



Diferentes Métodos e Concentrações de Extratos de Folhas de Nim sobre a Mortalidade de *Meloidogyne javanica*, *in VITRO*

Lidiane Magalhães Madureira, Bruna Hanielle Carneiro dos Santos, Isac Pereira Martins Soares, Regina Cássia Ferreira Ribeiro, Adelica Aparecida Xavier, Paulo Victor Magalhães Pacheco, Fabíola de Jesus Silva

Introdução:

O controle biológico tem-se apresentado como uma alternativa bastante viável para o manejo de fitonematóides, por minimizar o dano ambiental e ser mais vantajoso economicamente, quando comparado aos métodos químicos convencionais [1]. Os extratos vegetais podem controlar fitopatógenos, agindo diretamente por sua atividade antimicrobiana e indiretamente por meio da indução de resistência [2]. Dentre as plantas que podem ser utilizadas via extratos, o Nim (*Azadirachta indica* A. Juss) constitui-se numa alternativa interessante já que tem apresentado resultados de redução de fitopatógenos tanto de parte aérea quanto de solo. Diferentes produtos do Nim têm sido testados no controle de fitopatógenos e com resultados promissores em fitonematóides [3]. Assim o objetivo desse trabalho foi avaliar *in vitro* o efeito de diferentes extratos aquosos de folhas de nim e diferentes concentrações sobre a mortalidade e motilidade de juvenis de *Meloidogyne javanica*.

Material e métodos

A. Inóculo de *Meloidogyne javanica*

Raízes de tomateiro 'Kada' cultivado em casa de vegetação com sintomas de galhas foram levadas ao laboratório de Fitopatologia, sendo cuidadosamente lavadas em água parada para não eliminar massas de ovos aderidas. Em seguida com auxílio de estilete retiraram-se as massas de ovos presentes nas galhas. Essas massas foram colocadas em câmara de eclosão, que foi montada em placa de Petri de nove centímetros de diâmetro, na qual foi colocada peneira de nylon e, sobre essa, duas folhas de papel absorvente. Sobre as folhas de papel adicionaram-se as massas de ovos coletadas. Abaixo da peneira foram adicionados 10 mL de água destilada e autoclavada. Em seguida a placa foi acondicionada em câmara de incubação a 28°C.

Após 48 horas os juvenis de segundo estágio (J2) eclodidos foram retirados da incubadora e levados para centrifuga, onde foram lavados por três vezes em rotação de 3000 rpm por 6 minutos com água destilada esterilizada. Os nematóides foram recolhidos de tal forma que a suspensão final contivesse 1000 juvenis de *M. javanica*/mL.

B. Obtenção dos extratos aquosos de folhas de Nim.

As folhas utilizadas na preparação dos extratos foram obtidas de plantas de Nim localizadas no horto da UNIMONTES – campus Janaúba – MG. O preparo dos extratos aquosos de folhas frescas foi obtido a partir da trituração em liquidificador de 10 gramas de folhas recém-coletadas mais 90 mL de água destilada.

As suspensões de ambos os extratos permaneceram em repouso em recipiente totalmente fechado com papel alumínio por um período de 24 horas sob temperatura ambiente. Após este período, realizou-se a filtração da suspensão em filtro Whatman de celulose, obtendo assim o extrato aquoso de nim (tratamento 1) esse extrato foi autoclavado a 120 °C (tratamento 2) e o tratamento 3 constituiu do extrato aquoso submetido a cinco filtrações consecutivas em filtro com membrana Millipore de 0,2 µm acoplado à bomba de vácuo. Os extratos foram utilizados nos ensaios *in vitro*, cujos tratamentos foram: extrato aquoso de nim, extrato aquoso autoclavado e extrato aquoso filtrado em membrana e cinco concentrações: 0,75 (1,5 mL de extrato + 18,5 mL de água destilada); 1,5 (3 mL de extrato + 17,0 mL de água destilada); 2,25 (4,5 mL de extrato + 15,5 mL de água destilada); 3 (6,0 mL de extrato + 14,0 mL de água destilada); 3,75 (7,5 mL de extrato + 12,5 mL de água destilada).

