomateiro infectado. As massas de ovos foram observadas num microscópio estereoscópico, separadas das galhas das raízes, com o auxílio de agulhas de dissecação e uma pinça, e colocadas num bloco escavado contendo água destilada. Os ovos foram separados com o auxílio das agulhas de dissecação, o ráquis de uma pena e uma micropipeta. Foram escolhidos os ovos que continham um jovem após a primeira muda, no segundo estado juvenil (J2).

Os jovens foram igualmente obtidos a partir da raiz de um tomateiro infectado. As massas de ovos foram separadas como descrito e colocadas num crivo composto por um pequeno quadrado de náilon, com uma malha de aproximadamente 30 µm, preso com um elástico a um anel de plástico rígido com 2,5 cm de diâmetro e 0,9 cm de altura, assente num bloco escavado. Entre o bloco e o crivo foi colocado um quadrado de rede plástica de modo a criar um espaço entre os dois. Encheu-se o bloco escavado com água destilada, deixando-se as massas de ovos submersas. Os J2 que eclodiram nas primeiras horas foram desprezados, utilizando-se os que eclodiram nas 24 horas seguintes.

## 4. Efeito dos extratos

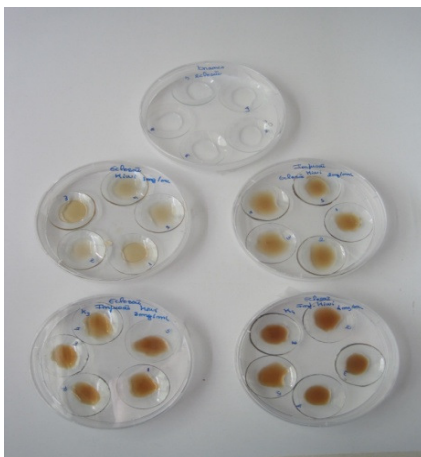
A partir dos extratos liofilizados foram preparadas diversas concentrações, com água destilada (1, 2, 3 e 4 mg/ml).

### 4.1 Na eclosão de jovens de segundo estágio de *Meloidogyne javanica*

Neste ensaio foram utilizadas placas ELISA (Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay) de 6 poços e vidros de relógio pequenos que depois foram colocados em caixas de petri.

Foram utilizadas as soluções de diversas concentrações do extrato liofilizado e cada uma delas foi testada numa placa ELISA diferente, o que permitiu fazer 5 replicados na mesma caixa e garantir que não houve influência de compostos voláteis entre as diferentes concentrações. Em cada poço foi colocado o volume de 2mL da concentração a testar e 20 ovos de *M. javanica*. Simultaneamente foi realizado, como testemunha, um ensaio em branco com água destilada e o mesmo número de ovos. As caixas foram mantidas no escuro, a uma temperatura de aproximadamente 22°C. As contagens dos J2 eclodidos foram realizadas de 24 em 24 horas até às 360 horas de exposição, recorrendo a um microscópio estereoscópico. O número de J2 eclodidos foi sendo adicionado ao número de J2 eclodidos no tempo de observação anterior de modo a obter a eclosão cumulativa.

Em alternativa, nalguns ensaios em que, em vez de recorrer a placas ELISA foram usados vidros de relógio pequenos; estes permitiram usar volumes inferiores, facilitando o manuseamento dos ovos. Foram colocados em cada caixa de petri 5 vidros de relógio, correspondentes ao número de replicados. Aquela foi isolada com parafilme de modo a evitar que os compostos voláteis pudessem interferir no ensaio. As caixas foram colocadas numa estufa e mantidas nas condições já descritas no parágrafo anterior.



**Figura 3.** Caixas de petri contendo os vidros de relógio utilizados no ensaio para o estudo do efeito das diferentes concentrações do extrato aquoso de kiwi na eclosão de J2 de *Meloidogyne javanica*.

Os valores da eclosão cumulativa, ou seja o número total de J2 que eclodiram ao fim das 360 horas foram analisados estatisticamente. Os dados foram submetidos ao teste de Bartlett para verificação da homogeneidade de variâncias; valores que não cumpriram este pressuposto foram transformados através da função  $\log(x+1)$ . Em seguida foi realizada uma análise de frequência através do teste Shapiro-Wilk. Os dados que tinham uma distribuição gaussiana foram submetidos a uma análise de variância, ANOVA, com o pós-teste de Tukey, indicativo da ocorrência de diferenças significativas. Os dados que apresentavam uma distribuição não gaussiana foram submetidos a uma análise não paramétrica, Kruskal-Wallis, com um pós teste de Dunn. Os testes foram todos realizados para um nível de significância de  $P=0,05$ . (Zar, 1996). As análises estatísticas foram efectuadas com o programa GraphPad Prism 5.00.

A percentagem de inibição da eclosão corrigida foi calculada através da fórmula de Abbott (Abbott, 1925; Galhano, 2005):

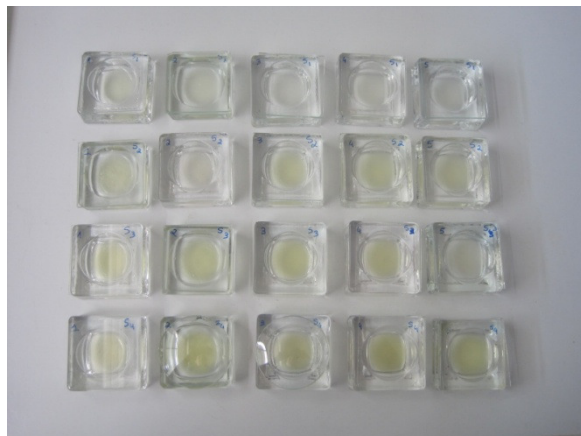
$$\text{Inibição da eclosão corrigida (\%)} = \frac{IEc - IEb}{100 - IEb} * 100$$

Em que IEc representa a percentagem de inibição da eclosão ocorrida nas diferentes concentrações e IEb a percentagem de eclosão ocorrida na testemunha. Esta fórmula permite

calcular a inibição das diferentes concentrações corrigida em relação à inibição ocorrida na testemunha.

#### 4.2 Mortalidade de jovens de segundo estágio de *Meloidogyne javanica*

Neste ensaio foram utilizados blocos de vidro escavados. Para cada bloco escavado contendo 1000 µl de extrato, foram transferidos 20 J2 com o auxílio de uma pestana. Foram preparados cinco replicados para cada concentração e para oa, com água destilada. As contagens do número de jovens imobilizados foram efectuadas num microscópio estereoscópico passadas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 24 e 48 horas e depois de 24 em 24 horas até às 360 horas de exposição ao extrato. Os jovens imobilizados foram transferidos para uma lâmina de vidro escavada, contendo 100 µl de água destilada. Após 1 hora, os jovens que apresentavam mobilidade foram novamente adicionados ao bloco escavado correspondente, enquanto os que permaneceram imóveis foram considerados mortos.



**Figura 4.** Blocos de vidro escavado utilizados no ensaio realizado para o estudo do efeito das diferentes concentrações do extrato aquoso da salsa na mortalidade de J2 de *Meloidogyne javanica*.

O número total de J2 mortos ao fim das 360 horas foi submetido aos mesmos testes descritos em 4.1. A mortalidade corrigida também foi calculada a partir da fórmula de Abbott (Abbott, 1925; Galhano, 2005):

$$\text{Mortalidade corrigida (\%)}: \frac{Mc-Mb}{100-Mb} * 100$$

Em que Mc representa a mortalidade ocorrida nas diferentes concentrações e Mb representa a mortalidade ocorrida na testemunha.

## 5. Efeito do óleo essencial

A partir do óleo de cada planta foram preparadas diversas concentrações (500 ppm, 1000 ppm, 2000 ppm e 3000 ppm) com água destilada. Para tal foi utilizado uma sonda de ultrassons (Gex 400), a uma amplitude entre os 20 e os 40° durante 1 a 5 minutos, dependendo do óleo utilizado, de modo a manter uma emulsão estável.

### 5.1 Eclosão de *Meloidogyne javanica*

O ensaio foi realizado nas mesmas condições descritas anteriormente. Foram colocados 1000 µl da emulsão em cada bloco de vidro escavado e adicionados 20 ovos *M. javanica*. Foram realizadas 5 repetições para cada concentração e para a testemunha, com água destilada. Os blocos foram mantidos no escuro a 22°C. As contagens foram feitas de 24 em 24 h até às 360 horas de exposição dos ovos à emulsão. O número de J2 eclodidos foi sendo adicionado ao número de J2 que já tinham eclodido no tempo de observação anterior, de modo a obter a eclosão cumulativa.

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente conforme descrito em 4.1. Foi também calculada a eclosão corrigida pela fórmula de Abbott.



## 5.2 Mortalidade de *Meloidogyne javanica*

Este ensaio foi montado tal como descrito em 4.2, tendo sido adicionados 20 J2 a cada bloca escavado contendo 1000 µl da emulsão. Tal como anteriormente, foram utilizadas cinco replicados para cada concentração e para a testemunha, com água destilada. As contagens do número de jovens imobilizados foram efectuadas num microscópio estereoscópico após 1, 2, 3, 4, 5, 6, 24 e 48 horas e seguidamente de 24 em 24 horas até às 360 horas de exposição à emulsão. Os jovens que se apresentavam imóveis foram transferidos para uma lâmina de vidro escavada, contendo 100 µl de água destilada. Após 1 hora, os que apresentavam mobilidade foram novamente adicionados ao bloco escavado correspondente, os que permaneceram imóveis foram considerados mortos.

O número total de J2 mortos ao fim das 360 horas foi submetido aos mesmos testes descritos em 4.1. Foi também calculada a mortalidade cumulativa pela fórmula de Abbott.

## 6. Acção da aplicação directa no solo da parte aérea das plantas

### 6.1 Efeito na penetração de jovens de segundo estágio de *Meloidogyne javanica* em raízes de tomateiro

Tomateiros com dois pares de folhas verdadeiras, ou seja, com aproximadamente vinte dias de desenvolvimento, foram inoculados com 1000 ovos de *M. javanica*. Foram realizados 3 replicados para cada planta a testar e 3 para a testemunha, em que as plantas foram inoculadas e regadas somente com água destilada.

Os ovos foram obtidos pela técnica de Hussey e Barker (1973). As raízes que apresentavam galhas foram cortadas, em pequenos pedaços, colocadas num frasco com tampa e agitadas vigorosamente com 200 ml de hipoclorito de sódio (NaOCl) durante 3 minutos. A solução foi depois passada rapidamente por dois crivos sobrepostos, o superior com uma malha de 75µm onde ficaram retidos os pedaços de raízes e o inferior com uma malha de 25µm onde ficaram retidos os ovos. O crivo com a malha inferior foi rapidamente passado por uma corrente

lenta de água da torneira para remover o excesso de NaOCl. Os pedaços de raízes retidos no primeiro crivo foram colocados novamente no frasco, agitados vigorosamente com água da torneira e vertidos novamente pelos dois crivos para recolher ovos adicionais. Este procedimento foi repetido mais duas vezes. Os ovos retidos no crivo de 25 $\mu$ m foram depois recolhidos para um mesmo copo, tendo-se padronizado o número de ovos por unidade de volume, calculando a média de três contagens em 1mL cada, com o auxílio de uma câmara de Peters, num microscópio invertido (OLYMPUS CK40). Seguidamente as plantas foram inoculadas com um número de ovos conveniente e conhecido (1000 ovos). Depois de adicionado o inóculo ao solo dos vasos com um tomateiro cada, foi colocada, por cima desse solo, uma pequena camada (5 gramas), de folhas e pecíolos, ou umbelas no caso do funcho, triturados excepto a salsa que foi utilizada fresca e apenas partida em pequenos pedaços. Os vasos foram mantidos numa sala climatizada com temperaturas a oscilar entre os 20,2 e os 24,7°C e uma humidade relativa entre 31,7 e 76,5 %, e com um fotoperíodo de 12 horas. As plantas foram regadas diariamente com água destilada.

Ao fim de 7 dias, as plantas foram desvasadas e as raízes lavadas cuidadosamente com uma corrente suave de água da torneira, sendo depois submetidas a uma coloração, pelo método de Byrd (1983) para melhor se poderem detectar os nemátodes no seu interior. Depois de lavadas, as raízes foram cortadas em segmentos de 1-2 cm e cada uma foi envolta numa pequena bolsa de náilon, fechada com um elástico e colocada num frasco com tampa, contendo 50 ml de água destilada e 20 ml de NaOCl com 5,25% de cloro activo. As bolsinhas com as raízes permaneceram nesta solução durante 4 minutos, com agitação ocasional. Decorrido este tempo, foram lavadas em água corrente (30 a 45 seg.) e colocadas novamente no frasco com água da torneira, durante 15 minutos, de modo a eliminar qualquer vestígio de NaOCl. Em seguida, as raízes foram escurridas e transferidas para um copo de vidro contendo 30 ml de água destilada e 1 ml de solução corante (3,5 g de fucsina ácida, 250 ml de ácido acético e 750 ml de água destilada). A mistura foi aquecida até à fervura (aproximadamente 30 seg.) e seguidamente arrefecida até à temperatura ambiente. O excesso foi removido com água corrente, tendo as bolsas contendo as raízes sido colocadas em 20-30 ml de glicerina acidificada com algumas gotas de HCl 5N. A mistura foi novamente aquecida até à fervura e depois de arrefecidos, as bolsas foram finalmente abertas e as raízes colocadas em lâminas de vidro para observação ao microscópio invertido, numa ampliação de 40x. Foi contabilizado o número de jovens que conseguiram penetrar nas raízes.



**Figura 5.** Tomateiros inoculados com ovos de *M. javanica*, em vasos com solo coberto por uma camada de folhas de kiwi secas e trituradas.

## 6.2 Efeito na população final de *Meloidogyne javanica*

Os tomateiros apresentando dois pares de folhas verdadeiras, aproximadamente com vinte dias de desenvolvimento, foram inoculados com 1000 ovos de *M. javanica*. Foram preparadas 3 replicados para cada planta e 3 para a testemunha, em que as plantas foram inoculadas e regadas somente com água destilada.

A montagem do ensaio decorreu da mesma forma descrita em 6.1. Depois de inoculados os tomateiros, foi colocada em cada vaso uma pequena camada (5 g) de folhas e pecíolos, ou umbelas no caso do funcho, triturados, excepto a salsa que foi utilizada fresca, partida em pequenos pedaços. Os vasos foram mantidos numa sala climatizada com temperaturas a oscilar entre os 20,2 e os 24,7°C e uma humidade relativa entre 31,7 e 76,5 %, e com um fotoperíodo de 12 horas. As plantas foram regadas diariamente com água destilada.

Após decorridos 30 dias os tomateiros foram desenvasados, as raízes lavadas cuidadosamente numa corrente suave de água da torneira e guardadas no frigorífico (4 °C) até observação. O número de galhas foi contado, segundo um índice de 0-5 (0=sem formação de galhas, 1= 1 a 2, 2= 3 a 10, 3= 11 a 30, 4= 31 a 100, 5= mais de 100 galhas por raiz) (Taylor & Sasser, 1978). O número total de ovos e de J2 extraídos das raízes foi determinado através da técnica de Hussey e Barker (1973). Os J2 que se encontravam no solo foram extraídos através do método do tabuleiro de Whitehead ou técnica de Baermann modificada. Por cima de um crivo plástico, foi colocado um papel absorvente cobrindo bem a base deste, que se encontrava dentro

de um tabuleiro. A amostra de solo foi distribuída cuidadosamente sobre o papel, de modo a que não caísse para fora do mesmo. A água foi adicionada lentamente aos tabuleiros de extração, entre o lado do tabuleiro e o bordo do crivo, para não rasgar o papel, e em quantidade suficiente para não secar. Deixou-se repousar sem causar agitação ou perturbação. Ao fim de 48 horas, os J2 que migraram para a água, foram então recolhidos para uma frasco com a ajuda de um esguicho de água e armazenados no frio (4 °C) até poderem ser contabilizados. O excesso de água foi removido por aspiração. (Coyne, 2007). Durante a lavagem das raízes, a água foi recolhida para um copo, para depois serem extraídos os J2 que pudessem aí se encontrar. O método de extração escolhido, foi o método do funil de Baermann. Os funis foram montados num suporte universal e na sua extremidade foi colocada um tubo de borracha. O crivo foi montado fora, antes de ser colocado no interior do funil: uma malha fina de náilon foi presa com um elástico a toda a volta de um aro de plástico; por cima da malha foi colocada uma folha de um kleenex. O crivo foi levemente humedecido antes de ser colocado no funil. O copo agitado ligeiramente e vertido para o funil. Desprezou-se a primeira água que escorreu do funil e em seguida, o tubo de borracha foi bem apertado com uma pinça. De seguida, foi colocada cuidadosamente água destilada no funil, até tocar no crivo. Deixou-se em repouso e sem causar agitação, durante 24 horas. Após este tempo, a pinça foi removida e a água recolhida para um copo que foi armazenado no frio (4 °C) até poderem ser contabilizados.

A capacidade de infecção foi determinada pelo índice de galhas (IG) e pelo factor de reprodução ( $R_f = P_f / P_i$ ) de acordo com o esquema quantitativo de Canto-Sáenz (Sasser *et al.*, 1984).

# Resultados

### III - Resultados

#### 1. Efeito dos extratos das plantas sobre *Meloidogyne javanica*

##### 1.1 Extrato aquoso de *Foeniculum vulgare*

###### 1.1.1 Eclosão de jovens de segundo estágio

Os resultados sobre os efeitos do extrato aquoso das umbelas do funcho na eclosão de J2 de *M. javanica* encontram-se na Tabela 1 e na Figura 5.

**Tabela 1.** Efeito do extrato aquoso de funcho na eclosão de J2 de *M. javanica*.

Tempo (horas)	Eclosão cumulativa (%)*				
	0	Concentração do extrato (mg/ml)			
		1	2	3	4
<b>24</b>	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00
<b>48</b>	3±0,89	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00
<b>72</b>	3±0,89	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00
<b>96</b>	10±1,87	1±0,45	3±0,89	5±0,71	0±0,00
<b>120</b>	15±2,45	13±3,05	6±1,30	7±0,89	0±0,00
<b>144</b>	23±3,13	27±8,26	14±2,28	8±0,89	0±0,00
<b>168</b>	59±7,19	44±7,26	29±5,12	8±0,89	0±0,00
<b>192</b>	88±2,61	85±4,64	45±7,84	9±0,84	0±0,00
<b>216</b>	100±0,00	95±2,24	50±8,00	20±4,00	0±0,00
<b>240</b>	100±0,00	96±1,79	67±7,80	30±6,20	10±1,87
<b>264</b>	100±0,00	100±0,00	78±7,67	39±6,42	30±4,18
<b>288</b>	100±0,00	100±0,00	91±3,03	63±5,59	45±4,53
<b>312</b>	100±0,00	100±0,00	94±1,79	69±4,97	55±3,94
<b>336</b>	100±0,00	100±0,00	96±1,10	74±3,77	56±4,32
<b>360</b>	100±0,00 <sup>a</sup>	100±0,00 <sup>a</sup>	96±1,10 <sup>a,b</sup>	75±3,67 <sup>a,b</sup>	65±4,24 <sup>a</sup>

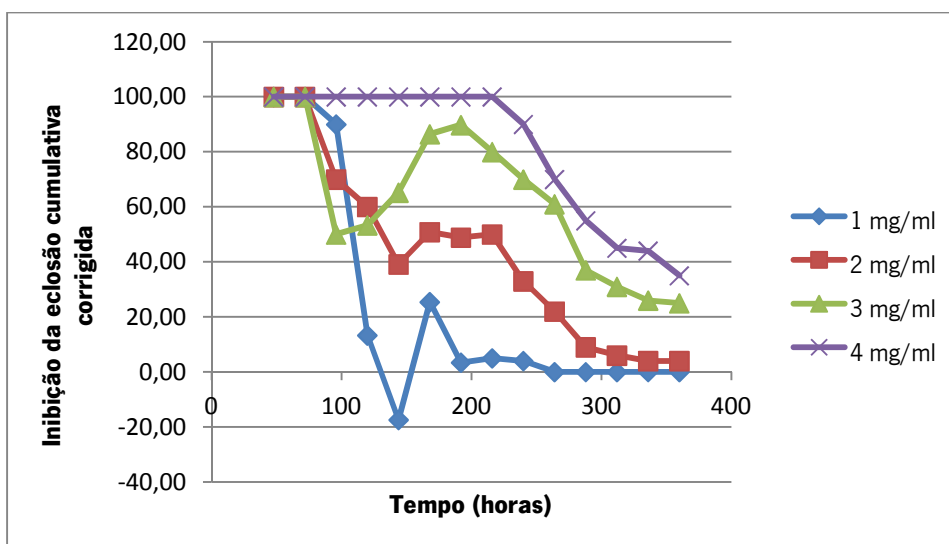
\*Os resultados são a média das 5 repetições e são apresentados com o respectivo desvio padrão

\*\* Os resultados que apresentam a mesma letra não são estatisticamente diferentes, de acordo com o teste de Dunn

A eclosão cumulativa da testemunha atingiu 100% 216 horas após o início do ensaio e, na concentração de 1 mg/ml este valor foi atingido às 264 horas. Na concentração mais elevada

(4 mg/ml) observaram-se os valores de eclosão mais baixos, com 65% de J2 eclodidos no final do tempo do ensaio. A eclosão na testemunha iniciou-se às 48 horas, enquanto que nas concentrações de 1, 2 e 3 mg/ml começou a ser registada 96 horas após o início do teste e, na concentração de 4 mg/ml, iniciou às 240 horas, quando todos os J2 da testemunha já tinham eclodido.

No final do ensaio, às 360 horas, registou-se uma inibição da eclosão corrigida (pela fórmula de Abbott) de 35% na concentração de 4 mg/ml, valor significativamente diferente em relação ao branco e uma diferença pouco significativa em relação à concentração de 1 mg/ml. A inibição da eclosão cumulativa aumentou consoante o aumento da concentração do extrato, mesmo assim, as concentrações mais baixas não mostraram diferenças significativas entre si e entre a testemunha (ANOVA  $F=2,644$ ,  $df=4$ ,  $P < 0,05$ ).



**Figura 6.** Inibição da eclosão cumulativa, corrigida pela fórmula de Abbott, de J2 de *M. javanica*, durante 360 horas de exposição ao extrato aquoso de funcho.

### 1.1.2 Mortalidade de jovens de segundo estágio

Os resultados sobre os efeitos do extrato aquoso das umbelas do funcho na mortalidade de J2 de *M. javanica* encontram-se na Tabela 2 e na Figura 7.

**Tabela 2.** Efeito do extrato aquoso de funcho na mortalidade de J2 de *M. javanica*.

Tempo (horas)	Mortalidade cumulativa (%)*				
	Concentração do extrato (mg/ml)				
	0	1	2	3	4
<b>1</b>	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00
<b>2</b>	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00
<b>3</b>	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00
<b>4</b>	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00
<b>5</b>	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00
<b>6</b>	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00
<b>24</b>	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00
<b>48</b>	0±0,00	0±0,00	0±0,00	57±7,09	99±0,45
<b>72</b>	0±0,00	0±0,00	0±0,00	65±5,52	100±0,00
<b>96</b>	0±0,00	0±0,00	0±0,00	66±5,63	100±0,00
<b>120</b>	0±0,00	0±0,00	0±0,00	66±5,63	100±0,00
<b>144</b>	0±0,00	0±0,00	0±0,00	66±5,63	100±0,00
<b>168</b>	0±0,00	0±0,00	3±1,34	66±5,63	100±0,00
<b>192</b>	0±0,00	4±1,10	5±1,41	67±5,46	100±0,00
<b>216</b>	0±0,00	4±1,10	5±1,41	67±5,46	100±0,00
<b>240</b>	0±0,00	4±1,10	6±1,64	68±5,13	100±0,00
<b>264</b>	0±0,00	9±0,84	12±2,07	70±4,53	100±0,00
<b>288</b>	0±0,00	9±0,84	12±2,07	70±4,53	100±0,00
<b>312</b>	0±0,00	9±0,84	12±2,07	70±4,53	100±0,00
<b>336</b>	1±0,45	29±4,09	25±3,24	79±4,02	100±0,00
<b>360</b>	1±0,45 <sup>a</sup>	36±3,03 <sup>ab</sup>	32±2,61 <sup>ab</sup>	83±3,44 <sup>bc</sup>	100±0,00 <sup>c</sup>

\* Os resultados são a média das 5 repetições e são apresentados com o respectivo desvio padrão

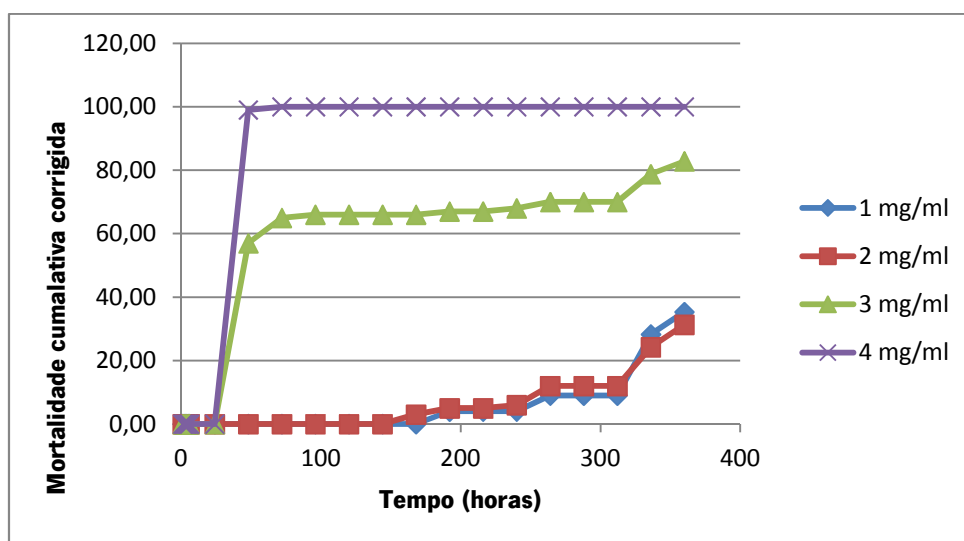
\*\* Os resultados que apresentam a mesma letra não são estatisticamente diferentes, de acordo com o teste de Dunn

Observou-se um aumento do efeito do extrato na mortalidade de J2 de *M. javanica*, até às 360 horas, consoante o aumento da concentração. A mortalidade corrigida na concentração de 4 mg/ml atingiu os 100% às 72 horas, enquanto que na concentração de 3 mg/ml, a



mortalidade atingiu os 82,83% no final do ensaio. A mortalidade corrigida não ultrapassou os 35,35 e os 31,31% nas concentrações de 1 e 2 mg/ml respectivamente.

Entre as duas concentrações mais baixas e a testemunha não se obtiveram diferenças significativas, mas entre este último e as duas concentrações mais elevadas as diferenças estatísticas foram muito significativas (ANOVA  $F=19,01$ ,  $df=4$ ,  $P < 0,05$ ). Outras diferenças, não tão significativas, ocorrem entre a concentração de 1 mg/ml e a concentração de 4 mg/ml, e entre a concentração de 2 mg/ml e a concentração de 4 mg/ml.



**Figura 7.** Mortalidade cumulativa, corrigida pela fórmula de Abbott, de J2 de *M. javanica*, durante 360 horas de exposição ao extrato aquoso de funcho.

## 1.2 Extrato aquoso de *Actinidia deliciosa*

### 1.2.1 Eclosão de jovens de segundo estágio

Os resultados sobre os efeitos do extrato aquoso das folhas do kiwi na eclosão de J2 de *M. javanica* encontram-se na Tabela 3 e na Figura 8.

**Tabela 3.** Efeito do extrato aquoso de kiwi na eclosão J2 de *M. javanica*.

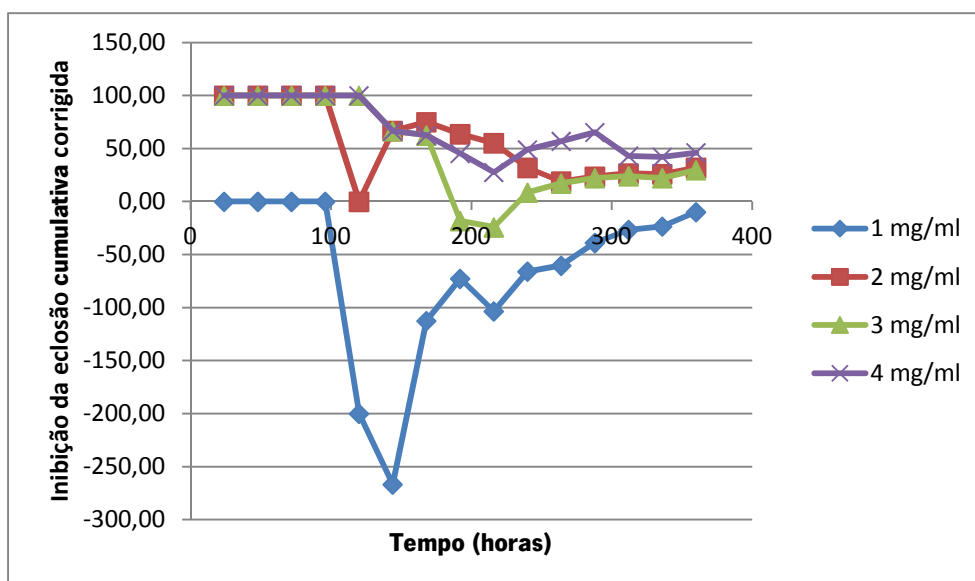
Tempo (horas)	Eclosão cumulativa (%)*				
	Concentração do extrato (mg/ml)				
	0	1	2	3	4
<b>24</b>	1±0,45	1±0,45	0±0,00	0±0,00	0±0,00
<b>48</b>	1±0,45	1±0,45	0±0,00	0±0,00	0±0,00
<b>72</b>	1±0,45	1±0,45	0±0,00	0±0,00	0±0,00
<b>96</b>	1±0,45	1±0,45	0±0,00	0±0,00	0±0,00
<b>120</b>	1±0,45	3±0,55	1±0,45	0±0,00	0±0,00
<b>144</b>	3±0,55	11±1,64	1±0,45	1±0,45	1±0,45
<b>168</b>	8±1,67	17±2,70	2±0,55	3±0,89	3±0,55
<b>192</b>	11±1,79	19±3,11	4±0,84	13±2,19	6±1,10
<b>216</b>	29±3,11	59±4,55	13±1,95	36±3,56	21±2,86
<b>240</b>	47±4,67	78±1,14	32±2,88	43±4,04	24±3,19
<b>264</b>	58±5,50	93±1,52	47±4,28	48±4,45	25±3,08
<b>288</b>	72±5,37	100±0,00	55±5,24	56±5,36	25±3,08
<b>312</b>	79±3,49	100±0,00	58±5,08	60±5,70	45±6,20
<b>336</b>	81±3,42	100±0,00	60±5,15	63±6,15	47±5,98
<b>360</b>	91±2,49 <sup>a</sup>	100±0,00 <sup>a</sup>	62±5,03 <sup>a</sup>	64±6,14 <sup>a</sup>	49±5,72 <sup>a</sup>

\*Os resultados são a média das 5 repetições e são apresentados com o respectivo desvio padrão

\*\* Os resultados que apresentam a mesma letra não são estatisticamente diferentes, de acordo com o teste de Dunn

O extrato aquoso de kiwi na eclosão de J2 de *M. javanica* teve pouco efeito em qualquer uma das concentrações testadas, apesar de na concentração mais elevada (4 mg/ml) a eclosão não ter atingido os 50%. Na testemunha e na concentração da 1 mg/ml, a eclosão iniciou às 24 horas, e na concentração mais elevada às 144 horas. Estatisticamente não existem diferenças significativas entre a testemunha e qualquer uma das concentrações (ANOVA F=0,8074, df=4, P <0,05).

A concentração de 1 mg/ml teve um efeito estimulante na eclosão, a partir das 120 horas até ao final do ensaio, sendo a inibição da eclosão cumulativa corrigida de -9,89 nas 360 horas.



**Figura 8.** Inibição da eclosão cumulativa, corrigida pela fórmula de Abbott, de J2 de *M. javanica*, durante 360 horas de exposição ao extrato aquoso de kiwi.

### 1.2.2 Mortalidade de jovens de segundo estágio

Os resultados sobre os efeitos do extrato aquoso das folhas do kiwi na mortalidade de J2 de *M. javanica* encontram-se na Tabela 4 e na Figura 9.

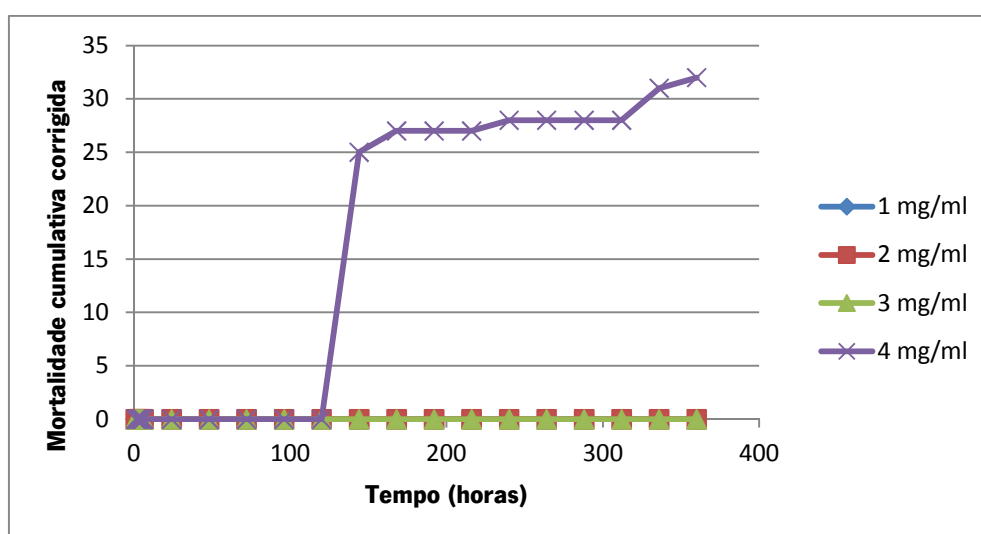
O extrato aquoso de kiwi nas concentrações mais baixas não teve qualquer efeito. Na concentração de 4 mg/ml começou a ter algum resultado a partir das 144 horas e no final do ensaio a mortalidade corrigida era de 32%. Estatisticamente há uma diferença muito significativa entre a concentração mais elevada e as restantes, incluído a testemunha (ANOVA,  $F=18,13$ ,  $df=4$ ,  $P < 0,05$ ).

**Tabela 4.** Efeito do extrato aquoso de kiwi na mortalidade de J2 de *M. javanica*.

Tempo (horas)	Mortalidade cumulativa (%)*				
	Concentração do extrato (mg/ml)				
	0	1	2	3	4
<b>1</b>	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00
<b>2</b>	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00
<b>3</b>	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00
<b>4</b>	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00
<b>5</b>	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00
<b>6</b>	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00
<b>24</b>	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00
<b>48</b>	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00
<b>72</b>	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00
<b>96</b>	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00
<b>120</b>	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00
<b>144</b>	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	25±2,12
<b>168</b>	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	27±2,30
<b>192</b>	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	27±2,30
<b>216</b>	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	27±2,30
<b>240</b>	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	28±2,51
<b>264</b>	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	28±2,51
<b>288</b>	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	28±2,51
<b>312</b>	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	28±2,51
<b>336</b>	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	31±1,64
<b>360</b>	0±0,00 <sup>a</sup>	0±0,00 <sup>a</sup>	0±0,00 <sup>a</sup>	0±0,00 <sup>a</sup>	32±1,95 <sup>b</sup>

\*Os resultados são a média das 5 repetições e são apresentados com o respectivo desvio padrão

\*\* Os resultados que apresentam a mesma letra não são estatisticamente diferentes, de acordo com o teste de Dunn



**Figura 9.** Mortalidade cumulativa, corrigida pela fórmula de Abbott, de J2 de *M. javanica*, durante 360 horas de exposição ao extrato aquoso de kiwi

### 1.3 Extrato aquoso de *Petroselinum crispum*

#### 1.3.1 Eclosão de jovens de segundo estágio

Os resultados sobre os efeitos do extrato aquoso das folhas de salsa na eclosão de J2 de *M. javanica* encontram-se na Tabela 5 e na Figura 10.

**Tabela 5.** Efeito do extrato aquoso da salsa na eclosão de J2 de *M. javanica*.

Tempo (horas)	Eclosão cumulativa (%)*				
	Concentração do extrato (mg/ml)				
	0	1	2	3	4
<b>24</b>	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00
<b>48</b>	3±0,89	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00
<b>72</b>	3±0,89	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00
<b>96</b>	10±1,87	2±0,55	0±0,00	0±0,00	0±0,00
<b>120</b>	15±2,45	11±2,68	1±0,45	0±0,00	0±0,00
<b>144</b>	23±3,13	61±6,91	6±1,30	0±0,00	0±0,00
<b>168</b>	59±7,19	67±7,30	14±3,70	2±0,55	6±1,64
<b>192</b>	88±2,61	70±7,65	30±5,10	7±1,14	25±2,45
<b>216</b>	100±0,00	71±7,82	56±6,02	20±2,55	48±4,34
<b>240</b>	100±0,00	71±7,82	76±4,60	37±3,05	68± 2,30
<b>264</b>	100±0,00	72±7,83	78±4,56	45±2,83	73± 2,30
<b>288</b>	100±0,00	72±7,83	80±4,9	53±3,21	73± 2,30
<b>312</b>	100±0,00	72±7,83	80±4,9	64±3,11	85± 0,71
<b>336</b>	100±0,00	72±7,83	80±4,9	64±3,11	85± 0,71
<b>360</b>	100±0,00 <sup>a</sup>	72±7,83 <sup>a</sup>	80±4,9 <sup>a</sup>	64±3,11 <sup>a</sup>	85± 0,71 <sup>a</sup>

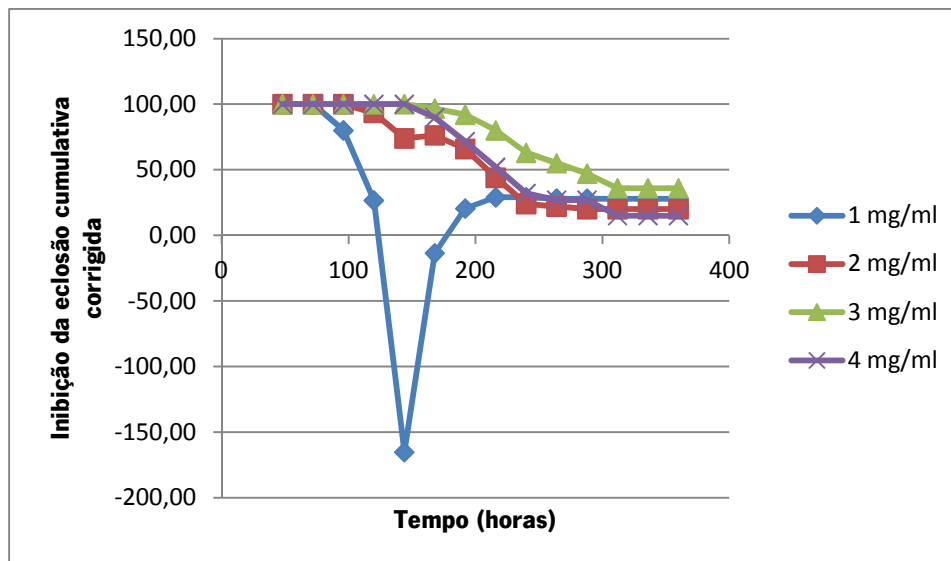
\* Os resultados são a média das 5 repetições e são apresentados com o respectivo desvio padrão

\*\* Os resultados que apresentam a mesma letra não são estatisticamente diferentes, de acordo com o teste de Dunn

A eclosão na testemunha iniciou às 48 horas, atingindo os 100% às 216 horas. Nas concentrações utilizadas, apesar de se observar uma diminuição na percentagem de J2 eclodidos, não se verificam diferenças entre si. Na concentração de 3 mg/ml e 4 mg/ml, a eclosão iniciou só às 168 horas. No final do ensaio registou-se uma inibição da eclosão cumulativa corrigida de 36% na concentração de 3 mg/ml, sendo este o valor mais alto para todas as concentrações.

Estatisticamente verificou-se uma diferença pouco significativa entre a testemunha e a concentração de 3 mg/ml (ANOVA, F=1,204, df=4, P <0,05). Entre as restantes concentrações

não se observaram diferenças. Na concentração de 1 mg/ml, entre as horas 144 e 168 houve um estímulo na eclosão.



**Figura 10.** Inibição da eclosão cumulativa, corrigida pela fórmula de Abbott, de J2 de *M. javanica*, durante 360 horas de exposição ao extrato aquoso de salsa.

### 1.3.2 Mortalidade de jovens de segundo estágio

Os resultados sobre os efeitos do extrato aquoso das folhas de salsa na mortalidade de J2 de *M. javanica* encontram-se na Tabela 6 e na Figura 11.

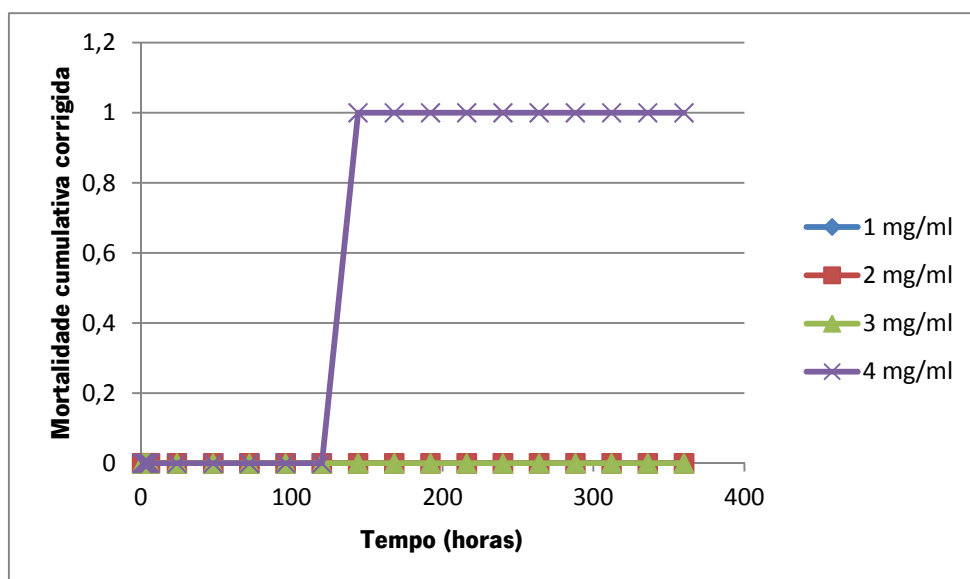
Os resultados obtidos demonstram que o extrato aquoso da salsa não teve qualquer efeito na mortalidade de J2 de *M. javanica* até às 360 horas. Na concentração de 4 mg/ml a mortalidade cumulativa corrigida foi de 1%. As diferenças estatísticas observadas são entre esta concentração e as restantes concentrações, inclusive a testemunha (ANOVA,  $F=18,18$ ,  $df=4$ ,  $P < 0,05$ ).

**Tabela 6.** Efeito do extrato aquoso da salsa na mortalidade de J2 de *M. javanica*.

Tempo (horas)	Mortalidade cumulativa (%)*				
	Concentração do extrato (mg/ml)				
	0	1	2	3	4
1	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00
2	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00
3	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00
4	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00
5	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00
6	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00
24	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00
48	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00
72	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00
96	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00
120	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00
144	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	1±0,45
168	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	1±0,45
192	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	1±0,45
216	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	1±0,45
240	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	1±0,45
264	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	1±0,45
288	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	1±0,45
312	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	1±0,45
336	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	1±0,45
360	0±0,00 <sup>a</sup>	0±0,00 <sup>a</sup>	0±0,00 <sup>a</sup>	0±0,00 <sup>a</sup>	1±0,45 <sup>b</sup>

\* Os resultados são a média das 5 repetições e são apresentados com o respectivo desvio padrão

\*\* Os resultados que apresentam a mesma letra não são estatisticamente diferentes, de acordo com o teste de Dunn



**Figura 11.** Mortalidade cumulativa, corrigida pela fórmula de Abbott, de J2 de *M. javanica*, durante 360 horas de exposição ao extracto aquoso de salsa.

## 1.4 Extrato aquoso de *Urtica dioica*

### 1.4.1 Eclosão de jovens de segundo estágio

Os resultados sobre os efeitos do extrato aquoso das folhas de urtiga na eclosão de J2 de *M. javanica* encontram-se na Tabela 7 e na Figura 12.

Na testemunha, a eclosão atingiu os 100% às 240 horas. Nas concentrações de 1, 2 e 3 mg/ml não se registou qualquer diferença na eclosão cumulativa até ao final do ensaio, com 92% de eclosões para as três concentrações. Na concentração de 4 mg/ml, a inibição da eclosão cumulativa corrigida atingiu o maior valor, de 43%. A diferença estatística observada (pouco significativa), foi entre a testemunha e a concentração mais elevada (ANOVA,  $F=1,407$ ,  $df=4$ ,  $P < 0,05$ ).

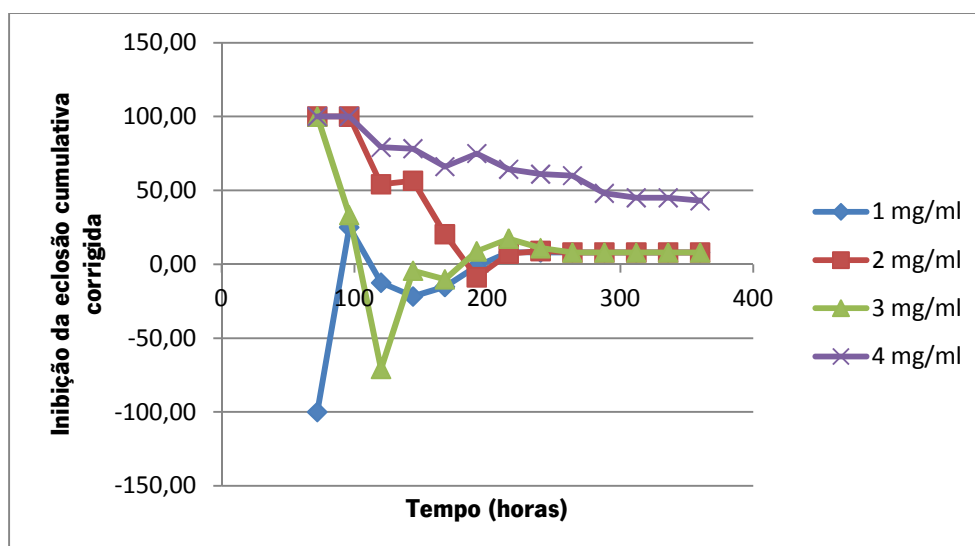


**Tabela 7.** Efeito do extrato aquoso de urtiga na eclosão de J2 de *M. javanica*.

Tempo (horas)	Eclosão cumulativa (%)*				
	Concentração do extrato (mg/ml)				
	0	1	2	3	4
<b>24</b>	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00
<b>48</b>	0±0,00	2±0,89	0±0,00	0±0,00	0±0,00
<b>72</b>	1±0,45	2±0,089	0±0,00	0±0,00	0±0,00
<b>96</b>	12±2,88	9±2,68	0±0,00	8±2,30	0±0,00
<b>120</b>	24±4,82	27±6,31	11±2,86	41±8,61	5±1,73
<b>144</b>	46±8,58	56±6,14	20±2,92	48±8,29	10±2,92
<b>168</b>	59±7,79	68±4,72	47±2,88	65±8,09	20±5,70
<b>192</b>	80±4,42	81±3,63	87±3,21	73±7,27	20±5,70
<b>216</b>	98±0,89	90±2,55	91±2,49	81±6,10	35±7,65
<b>240</b>	100±0,00	92±2,61	91±2,49	89±3,49	39±7,60
<b>264</b>	100±0,00	92±2,61	92±2,61	92±2,30	40±7,65
<b>288</b>	100±0,00	92±2,61	92±2,61	92±2,30	52±7,16
<b>312</b>	100±0,00	92±2,61	92±2,61	92±2,30	55±7,65
<b>336</b>	100±0,00	92±2,61	92±2,61	92±2,30	55±7,65
<b>360</b>	100±0,00 <sup>a</sup>	92±2,61 <sup>ab</sup>	92±2,61 <sup>ab</sup>	92±2,30 <sup>ab</sup>	57±7,47 <sup>b</sup>

\*Os resultados são a média das 5 repetições e são apresentados com o respectivo desvio padrão

\*\* Os resultados que apresentam a mesma letra não são estatisticamente diferentes, de acordo com o teste de Dunn



**Figura 12.** Inibição da eclosão cumulativa, corrigida pela fórmula de Abbott, de J2 de *M. javanica*, durante 360 horas de exposição ao extrato aquoso de urtiga.

### 1.4.2 Mortalidade de jovens de segundo estágio

Os resultados sobre os efeitos do extrato aquoso das folhas de urtiga na mortalidade de J2 de *M. javanica* encontram-se na Tabela 8 e na Figura 13.

**Tabela 8.** Efeito do extrato aquoso da urtiga na mortalidade de J2 de *M. javanica*.

Tempo (horas)	Mortalidade cumulativa (%)*				
	Concentração do extrato (mg/ml)				
	0	1	2	3	4
<b>1</b>	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00
<b>2</b>	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00
<b>3</b>	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00
<b>4</b>	0±0,00	0± 0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00
<b>5</b>	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00
<b>6</b>	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00
<b>24</b>	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00
<b>48</b>	0±0,00	0±0,00	0±0,00	4±1,30	24±7,12
<b>72</b>	0±0,00	0±0,00	0±0,00	13±4,34	56±5,97
<b>96</b>	0±0,00	0±0,00	0±0,00	33±5,18	78±2,70
<b>120</b>	0±0,00	0±0,00	0±0,00	33±5,18	80±2,35
<b>144</b>	0±0,00	0±0,00	0±0,00	33±5,18	80±2,35
<b>168</b>	0±0,00	0±0,00	3±0,89	33±5,18	82±2,19
<b>192</b>	0±0,00	0±0,00	8±1,14	36±4,76	83±2,07
<b>216</b>	0±0,00	0±0,00	8±1,14	36±4,76	83±2,07
<b>240</b>	0±0,00	0±0,00	8±1,14	36±4,76	83±2,07
<b>264</b>	0±0,00	5±0,71	11±1,10	36±4,76	83±2,07
<b>288</b>	0±0,00	5±0,71	11±1,10	36±4,76	83±2,07
<b>312</b>	0±0,00	5±0,71	11±1,10	36±4,76	83±2,07
<b>336</b>	1±0,45	16±1,64	19±2,05	47±3,85	91±1,10
<b>360</b>	1±0,45 <sup>a</sup>	16±1,64 <sup>a</sup>	19±2,05 <sup>ab</sup>	47±3,85 <sup>bc</sup>	94±0,84 <sup>c</sup>

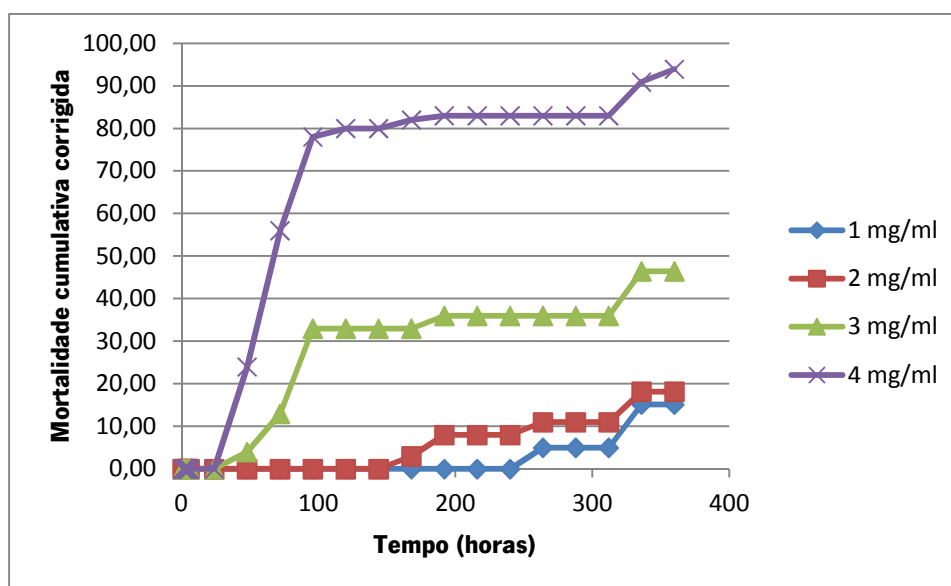
\* Os resultados são a média das 5 repetições e são apresentados com o respectivo desvio padrão

\*\* Os resultados que apresentam a mesma letra não são estatisticamente diferentes, de acordo com o teste de Dunn

Verificou-se um aumento do efeito do extrato aquoso de urtiga na mortalidade de J2, até ao final do ensaio, consoante o aumento da concentração. Na concentração de 4 mg/ml, ao fim de 48 horas, a mortalidade corrigida era de 24% e às 360 horas este valor era de 93,94%. Na concentração de 1mg/ml, só se registou mortalidade a partir das 264 horas, e às 360 horas a mortalidade cumulativa corrigida era de 15,15%. No final do ensaio foi observado um efeito dose

resposta, tendo as percentagens da mortalidade cumulativa corrigida atingido os valores de 15,15 e 18,18% para as duas concentrações mais baixas e de 46,46 e 93,94% para as duas concentrações mais elevadas.

Estatisticamente houve diferenças muito significativas entre a testemunha e as concentrações de 3 e de 4 mg/ml e entre as concentrações de 1 e de 4 mg/ml. Entre as concentrações de 1 e de 3 mg/ml e entre as concentrações de 2 e de 4 mg/ml, as diferenças foram pouco significativas (ANOVA,  $F=18,27$ ,  $df=4$ ,  $P < 0,05$ ).



**Figura 13.** Mortalidade cumulativa, corrigida pela fórmula de Abbott, de J2 de *M. javanica*, durante 360 horas de exposição ao extrato aquoso de urtiga.

## 2. Efeito do óleo essencial de funcho e de salsa sobre *Meloidogyne javanica*

### 2.1 Óleo essencial de *Foeniculum vulgare*

#### 2.1.1 Eclosão de jovens de segundo estágio

Os resultados sobre os efeitos do óleo essencial de funcho na eclosão de J2 de *M. javanica* encontram-se na Tabela 9 e na Figura 14.

**Tabela 9.** Efeito do óleo essencial do funcho na eclosão de J2 de *M. javanica*.

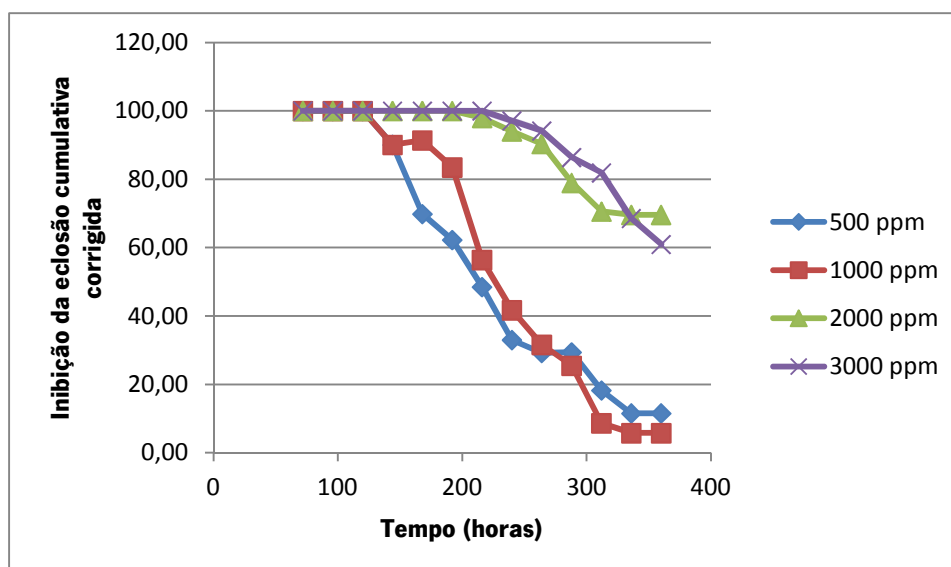
Tempo (horas)	Eclosão cumulativa (%)*				
	Concentração do extrato (ppm)				
	0	500	1000	2000	3000
<b>24</b>	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00
<b>48</b>	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00
<b>72</b>	3±0,89	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00
<b>96</b>	4±1,30	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00
<b>120</b>	7±1,67	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00
<b>144</b>	10±2,35	1±0,45	1±0,45	0±0,00	0±0,00
<b>168</b>	22±4,51	7±1,67	2±0,55	0±0,00	0±0,00
<b>192</b>	41±8,17	15±3,63	7±2,19	0±0,00	0±0,00
<b>216</b>	49±7,65	25±6,87	21±2,41	1±0,45	0±0,00
<b>240</b>	66±5,90	44±7,66	38±4,90	4±0,84	2±0,55
<b>264</b>	82±3,27	58±6,44	56±7,30	8±2,07	5±0,71
<b>288</b>	98±0,45	69±5,08	73±5,02	21±2,68	13±1,64
<b>312</b>	100±0,00	82±2,55	91±1,22	29±3,94	18±1,79
<b>336</b>	100±0,00	88±2,70	94±1,34	30±3,77	31±3,97
<b>360</b>	100±0,00 <sup>a</sup>	88±2,70 <sup>ab</sup>	94±1,34 <sup>ab</sup>	30±3,77 <sup>a</sup>	39±3,19 <sup>b</sup>

\*Os resultados são a média das 5 repetições e são apresentados com o respectivo desvio padrão

\*\* Os resultados que apresentam a mesma letra não são estatisticamente diferentes, de acordo com o teste de Dunn

Os valores da percentagem da eclosão cumulativa na testemunha, em todos os tempos de observação, foram superiores aos registados nas restantes concentrações. A eclosão na testemunha iniciou às 72 horas, atingindo o valor de 100% às 312 horas. Nas concentrações de 500 e de 1000 ppm, a eclosão iniciou às 144 horas, na concentração de 2000 ppm às 216 horas e na concentração de 3000 ppm somente às 240 horas é que teve início.

Entre as duas concentrações mais baixas, a percentagem de inibição cumulativa corrigida é semelhante, atingindo valores superiores na concentração de 500 ppm (11,54%). Entre as duas concentrações mais elevadas, a percentagem de inibição cumulativa corrigida também é semelhante, registando-se um valor superior na concentração de 2000 ppm (69,61%). Estatisticamente existem diferenças significativas entre a testemunha e as concentrações de 2000 e 3000 ppm (ANOVA, F=3,212, df=4, P <0,05).



**Figura 14.** Inibição da eclosão cumulativa, corrigida pela fórmula de Abbott, de J2 de *M. javanica*, durante 360 horas de exposição ao óleo essencial de funcho.

### 2.1.2 Mortalidade de jovens de segundo estágio

Os resultados sobre os efeitos do óleo essencial do funcho na mortalidade de J2 de *M. javanica* encontram-se na Tabela 10 e na Figura 15.

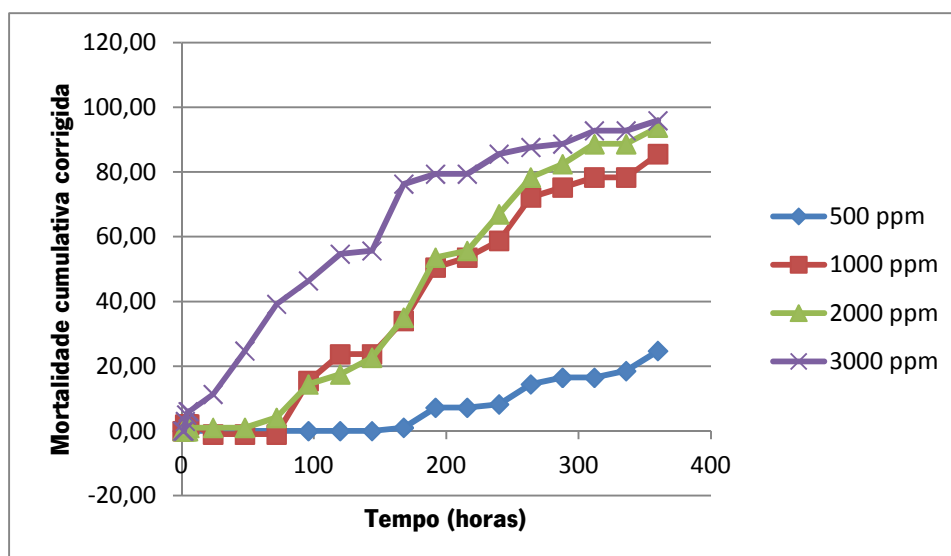
No final do ensaio foi verificado que o óleo essencial do funcho tem um efeito dose-resposta na mortalidade de J2. Na concentração mais elevada, a mortalidade começou a ser observada a partir da 3ª hora, atingindo às 360 horas uma percentagem de mortalidade cumulativa corrigida de 95,88%. Na concentração de 500 ppm, só a partir das 24 horas é que se registou mortalidade, atingindo no final do ensaio, uma mortalidade cumulativa corrigida de 24,74%. Estatisticamente existem diferenças muito significativas entre a testemunha e as três concentrações mais elevadas, e entre estas e a concentração de 500 ppm, as diferenças são pouco significativas (ANOVA,  $F=8,33$ ,  $df=4$ ,  $P < 0,05$ ).

**Tabela 10.** Efeito do óleo essencial do funcho na mortalidade de J2 de *M. javanica*.

Tempo (horas)	Mortalidade cumulativa (%)*				
	Concentração do extrato (ppm)				
	0	500	1000	2000	3000
<b>1</b>	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00
<b>2</b>	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00
<b>3</b>	0±0,00	0±0,00	2±0,55	0±0,00	3±0,89
<b>4</b>	0±0,00	0±0,00	2±0,55	0±0,00	5±0,71
<b>5</b>	0±0,00	0±0,00	2±0,55	0±0,00	6±0,84
<b>6</b>	0±0,00	0±0,00	2±0,55	1±0,45	6±0,84
<b>24</b>	3±0,55	3±1,34	2±0,55	4±0,84	14±2,59
<b>48</b>	3±0,55	3±1,34	2±0,55	4±0,84	27±5,77
<b>72</b>	3±0,55	3±1,34	2±0,55	7±1,67	41±7,01
<b>96</b>	3±0,55	3±1,34	18±3,65	17±2,88	48±6,50
<b>120</b>	3±0,55	3±1,34	26±2,77	20±3,08	56±5,81
<b>144</b>	3±0,55	3±1,34	26±2,77	25±3,87	57±5,59
<b>168</b>	3±0,55	4±1,30	36±3,11	37±4,16	77±3,05
<b>192</b>	3±0,55	10±2,12	52±3,36	55±5,92	80±2,74
<b>216</b>	3±0,55	10±2,12	55±3,08	57±5,55	80±2,74
<b>240</b>	3±0,55	11±1,92	60±3,46	68±3,91	86±2,59
<b>264</b>	3±0,55	17±2,19	73±3,78	79±3,42	88±2,41
<b>288</b>	3±0,55	19±2,49	76±2,95	83±3,78	89±2,17
<b>312</b>	3±0,55	19±2,49	79±3,11	89±3,35	93±1,52
<b>336</b>	3±0,55	21±2,05	79±3,11	89±3,35	93±1,52
<b>360</b>	3±0,55 <sup>a</sup>	27±1,52 <sup>a</sup>	86±2,39 <sup>ab</sup>	94±2,17 <sup>ab</sup>	96±1,10 <sup>b</sup>

\* Os resultados são a média das 5 repetições e são apresentados com o respectivo desvio padrão

\*\* Os resultados que apresentam a mesma letra não são estatisticamente diferentes, de acordo com o teste de Dunn



**Figura 15.** Mortalidade cumulativa, corrigida pela fórmula de Abbott, de J2 de *M. javanica*, durante 360 horas de exposição ao óleo essencial de funcho.

## 2.2 Óleo essencial de *Petroselinum crispum*

### 2.2.1 Eclosão de jovens de segundo estágio

Os resultados sobre os efeitos do óleo essencial da salsa na eclosão de J2 de *M. javanica* encontram-se na Tabela 11 e na Figura 16.

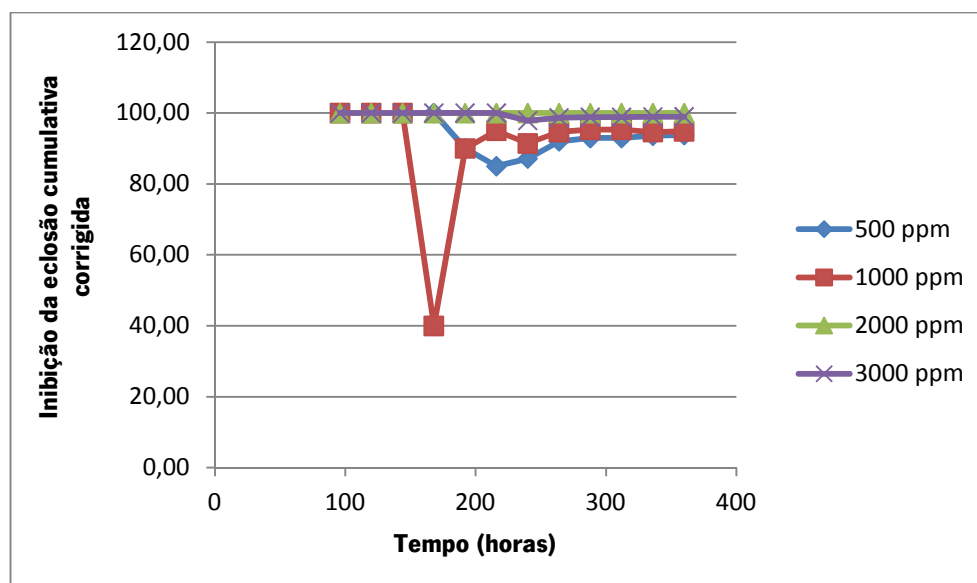
O óleo essencial da salsa demonstra ter um efeito muito activo em qualquer uma das concentrações testadas. No final do ensaio, a inibição da eclosão cumulativa corrigida variou entre os 93,79 e os 100%, nas concentrações de 500 e 2000 ppm, respectivamente. Estatisticamente existem diferenças muito significativas entre a testemunha e as restantes concentrações (ANOVA,  $F=12,12$ ,  $df=4$ ,  $P < 0,05$ ). O início da eclosão variou conforme a concentração testada. Na maior concentração em que se registou eclosão, esta iniciou às 240 horas. Refere-se que neste ensaio, dois replicados da testemunha foram considerados outliers por não terem atingido 90% de eclosão no mínimo.

**Tabela 11.** Efeito do óleo essencial da salsa na eclosão de J2 de *M. javanica*.

Tempo (horas)	Eclosão cumulativa (%)*				
	Concentração do extrato (ppm)				
	0	500	1000	2000	3000
<b>24</b>	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00
<b>48</b>	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00
<b>72</b>	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00
<b>96</b>	1,67±0,58	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00
<b>120</b>	1,67±0,58	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00
<b>144</b>	1,67±0,58	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00
<b>168</b>	1,67±0,58	0±0,00	1±0,45	0±0,00	0±0,00
<b>192</b>	10±1,73	1±0,45	1±0,45	0±0,00	0±0,00
<b>216</b>	20±2,65	3±0,89	1±0,45	0±0,00	0±0,00
<b>240</b>	46,7±5,77	6±1,30	4±0,84	0±0,00	1±0,45
<b>264</b>	75±4,58	6±1,30	4±0,84	0±0,00	1±0,45
<b>288</b>	85±5,20	6±1,30	4±0,84	0±0,00	1±0,45
<b>312</b>	85±5,20	6±1,30	4±0,84	0±0,00	1±0,45
<b>336</b>	93,3±2,31	6±1,30	5±1,00	0±0,00	1±0,45
<b>360</b>	96,7±1,15 <sup>a</sup>	6±1,30 <sup>a</sup>	5±1,00 <sup>a</sup>	0±0,00 <sup>a</sup>	1±0,45 <sup>a</sup>

\* Os resultados são a média das 5 repetições e são apresentados com o respectivo desvio padrão

\*\* Os resultados que apresentam a mesma letra não são estatisticamente diferentes, de acordo com o teste de Dunn



**Figura 16.** Inibição da eclosão cumulativa, corrigida pela fórmula de Abbott, de J2 de *M. javanica*, durante 360 horas de exposição ao óleo essencial de salsa.



## 2.2.2 Mortalidade dos jovens do segundo estágio

Os resultados sobre os efeitos do óleo essencial da salsa na mortalidade de J2 de *M. javanica* encontram-se na Tabela 12 e na Figura 17.

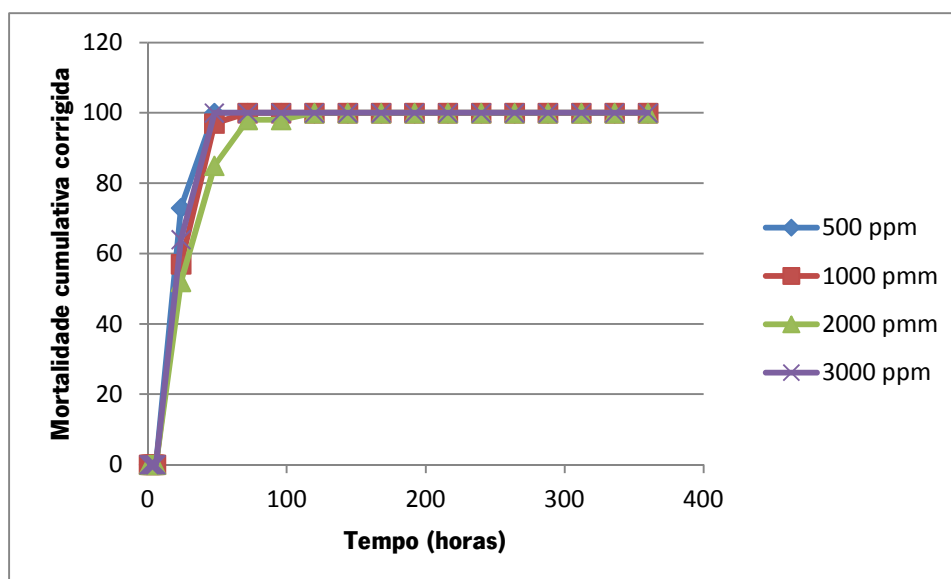
**Tabela 12.** Efeito do óleo essencial da salsa na mortalidade de J2 de *M. javanica*.

Tempo (horas)	Mortalidade cumulativa (%)*				
	Concentração do extrato (ppm)				
	0	500	1000	2000	3000
<b>1</b>	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00
<b>2</b>	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00
<b>3</b>	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00
<b>4</b>	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00
<b>5</b>	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00
<b>6</b>	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00
<b>24</b>	0±0,00	73±2,07	57±3,85	52±2,79	64±2,39
<b>48</b>	0±0,00	100±0,00	97±1,34	85±1,41	100±0,00
<b>72</b>	0±0,00	100±0,00	100±0,00	98±0,55	100±0,00
<b>96</b>	0±0,00	100±0,00	100±0,00	98±0,55	100±0,00
<b>120</b>	0±0,00	100±0,00	100±0,00	100±0,00	100±0,00
<b>144</b>	0±0,00	100±0,00	100±0,00	100±0,00	100±0,00
<b>168</b>	0±0,00	100±0,00	100±0,00	100±0,00	100±0,00
<b>192</b>	0±0,00	100±0,00	100±0,00	100±0,00	100±0,00
<b>216</b>	0±0,00	100±0,00	100±0,00	100±0,00	100±0,00
<b>240</b>	0±0,00	100±0,00	100±0,00	100±0,00	100±0,00
<b>264</b>	0±0,00	100±0,00	100±0,00	100±0,00	100±0,00
<b>288</b>	0±0,00	100±0,00	100±0,00	100±0,00	100±0,00
<b>312</b>	0±0,00	100±0,00	100±0,00	100±0,00	100±0,00
<b>336</b>	0±0,00	100±0,00	100±0,00	100±0,00	100±0,00
<b>360</b>	0±0,00 <sup>b</sup>	100±0,00 <sup>b</sup>	100±0,00 <sup>b</sup>	100±0,00 <sup>b</sup>	100±0,00 <sup>b</sup>

\*Os resultados são a média das 5 repetições e são apresentados com o respectivo desvio padrão

\*\* Os resultados que apresentam a mesma letra não são estatisticamente diferentes, de acordo com o teste de Dunn

O óleo essencial de salsa teve um efeito muito grande na mortalidade de J2. Em todas as concentrações a mortalidade cumulativa corrigida atingiu os 100%. Este valor foi atingido às 48 horas nas concentrações de 500 e de 3000 ppm, às 72 horas na concentração de 1000 ppm, e às 120 horas na concentração de 2000 ppm. Estatisticamente houve diferenças muito significativas entre a testemunha e as restantes concentrações (ANOVA,  $F=13,59$ ,  $df=4$ ,  $P < 0,05$ ).



**Figura 17.** Mortalidade cumulativa, corrigida pela fórmula de Abbott, de J2 de *M. javanica*, durante 360 horas de exposição ao óleo essencial de salsa.

### 3. Efeito da aplicação directa no solo da parte aérea das plantas

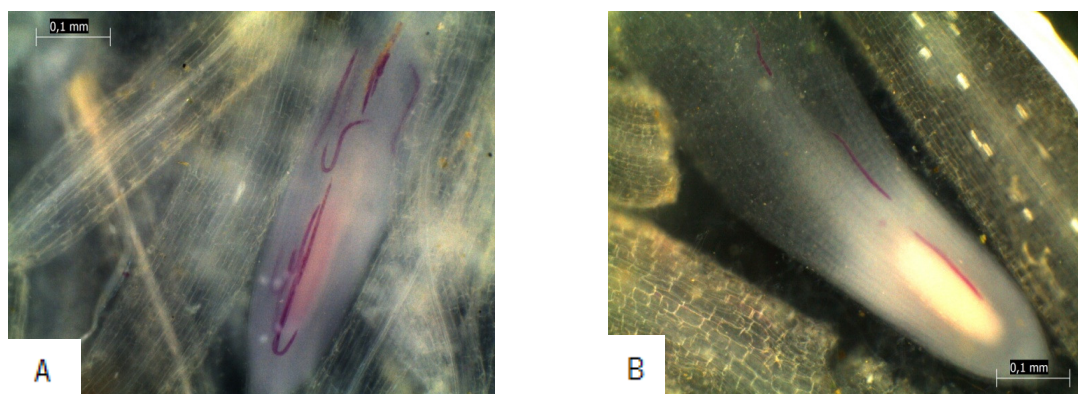
#### 3.1 Penetração de jovens de segundo estágio de *Meloidogyne javanica* em raízes de tomateiro

Os resultados sobre os efeitos da aplicação directa no solo, da parte aérea de algumas espécies vegetais, na penetração de J2 nas raízes de tomateiro (Fig. 18), encontram-se na Tabela 13 e na Figura 19.

**Tabela 13.** Número de J2 que penetraram nas raízes de tomateiro ao fim de 7 dias.

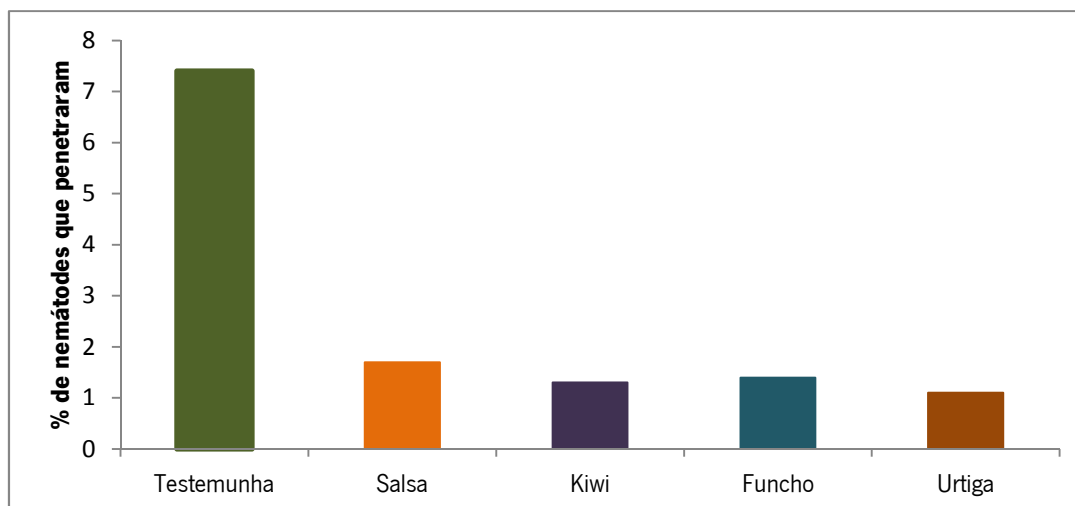
Testemunha	Salsa	Kiwi	Funcho	Urtiga
74± 5,51	17± 4,36	13± 5,51	14± 4,16	11± 1,53

\*Os resultados são a média das 3 repetições e são apresentados com o respectivo desvio padrão



**Figura 18.** Jovens de *M. javanica* no segundo estágio, no interior de uma raiz de tomateiro no ensaio com aplicação de folhas secas de kiwi (A) e de urtiga (B).

As observações efectuadas ao microscópio invertido revelaram a presença de J2 em todas as raízes de tomateiros. Os resultados obtidos com a aplicação directa no solo da parte aérea da salsa, do kiwi, do funcho e da urtiga, revelaram efeito. A percentagem de J2 que penetraram nas raízes do tomateiro na testemunha (7,4%) foi superior quando comparada com a dos restantes tratamentos. As diferenças entre a testemunha e cada um dos outros tratamentos foram significativas (test-t,  $P < 0,05$ )



**Figura 18.** Inibição média da penetração de J2 de *M. javanica*, pela aplicação directa da parte aérea de salsa, de kiwi, de funcho e de urtiga, sobre solo de tomateiro infectado, durante 168 horas.

## 3.2 Efeito na população final

**3.2 População final de *Meloidogyne javanica* em raízes de tomateiro**

Os resultados sobre os efeitos da aplicação directa no solo, da parte aérea de algumas espécies vegetais, na população final de *M. javanica*, encontram-se na Tabela 14. Os vasos com os tomateiros foram inoculados com 1000 ovos.

**Tabela 14.** População final e índice de galhas nas raízes após decorridos 30 dias.

	IG*	Número de nemátodes	Número de ovos	População total	FR
<b>Testemunha</b>	5	39	16917	16956	>1
<b>Salsa</b>	2	32	1244	1275	>1
<b>Kiwi</b>	3	26	2158	2183	>1
<b>Funcho</b>	4	33	2242	2276	>1
<b>Urtiga</b>	3	64	687	751	<1

Os resultados são a média de 3 repetições, com excepção para a salsa em que foram utilizadas 2 repetições

\*IG – Índice de galhas numa escala de 0 a 5, em que 0=0, 1=1 a 2, 2=3 a 10, 3=11 a 30, 4=31 a 100, 5>100 galhas por sistema radicular (Taylor & Sasser, 1978)

FR (factor de reprodução) = Pf/Pi

No final dos 30 dias, os resultados obtidos demonstraram uma população bastante inferior, em cada um dos tratamentos, comparativamente com o branco. No tratamento com a parte aérea da salsa, foram utilizados somente dois replicados, devido à morte da outra réplica no decorrer da experiência. Estatisticamente as diferenças verificadas em cada um dos tratamentos e o branco são significativas (teste-t,  $P < 0,05$ ). A capacidade de infecção dos J2 diminuiu consideravelmente no tratamento com a parte aérea da urtiga (FR <1).

Neste ensaio também se mediu e pesou a parte aérea e a raiz de cada tomateiro. Os resultados são apresentados na Tabela 15.

**Tabela 15.** Peso e comprimento da parte aérea e da raiz dos tomateiros.

	<b>Parte aérea (cm)</b>	<b>Raiz (cm)</b>	<b>Parte aérea (g)</b>	<b>Raiz (g)</b>
<b>Testemunha</b>	15,33	24,50	12,52	12,17
<b>Salsa</b>	16,30	24,00	21,92	9,70
<b>Kiwi</b>	20,07	17,67	29,52	22,73
<b>Funcho</b>	18,00	21,03	21,37	11,38
<b>Urtiga</b>	21,63	20,70	28,15	8,61

Os resultados são a média de 3 repetições, com exceção para a salsa em que foram utilizadas 2 repetições

Numa observação geral, verificou-se que o comprimento médio da parte aérea dos tomateiros sujeitos a tratamento, é superior ao comprimento médio da parte aérea da testemunha. O peso da parte aérea também é superior nos tomateiros sujeitos ao tratamento.

Estatisticamente não se registaram diferenças entre as raízes de tomateiro tratadas com as folhas e as flores da salsa, e as raízes de tomateiro da testemunha em nenhum dos parâmetros observados. No tratamento com as folhas do kiwi, verificaram-se diferenças significativas, comparando com a testemunha, relativamente ao comprimento da raiz e ao peso da parte aérea. Os tomateiros sujeitos ao tratamento com as umbelas do funcho também não mostraram diferenças significativas em relação à testemunha. As raízes de tomateiro tratadas com as folhas da urtiga apresentaram diferenças pouco significativas em relação ao comprimento da parte aérea e diferenças significativas em relação ao peso da parte aérea, comparativamente à testemunha.

# Discussão

---

## IV - DISCUSSÃO

### 1. Efeito dos extratos aquosos das diferentes plantas sobre *Meloidogyne javanica*

Analisando os resultados obtidos verificou-se que o extrato aquoso do funcho teve efeito sobre a eclosão e a mortalidade de J2 de *M. javanica*, uma vez que inibiu de um modo significativo a eclosão e aumentou significativamente a mortalidade (Fig. 6 e 7). Os valores de inibição da eclosão cumulativa corrigida foram ligeiramente superiores nas concentrações de 2 e 3 mg/ml, e ainda mais acentuadas na concentração de 4 mg/ml. Embora o aumento da inibição da eclosão cumulativa se fosse verificando com o aumento da concentração do extrato, esta situação só foi mais evidente na concentração de 4 mg/ml em que o valor registado foi significativamente diferente em relação ao da testemunha (Fig. 6). Para além da inibição da eclosão, o extrato aquoso do funcho também pareceu retardar a eclosão. Observando os tempos de eclosão, verificou-se que na concentração mais elevada, a eclosão teve início às 240 horas, quando a eclosão na testemunha já tinha atingido 100% nesse mesmo tempo (Tab.1). Estes resultados podem ser indicadores da presença de compostos fitoquímicos com acção inibidora no funcho. Relativamente à mortalidade, também se verificou um aumento da mortalidade com o aumento da concentração, facto não tão evidente entre as concentrações de 1 e 2 mg/ml (Fig. 7). Na concentração mais elevada, 4 mg/ml, a mortalidade atingiu os 100% ao terceiro dia (72 horas) e na concentração de 3 mg/ml, a mortalidade corrigida foi de 82,8%. Nestas duas concentrações (as mais elevadas), as diferenças em relação à testemunha, foram fortemente significativas. Verificou-se também que o aumento da concentração atrasou o início da mortalidade (Tab. 2). Os resultados relativos à mortalidade poderão ser indicadores da presença no funcho, de compostos fitoquímicos com acção nematotóxica ou nematocida.

Efeitos semelhantes, quer na eclosão quer na mortalidade, foram descritos por outros autores relativamente ao uso do extrato de funcho na eclosão e mortalidade de *M. incognita* (Ibrahim *et al.*, 2006).

Em relação ao extrato aquoso das folhas de kiwi, não houve grande efeito na eclosão de J2 de *M. javanica*. (Fig. 8). Na concentração de 1 mg/ml houve um estímulo da eclosão, situação que se manteve até ao final do ensaio. Apesar de não se terem registado diferenças significativas entre as concentrações utilizadas, observou-se que nas concentrações mais elevadas a inibição da eclosão foi maior. Verificou-se ainda que os tempos de início da eclosão foram aumentando consoante o aumento da concentração (Tab. 3). Pelos resultados obtidos, nenhuma ilação poderá ser definitivamente tirada. Deveriam ser realizados ensaios com concentrações mais elevadas para confirmar se o aumento da inibição da eclosão é uma tendência, com possível accção inibidora ou se o extrato não tem nenhum efeito sobre a eclosão. Relativamente aos dados sobre a mortalidade dos jovens de *M. javanica*, o extrato das folhas de kiwi, não surtiu qualquer efeito, com excepção na concentração de 4 mg/ml (Fig. 9). Nesta concentração a mortalidade foi de 32%, uma diferença significativa comparativamente com as restantes e à testemunha em que a eclosão não ocorreu (Tab. 4). Novos ensaios teriam que ser feitos com concentrações mais elevadas, que pudessem confirmar o eventual efeito nematotóxico ou nematodocida do kiwi.

Analisando os dados obtidos com o extrato aquoso das folhas de salsa na eclosão de J2 de *M. javanica*, observou-se que não houve qualquer efeito (Fig. 10). A inibição da eclosão nas concentrações testadas foi ligeiramente superior comparativamente com a testemunha, mas só na concentração de 3 mg/ml é que esse valor revelou uma diferença estatística, embora pouco significativa (Tab. 5). Compostos inibidores extraídos por este método, parece não existirem ou poderão encontrar-se em quantidades tão ínfimas que não produzem qualquer resultado. Relativamente ao efeito sobre a mortalidade dos jovens de *M. javanica*, também não se registou qualquer diferença significativa (Fig. 11). Somente na concentração de 4 mg/ml é que houve registo de mortalidade (1%).

Estes dados são corroborados por Salgado & Campos (2003), que também não obtiveram resultados positivos quer na eclosão quer na mortalidade de J2 de *M. exigua*, recorrendo ao extrato aquoso obtido a partir de folhas e flores de salsa.

O extrato das folhas de urtiga mostrou pouco efeito sobre a eclosão, ao contrário do que ocorreu na mortalidade (Fig. 12 e 13). Na concentração mais elevada registou-se uma inibição da eclosão cumulativa corrigida de 43%, diferença pouco significativa quando comparada com o branco. Entre as concentrações de 1, 2 e 3 mg/ml não se registou qualquer dissemelhança na



percentagem da inibição da eclosão cumulativa no final do ensaio, tendo a única alteração ocorrido no tempo em que se iniciou a eclosão (Tab. 7). Um estudo com concentrações mais elevadas deste extrato deveria ser levado a cabo, de forma a apurar se a percentagem de inibição da eclosão aumenta de forma significativa. Este extrato demonstrou ter efeito sobre a mortalidade de jovens de *M. javanica* (Fig. 13). A percentagem de mortalidade aumentou em função do aumento da concentração, registando-se, na concentração mais elevada, o maior número de J2 mortos (92,9%). Nas concentrações de 1 e 2 mg/ml, a mortalidade (15,1 e 18,2%, respectivamente), embora superior à da testemunha, não foi significativamente diferente (Tab. 8). Numa análise do início da ocorrência da mortalidade, observou-se que nas concentrações mais elevadas esta ocorreu nas primeiras 48 horas enquanto que, na concentração mais baixa, ocorreu apenas a partir das 264 horas. Estes dados são indicadores de que no extrato aquoso da urtiga podem não existir compostos inibidores (ou não estavam em concentrações que induzissem efeito), mas sugerem a presença de substâncias nematotóxica ou nematodocidas.

O efeito demonstrado pelo extrato aquoso do funcho e pelo extrato aquoso da urtiga, permite considerar que, de entre os extratos testados, estes dois são os que parece possuírem mais potencial, com efeitos contra J2 da espécie de *Meloidogyne* testada. Segundo Ferris & Zheng (1999), o uso de um só extrato aquoso poderá não ser suficiente, tendo proposto que a mistura de diferentes compostos com modos de acção distintos poderá ser uma alternativa mais eficaz. Assim, um estudo sobre as possíveis interações de outros extratos com estes dois, deveria ser planeado no futuro. O efeito de estímulo na eclosão de J2 de *M. javanica* já tinha sido observado por Luques (2009), com o extrato de *Hypericum* spp. nas concentrações mais baixas. O que poderá significar que existe um composto comum, ou que tenha o mesmo efeito, sobre *M. javanica*.

O resultado da aplicação de um extrato vegetal varia consoante a sua concentração. Uma maior quantidade de extrato, assim como o aumento do tempo de exposição ao mesmo, comparando com nematodocidas convencionais, poderá ser necessário para que haja efeito. Para algumas espécies vegetais, é recomendada a extração dos compostos com álcool ou outros solventes, com ou sem calor (Ferris & Zheng, 1999; Chitwood, 2002). Diferentes modos de extração, podem também retirar da planta outros compostos com mais actividade sobre os

nemátodes. Face a isto, o estudo do efeito dos extratos aquosos em concentrações mais elevadas teria interesse, assim como o estudo do efeito de compostos extraídos com outros solventes, sobre os NGR. Embora a preferência deva ser dada aos extratos aquosos, por permitirem uma aplicação mais prática e sem necessidade de processamento industrial (Chitwood, 2002).

## **2. Efeitos dos óleos essenciais de funcho e de salsa sobre *Meloidogyne javanica***

O óleo essencial do funcho demonstrou ter alguma actividade na eclosão dos J2 de *Meloidogyne javanica*. Apesar de nas concentrações mais baixas o efeito não ter sido evidente, a inibição da eclosão cumulativa ocorreu em maior percentagem (69,9%) na concentração de 2000 ppm, ligeiramente superior à ocorrida na concentração de 3000 ppm (Fig. 14). Na observação dos tempos de eclosão, foi constatado que quanto maior foi a concentração, mais tarde teve início a eclosão. É possível afirmar a presença de compostos fitoquímicos com acção inibidora (Tab. 9). Oka *et al.* (2000) estudaram o óleo essencial desta planta na eclosão de *M. javanica*, tendo obtido igualmente resultados positivos; no entanto, o método de diluição utilizado foi diferente, o que poderá interferir nos resultados. Efeitos semelhantes foram também obtidos por Ibrahim *et al.* (2006), embora o método utilizado por estes autores fosse ligeiramente diferente. O efeito deste óleo na eclosão de J2 de *Meloidogyne* spp. também foi avaliado em *M. graminicola*, por Steffen *et al.* (2008), que obtiveram efeitos semelhantes. Quanto ao ensaio sobre a mortalidade, o efeito que este óleo demonstrou indica claramente a presença de compostos com acção nematotóxica ou nematodocida (Fig. 15). Na concentração mais baixa, a mortalidade iniciou-se ao segundo dia, tendo atingido no final do ensaio 24,7%. Desta concentração para a de 2000 ppm houve um aumento significativo da percentagem de mortalidade. Na concentração mais elevada, a mortalidade começou a ser registada a partir da terceira hora, chegando a 95,88% no final do ensaio. Vários autores têm descrito o potencial deste óleo essencial (Oka *et al.*, 2000; Ibrahim *et al.*, 2006; Steffen *et al.*, 2008; Ntalli *et al.*, 2010) sobre a mortalidade de J2 de *Meloidogyne* spp. assim como sobre outras espécies (Barbosa *et al.*, 2010).

---

O potencial do óleo essencial de salsa sobre a eclosão e a mortalidade dos J2 de *Meloidogyne* spp não tem sido muito estudado. Pelos resultados obtidos, este óleo tem um elevado potencial que deverá ser explorado (Fig. 16 e 17). A inibição da eclosão em todas as concentrações testadas foi superior a 90%, tendo chegado a atingir 100% na concentração de 2000 ppm. Estes resultados não deixam muitas dúvidas sobre a presença de substâncias fitoquímicas com acção inibidora. Relativamente à mortalidade, este óleo teve também um efeito significativo. Em todas as concentrações provocou mortalidade de 100%, tendo este valor sido atingido 48 horas após o início do ensaio nas concentrações de 500, 1000 e 3000 ppm.

A caracterização do óleo essencial de funcho e a avaliação isolada dos seus compostos sobre os nemátodes já foi estudada por alguns autores (Oka *et al.*, 2000; Ntalli *et al.*, 2010), com resultados positivos. Na caracterização do óleo essencial de funcho (plantas colhidas na fase de maturação das infrutescências), levada a cabo no laboratório de Biologia Vegetal da Universidade do Minho, identificaram-se como principais constituintes o *trans*-anetole (48,4%), a fenchona (16,3%) e o  $\alpha$ -felandreno (13,7%). Em artigos já publicados (Oka *et al.*, 2000; Ntalli *et al.*, 2010), os autores testaram a fenchona e o *trans*-anetole tendo obtido resultados semelhantes. De acordo com Sousa *et al.* (2005), o teor de óleo essencial varia consoante a região da planta da qual é extraído, assim como os seus componentes variam quantitativa e qualitativamente de acordo com a fenologia e a altura do ano em que a planta é colhida.

No que se refere ao óleo essencial (comercial) da salsa, na sua caracterização foram identificados como principais constituintes a miristicina (31,5%),  $\alpha$ -pineno (16,2%) e o apiole (15,9%). Alguns destes compostos, a miristicina e o  $\alpha$ -pineno, foram testados isoladamente (Babu *et al.*, 2012), obtendo resultados semelhantes ao do óleo essencial. Em futuros ensaios sugere-se a utilização de concentrações mais baixas do que as testadas, para encontrar a menor concentração com o máximo efeito.

### **3. Avaliação da acção da aplicação directa da parte aérea das diferentes plantas na penetração de jovens do segundo estágio de *Meloidogyne javanica* em tomateiro**

No ensaio realizado para o estudo do efeito das diferentes espécies vegetais seleccionadas na penetração de *M. javanica* nas raízes de tomateiro, registaram-se diferenças significativas para todas as plantas testadas. Na testemunha 7,1% dos J2 penetraram nas raízes, enquanto que nos outros tratamentos a percentagem de nemátodes que penetrou nas raízes não chegou a 2% (Fig. 18). Estes resultados parece indicarem, que, apesar dos extraxtos aquoso da salsa e do kiwi não terem produzido forte efeito na mortalidade e na eclosão, parece terem exercido alguma influência inibitória na penetração na raiz dos J2 de *M. javanica*. Este efeito poderá ter-se devido à concentração de compostos que eventualmente não foram extraídos pela água, mas que no solo se tenham degradado e actuado sobre a capacidade de penetração do J2.

Estes resultados são satisfatórios, uma vez que a aplicação da parte aérea das plantas directamente no solo poderá ser uma boa alternativa no controlo de nemátodes, com custos baixos uma vez que as espécies utilizadas são abundantes na cultura portuguesa.

### **4. Avaliação da acção da aplicação directa da parte aérea das diferentes plantas na população final de *Meloidogyne javanica* em tomateiro**

A aplicação da parte aérea das espécies vegetais testadas também demonstrou um efeito positivo no controlo da população final do nemátode (Fig. 19). Nos tomateiros da testemunha, a população total final de *M. javanica* foi muito superior à registada nos tomateiros sujeitos ao tratamento com a parte aérea das plantas. Destas, a urtiga foi a que pareceu exercer uma maior influência na diminuição de capacidade de reprodução do nemátode (FR <1).

O efeito que a parte aérea das plantas testadas possa exercer no tomateiro não ficou muito clarificado (Fig. 20). O comprimento médio da parte aérea dos tomateiros sujeitos aos tratamentos, assim como o seu peso, foi superior ao dos tomateiros da testemunha. Este

---

resultado também poderá ser devido à extensão da infecção. A aplicação das plantas no solo, poderá ter levado a uma interacção com o nemátode, influenciando a sua capacidade de reprodução, mas também poderá ter exercido uma influência positiva no desenvolvimento do tomateiro.

O funcho, o kiwi, a salsa e a urtiga, demonstraram possuir substâncias fitoquímicas com alguma acção sobre os nemátodes. As folhas de kiwi, tanto na formulação em extrato como na aplicação directa, parecem não ter produzido resultados tão significativos, comparativamente às outras plantas testadas. No entanto, a incorporação destas plantas no solo pode ser benéfica em vários aspectos. Além da influência que parece poder exercerem na penetração do J2 de *M. javanica*, as suas folhas são um excedente da agricultura e a sua utilização, além de prática, é económica.

Em extrato aquoso, foram o funcho e a urtiga que revelaram o maior efeito e, na forma de óleo essencial, novamente o funcho, e também a salsa, mostraram bons resultados. De forma a garantir que se utilize o melhor método, deveriam ser levados a cabo ensaios com diferentes partes da planta, métodos diferentes de aplicação dos extratos (como por exemplo a incorporação no solo antes do transplante do tomateiro). No entanto, antes de se poder garantir o seu uso como biopesticidas (isolados ou em conjunto) e passar para ensaios de campo, deverá ter-se em consideração os possíveis efeitos noutros organismos do solo, essenciais à decomposição, e ainda o efeito que certos compostos poderão ter na própria cultura em causa.

# Considerações finais

## V - CONSIDERAÇÕES FINAIS

Destaca-se, do trabalho realizado, as seguintes conclusões:

- As plantas testadas nos ensaios realizados durante esta investigação, funcho, kiwi, salsa e urtiga, revelaram resultados promissores no controlo da espécie de nemátodes-das-galhas-radiculares, *Meloidogyne javanica*.
- Os extratos aquosos com efeito mais acentuado e significativo, foram o de funcho e o de urtiga, comparativamente com os das outras duas espécies testadas.
- Os óleos essenciais de funcho e de salsa mostraram ter uma forte acção nematotóxica e nematodocida sobre J2 de *M. javanica*, depreendendo-se deste modo um enorme potencial na sua acção no controlo destes nemátodes.
- A aplicação de folhas de urtiga directamente sobre solo teve um efeito significativo sobre a penetração dos J2 de *M. javanica* nas raízes do tomateiro.

Considera-se ainda ser da maior importância continuar esta investigação futuramente, tendo em conta que:

- os compostos, constituintes dos óleos essenciais do funcho e da salsa;
- a utilização de diferentes métodos de extração dos compostos vegetais, recorrendo a outros solventes para além da água, para que a sua acção possa ser também testada no controlo de *M. javanica*;
- o efeito, tanto dos extratos destas plantas como dos óleos essenciais, sobre outros organismos presentes no solo;
- a acção das plantas estudadas sobre outros isolados de *M. javanica*, outras espécies de *Meloidogyne* e, até de outros nemátodes fitoparasitas;
- a interacção dos compostos com os nemátodes e com as raízes de tomateiro, de forma mais aprofundada, de maneira a poder conhecer-se e entender-se toda a complexa relação entre os diversos agentes.

# Referências Bibliográficas



## VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abad**, P., Favery, B., Rosso, M. & Castagnone-Sereno, P. (2003). Root-knot nematode parasitism and host response: molecular basis of a sophisticated interaction. *Molecular Plant Pathology* 4(4): 217-224.
- Abrantes**, I., Santos, M. C. V., Clara, M. I., Fernandes, J. E. & Marques, M. L. (2007). Principais doenças e pragas do tomateiro e meios de luta. Instituto do Ambiente e Vida, Departamento de Zoologia da Universidade de Coimbra.
- Al-Banna**, L., Darwish, R. M. & Aburjai, T. (2003). Effect of plant extracts and essential oils on root-knot nematode. *Phytopathologia. Mediterranea* 42: 123-128.
- Albuquerque**, M. R. J. R., Costa, S. M. O., Bandeira, P. N., Santiago, G. M. P., Andrade-Neto, M., Silveira, E. R. & Pessoa, O. D. L. Nematicidal and larvicidal activities of the essential oils from aerial parts of *Pectis oligocephala* and *Pectis apodocephala* Baker. *Academia Brasileira de Ciências*. 79(2): 209-213.
- Babu**, R. O., Moorkoth, D., Azeez, S. & Eapen, S. J. (2012). Virtual screening and *in vitro* assay of potential drug like inhibitors from spices against Glutathione-S-Transferase of *Meloidogyne incognita*. *Bioinformation* 8(7): 319-325.
- Balandrin**, M. F. & Klocke, J. A. (1988). Medicinal, aromatic and industrial materials from plants. *In* Medicinal and aromatic plants I, edited by Bajaj, Y. P. S. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Germany.
- Bajaj**, Y. P. S., Furmanowa, M. & Olszowska, O. (1989). Biotechnology of the micropropagation of medicinal and aromatic plants. *In* Medicinal and aromatic plants II, edited by Bajaj, Y. P. S. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Germany.
- Barbosa**, P., Lima, A. S., Vieira, P., Dias, L. S., Tinoco, M. T., Barroso, J. G., Pedro, L. G., Figueiredo, A. C. & Mota, M. (2010). Nematicidal activity of essential oils and volatiles derived from Portuguese aromatic flora against the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *Journal of Nematology* 42 (1): 8-16.

- Barker**, K. R., Carter, C. C. & Sasser, J. N. (1985). An Advanced Treatise on *Meloidogyne*, Volume II: Methodology. North Carolina State University Graphics.
- Barker**, K. R., Hussey, R. S., Krusberg, L. R., Bird, G. W., Dunn, R. A., Ferris, H., Ferris, V. R., Freckman, D. W., Gabriel, C. J., Grewal, P. S., MacGuidwin, A. E., Riddle, D. L., Roberts, P. A. & Schmidt, D. P. (1994). Plant and Soil Nematodes: Societal Impact and Focus for the Future. *Journal of Nematology* 26 (2): 127-137.
- Bnouham**, M., Merhfour, F., Ziyat, A., Mekhfi, H., Aziz, M. & Legssyer, A. (2003). Antihyperglycemic activity of the aqueous extract of *Urtica dioica*. *Fitoterapia* 74: 677-681.
- Bhuyan**, D. J. & Das, J. (2012). Plant extracts as biofungicides: a review. *Electronic Journal of Environmental Sciences* 5: 49-54.
- Boulogne**, I., Petit, P., Ozier-Lafontaine, H., Desfontaines, L. & Loranger-Merciris. (2012). Insecticidal and antifungal chemicals produce by plants: a review. *Environmental Chemical Letter*.
- Brady**, N. C. (1985). Agricultural research and food production. *In* An Advanced Treatise on *Meloidogyne*, Volume I: Biology and Control, edited by Sasser, J. N., Carter, C. C. North Carolina State University Graphics, Raleigh, North Carolina, USA.
- Brown**, (1987). Control strategies in low-value crops. *In* Principles and Practice of Nematode Control in Crops, edited by Brown, R. H., Kerry, B. R. Academic Press Australia.
- Byrd**, D. W., Jr, Kirkpatrick, T. & Barker, R. (1983). An Improved technique for clearing and staining plant tissues for detection of nematodes. *Journal of Nematology* 15 (1): 142-143.
- Cantore**, P., Iacobellis, N. S., De Marco, A., Capasso, F. & Senatore, F. (2004). Antibacterial activity of *Coriandrum sativum* L. and *Foeniculum vulgare* (Miller) Essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 7862-7866.
- Carvalho**, P. R. S. (2010). Extratos Vegetais: Potencial Elicitor de Fitoalexinas e Atividade Antifúngica em Antracnose do Cajueiro. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências

Agrárias e Veterinárias na Universidade Estadual Paulista: Júlio de Mesquita Filho, S.Paulo, Brasil.

- Celano, G., D'Auria, M., Xiloyannis, C., Mauriello, G. & Baldassarre, M. (2006).** Composition and seasonal variation of soluble cuticular waxes in *Actinidia deliciosa* leaves. *Natural Product Research*, 20 (8):, 701-709.
- Chitwood, D. J. & Perry, R. N. (2009).** Reproduction, Physiology and Biochemistry. *In* Root-knot nematodes, edited by Perry, R. N., Moens, M., Starr, J. L. CAB International, Oxfordshire, UK.
- Chitwood, D. J. (2002).** Phytochemical based strategies for nematod control. *Annual Review of Phytopathology* 40: 221-49.
- Choi, E. & Hwang, J. (2004).** Antiinflammatory, analgesic and antioxidant activities of the fruit *Foeniculum vulgare*. *Fitoterapia* 75: 557-565.
- Costa, M. J. N., Campos, V. P., Pfenning, L. H. & Oliveira, D. F. (2002).** Patogenicidade e reprodução de *Meloidogyne incognita* em tomateiros (*Lycopersicon esculentum*) com aplicação de filtrados fúngicos ou extratos de plantas e de esterco. *Nematologia Brasileira* 26(1): 5-12.
- Coyne, D. L., Nicol, J. M. & Claudius-Cole, B. (2007).** Nematologia prática: Um guia de campo e de laboratório. International Institute of Tropical Agriculture.
- Cunha, A. P., Silva, A. P., Roque, O. R. & Cunha, E. (2008).** Plantas e produtos vegetais em cosmética e dermatologia, 2ª edição. Fundação Calouste Gulbenkian.
- Cunha, A. P., Ribeiro, J. A. & Roque, O. R. (2009).** Plantas Aromáticas em Portugal, Caracterização e Utilizações, 2ª edição. Fundação Calouste Gulbenkian.
- De Ley, P. & Blaxter, M. (2002).** Systematic Position and Phylogeny. *In* The Biology of Nematodes. Edited by Lee, D. L. School of Biology, University of London, UK.
- Dewick, P. M. (2002).** Medicinal natural products, a biosynthetic approach. Second edition. John Wiley & Sons, Ltd.
- Dixon, R. A. (2001).** Natural products and plant disease resistance. *Nature* 411, 843-847.

- Eisenback**, J. D. (1985). Detailed morphology and anatomy of second – stage juveniles, males, and females of the genus *Meloidogyne* (root-knot nematodes). *In* An Advance Treatise on *Meloidogyne*, Volume I: Biology and Control, edited by Sasser, J. N., Carter, C. C. North Carolina State University Graphics, Raleigh, North Carolina, USA.
- Eisenback**, J. D. & Triantaphyllou, H. H. (1991). Root- knot nematodes: *Meloidogyne* species and races. *In* Manual of Agricultural Nematology, edited by Nickle, William R. Beltsville Agricultural Research Center, United States Department of Agriculture, Beltsville, Maryland, USA.
- Fabry**, C.F.S., Freitas, L.G., Neves, W.S., Coutinho, M.M., Tótola, M.R., Oliveira, J.R., Dallemolegiaretta, R. & Ferraz, S. (2007). Obtenção de bactérias para o biocontrole de *Meloidogyne javanica* por meio de aquecimento de solo e tratamento com filtrado de raízes de plantas antagonistas a fitonematóides. *Fitopatologia Brasileira* 32: 79-82.
- Faudale**, M., Viladomat, F., Bastida, J., Poli, F. & Codina, C. (2008). Antioxidant activity and phenolic composition of wild, edible and medicinal fennel from different mediterranean countries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56: 1912-1920.
- Ferraz**, L. C. C. B. (2001). As meloidoginoses da soja: passado, presente e futuro. *In* Relações parasito-hospedeiro nas meloidoginoses da soja, edit by Silva, J. F. V. Londrina: EMBRAPA – Soja, 15-38.
- Ferraz**, S. & Freitas, L. G. (2008). O Controle de fitonematóides por plantas antagonistas e produtos naturais. Universidade Federal de Viçosa, Brasil.
- Ferris**, H., Zheng, L. (1999). Plant sources of chinese herbal remedies: effects on *Pratylenchus vulnus* and *Meloidogyne javanica*. *Journal of Nematology* 31 (3):241.263.
- Fuller**, V. L., Lilley, C. J. & Urwin, P. E. (2008). Tansley review: Nematode resistance. *New Phytologist* 180: 27-44.
- Galhano**, C. I. C., Ryan, M. F., Santos, M. S. N. A. & Staritsky, G. (1997). Interactions between tannia (*Xanthosoma sagittifolium*) and the root-knot nematodes, *Meloidogyne megadora* and *M. javanica*. *Nematopica* 27(1): 7-17.

- Galhano, C. I. C.** (2005). Efeitos de plantas aráceas (*Colocasia esculenta* e *Xanthosoma sagittifolium*) sobre nemátodes-de-galhas-radiculares (*Meloidogyne javanica* e *M. megadora*). Tese de Doutorado. Departamento de Zoologia da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, Portugal.
- Guillén, M. D. & Manzanos, M. J.** (1996). A Study of several parts of the plant *Foeniculum vulgare* as a source of compounds with industrial interest. *Food Research International* 29(1): 85-88.
- Hague, N. G. M.** (2009). Perspective in Applied Nematology. *Nematology* 11(1): 1-10.
- Huang, C. S.** (1985a). Formation, anatomy and physiology of giant cells induced by root-knot nematodes. *In An Advanced Treatise on Meloidogyne*, Volume I: Biology and Control, edited by Sasser, J. N., Carter, C. C. North Carolina State University Graphics, Raleigh, North Carolina, USA.
- Huang, C. S.** (1985b). Mechanisms of resistance to root-knot nematodes. *In An Advanced Treatise on Meloidogyne*, Volume I: Biology and Control, edited by Sasser, J. N., Carter, C. C. North Carolina State University Graphics, Raleigh, North Carolina, USA.
- Hostettmann, K., Marston, A., Maillard, M. & Hamburguer, M.** (1995). Phytochemistry of plants used in traditional medicine. Clarendon Press, Oxford, UK.
- Hussey, R. S.** (1985). Host-parasite relationships & associated physiological changes. *In An Advance Treatise on Meloidogyne*, Biology and Control, by Sasser, J. N. & Carter, C. C. North Carolina State University, Raleigh, North Carolina, USA.
- Ibrahim, S. K., Traboulsi, A. F. & El-Haj, S.** (2006). Effect of essential oils and plant extracts on hatching, migration and mortality of *Meloidogyne incognita*. *Phytopathologia Mediterranea* 45: 238–246.
- Ibrahim, S. K. & Traboulsi, A. F.;** (2009). The impact f solarisation integrated with plant bio-fermentation on root-knots nematodes. *Lebanese Science Journal* 10(2): 59-69.
- Kaur, G. J. & Arora D. S.** (2010). Bioactive potential of *Anethum graveolens*, *Foeniculum vulgare* and *Trachyspermum ammi* belonging to the family Umbelliferae – Current status. *Journal of Medicinal Plants Research* 4 (2): 87-94.

- Kerry, B. R. & Hominick, W. M. (2002).** Biological control. *In* The biology of nematodes, edited by Lee, D. L. School of Biology, University of Leeds, UK.
- Kim, D. & Ahn, Y. (2001).** Contact and fumigant activities of constituents of *Foeniculum vulgare* fruit against three coleopteran stored-product insects. *Pest Management Science* 57: 301-306.
- Kleynhans, K. P. N. (1999).** Collecting and Preserving Nematodes. Compiled by the National Collection of Nematodes Biosystematics Division, ARC – Plant Protection Research Institute Pretoria, South Africa.
- Kokalis-Burelle, N. & Rodríguez-Kábana, R. (2006).** Allelochemicals as biopesticides for management of plant-parasitic nematodes. *Allelochemicals: Biological Control of Plant Pathogens and Diseases* 2: 15-29.
- Koul, O., Walia, S. & Dhaliwal, G. S. (2008).** Essential oils as green pesticides: potential and constraints. *Biopesticides International* 4 (1): 63-84.
- Koul, O. & Walia, S. (2009).** Comparing impacts of plant extracts and pure allelochemicals and implications for pest control. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources* 4 (049).
- Lahlou, M. (2004).** Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytotherapy Research* 18: 435-448.
- Luques, R. P. (2009).** Acção de *Hypericum* spp. Sobre *Meloidogyne javanica* (nemátode-das-galhas-radiculares) e *Bursaphelenchus xylophilus* (nemátode-da-madeira-do-pinheiro). Tese de Mestrado. Escola de Ciências da Universidade do Minho.
- Maggenti, A. (1981).** General Nematology. Springer-Verlag New York, Inc.
- Mai, W. F. (1985).** Plant-parasitic nematodes: their threat to agriculture. *In* An Advanced Treatise on *Meloidogyne*, Volume I: Biology and Control, edited by Sasser, J. N., Carter, C. C. North Carolina State University Graphics, Raleigh, North Carolina, USA.

- Maleita, C. M. N.** (2011). Biology and ecology of the root-knot nematode *Meloidogyne hispanica*. Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências e Tecnologia, da Universidade de Coimbra.
- Maleita, C., Curtis, R. & Abrantes, I.** (2012). Thermal requirements for the embryonic development and the life cycle of *Meloidogyne hispanica*. *Plant Pathology* 61(5): 1002-1010.
- Mattiuz, B. H. & Fachinello, J. C.** (1996). Enraizamento de estacas de kiwi *Actinidia deliciosa* (A. Chev.) C. F. Liang & A. R. Ferguson var. *deliciosa*. *Pes. Agropec. Brasilisa* 31: 503-508.
- Neves, W. S., Freitas, L. G., Fabry, C. F. S., Dallemole-Giaterra, R., Ferreira, P. A., Ferraz, L. O., Dhingra, O. D. & Ferraz, S.** (2008). Ação nematicida de óleo, extratos vegetais e dois produtos à base de capsaicina, capsainóides e alil isotiocianato sobre juvenis de *Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood. *Nematologia Brasileira* 32(2): 93-100.
- Neves, W. S., Freitas, L. G., Dallemole-Giaterra, R., Zooca, R. J. F. & Coutinho, M. M.** (2010). Efeito de extratos botânicos sobre a eclosão e inativação de juvenis de *Meloidogyne javanica* e de *M. incognita*. *Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas* 4(1): 8-16.
- Nogueira, M. A., Oliveira, J. S., Ferraz, S. & Santos, M. A.** (1996). Nematicidal constituents in *Mucuna aterrima* and its activity on *Meloidogyne incognita* Race 3. *Nematologia Mediterranea* 24: 249-252.
- Ntalii, N. G., Ferrari, F., Giannakouc, I. & Menkissoglu-Spiroudia, U.** (2010). Synergistic and antagonistic interactions of terpenes against *Meloidogyne incognita* and the nematicidal activity of essential oils from seven plants indigenous to Greece. *Pest Management Science* 67:341–351.
- Oka, Y., Nacar S., Putievsky, E., Ravid, U., Yaniv, Z. & Spiegel, Y.** (2000 a). Nematicidal activity and their components against the root-knot nematode. *Phytopathology* 90(7): 710-715.
- Oka, Y., Koltai, H., Bar-Eyal, M., Mor, M., Sharon, E., Chet, I. & Spiegel, Y.** (2000 b). New strategies for the control of plant-parasitic nematodes. *Pest Management Science* 56: 983-988.

- Piccaglia, R. & Marotti, M.** (2001). Characterization of some italian types of wild fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.). *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 49: 239-244.
- Rather, M. A., Dar, B. A., Sofi, S. N., Bhat, B. A. & Qurishi, M. A.** (2012). *Foeniculum vulgare*: A comprehensive review of its traditional use, phytochemistry, pharmacology, and safety. *Arabian Journal of Chemistry*; review. In press.
- Romeilah, R. M., Fayed, S. A. & Mahmoud, G.** (2010). Chemical compositions, antiviral and antioxidant activities of seven essential oils. *Journal of Applied Sciences Research* 6(1): 50-62.
- Salgado, S. M. L. & Campos, V. P.** (2003). Eclosão e mortalidade de *Meloidogyne exigua* em extratos e em produtos naturais. *Fitopatologia Brasileira* 28 (2): 166-170.
- Salisbury, F. B. & Ross, C. W.** (1992). *Plant Physiology*. Wadsworth, Inc. Belmont, California, USA.
- Saquet, A. A. & Brackmann, A.** (1995). A Cultura do Kiwi, Revisão Bibliográfica. *Ciência Rural* 25 (1): 177-182.
- Sasser, J. N.** (1980). Root-knot nematodes: a global menace to crop production. *Plant Disease* 64: 36-41.
- Sasser, J. N., Carter, C. C. & Hartman, K. M.** (1984). Standardization of host suitability studies and reporting of resistance to root-knot nematodes. North Carolina State University Graphics, Raleigh, North Carolina, USA.
- Sasser, J. N. & Carter, C. C.** (1985). Overview of the international *Meloidogyne* project 1975-1984. *In* An Advanced Treatise on *Meloidogyne*, Volume I: Biology and Control, edited by Sasser, J. N., Carter, C. C. North Carolina State University Graphics, Raleigh, North Carolina, USA.
- Sousa, L. A., Albuquerque, J. C. R., Leite, M. N. & Stefanini, M. B.** (2005). Sazonalidade dos ductos secretores e óleo essencial de *Foeniculum vulgare* var. Mill. (Apiaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia* 15(2): 155-161.



- Southey**, J. F. (1986). Laboratory methods for work with plant and soil nematodes. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, London.
- Steffen**, R. B., Antonioli, 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* 32(2):126-134.
- Taba**, S., Sawada, J. & Moromizato, Z. (2008). Nematicidal activity of Okinawa Island plants on the Root-Knot nematode *Meloidogyne incognita* (Kofoid and White) Chitwood. *Plant Soil* 303: 201-216.
- Taylor**, A. L. & Sasser, J. N. (1978). Biology identification and control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* Species). North Carolina State University Graphics, Raleigh, North Carolina, USA.
- Tapwal**, A., Nisha, Garg, S., Gautam, N. & Kumar, R. (2011). *In Vitro* Antifungal potency of plant extracts against five phytopathogens. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 54(6): 1093-1098.
- Tinoco**, M. T., Martins, M. R. & Cruz-Morais, J. (2007). Actividade antimicrobiana do óleo essencial do *Foeniculum vulgare* Miller. *Revista de Ciências Agrárias* 30 (1)
- Viglierchio**, D. R. (1991). The World of Nematodes, a fascinating component of the animal kingdom. University of California, College of Agriculture and Environmental Science, Davis, California.
- Weischer**, B. & Brown D. J. F. (2000). An introduction to nematodes, general nematology, A student`s textbook. Pensoft Series Parasitologica n°1, Bulgaria.
- Wink**, M. (1993). Production and application of phytochemicals from as agricultural perspective. *In* *Phytochemistry and Agriculture*, edited by Beek, T. A. & Breteler, H. *Proceedings of the Phytochemical Society of Europe* 34: 171-213.
- Wouts**, W, M. (1979). Characterization of the family Meloidogynidae with a discussion on its relationship to other families of the suborder Tylenchina based on gonad morphology. *In* *Root-Knot Nematodes (Meloidogyne species), Systematics, Biology and Control*, edit by Lamberti, F. & Taylor, C. E. (1979). Academic Press Inc. London, UK.

- Zar, J. H.** (1996). Biostatistical analysis. New Jersey, Prentice Hall International, USA.
- Zasada, I. A., Ferris, H. & Zheng, L.** (2002). Plant sources of chinese herbal remedies: laboratory efficacy, supression of *Meloidogyne javanica* in soil, and phytotoxicity assays. Journal of Nematology 34(2): 124-129.
- Zhang, H., Chen, F., Wang, X. & Yao, H.** (2006). Evaluation of antioxidant activity of parsley (*Petroselinum crispum*) essential oil and identification of its antioxidant constituents. Food Research International 39: 833-839.
- Zorilla, R. A.** (2003). Nematode extraction from roots and soil. University of the Philippines Los Baños, College, Laguna, Philippines.