C. Mortalidade de *M. javanica*.

Para a montagem do ensaio *in vitro*, em células de 300 µL de placas de poliestireno “tipo Elisa” foram colocados 20 µL da suspensão contendo de 20 J2 de *M. javanica* e 100 µL da suspensão contendo as diferentes concentrações dos extratos aquosos de folhas frescas de nim (0,75; 1,5; 2,25; 3; 3,75 mL). Após 48 horas, foi realizada a avaliação de mortalidade, conforme metodologia descrita por Chen e Dickson [4], que consistiu em adicionar uma a duas gotas de NaOH 1 N à suspensão de nematoides. A contagem foi feita logo a seguir, considerando-se mortos os nematoides retos



FÓRUM

ENSINO • PESQUISA
EXTENSÃO • GESTÃO

FEPEG

UNIVERSIDADE: SABERES E PRÁTICAS INOVADORAS

Trabalhos científicos • Apresentações artísticas
e culturais • Debates • Minicursos e Palestras



24 a 27
setembro

Campus Universitário Professor Darcy Ribeiro

www.fepeg.unimontes.br

Apoio financeiro: FAPEMIG

e imóveis, e vivos os retorcidos e móveis. O ensaio foi montado em esquema fatorial 3 (tipos de extratos) x5 (concentrações) em delineamento inteiramente ao acaso com seis repetições. Os dados foram convertidos em porcentagem e submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Scott - Knott a 5% e regressão.

Resultados e Discussão

Verificou-se interação significativa entre os extratos de nim testados e as concentrações. Nas concentrações de 0,75 e 1,5 o extrato de nim filtrado em membrana causou 82,31% e 86,31% mortalidade de J2 de *M. javanica*. Nas concentrações de 2,25%, 3,00% e 3,75%, os extratos de Nim autoclavado e Nim filtrado na membrana proporcionaram mortalidade de 100% de J2 diferindo significativamente do extrato de Nim (Tabela 1). Fixando-se os tratamentos, verifica-se que com o aumento das concentrações houve um aumento linear da mortalidade de J2 do nematoide nos tratamentos extrato de Nim autoclavado e no extrato de Nim filtrado em membrana (Fig. 1A, Fig 1B).

O efeito de extratos de nim contra nematoides é devido à presença de várias substâncias químicas, tais como azadirachtin, nimbin, salannin, nimbidin, kaempferol, thionemone, quercetin e outros [5], interferindo no seu desenvolvimento e apresentando efeito nematocida e nematostático. Em testes *in vitro*, o extrato bruto de nim na concentração de 0,25 g mL⁻¹, reduziu em 100,0% a eclosão e causou 100,0% de mortalidade de J2 de *M. incognita* [6].

Os extratos de Nim autoclavado e Nim filtrado na membrana apresentaram maiores porcentagens na mortalidade de J2 diferindo significativamente do extrato de Nim simples. Estes resultados indicam que a autoclavagem e a filtração em membrana promoveram modificações no extrato aquoso, que podem ter alterado a produção e concentração de compostos tóxicos presente no extrato. Bonaldo *et al.*[7] trabalhando com extrato aquoso de *Eucalyptus citriodora* sobre *Colletotrichum lagenarium*, também verificaram que o tratamento térmico influenciou as concentrações de compostos tóxicos presente no extrato.

Conclusões

O extrato aquoso de folhas de nim filtrado em membrana em todas as concentrações causou mortalidade de juvenis de *M. javanica* acima de 85%.

Com o aumento das doses dos extratos aquosos de folhas de Nim autoclavado e filtrado em membrana ocorre aumento na mortalidade.

Na dose de 1,5 mL de extrato aquoso de folhas de Nim filtrado em membrana ocorre mortalidade de juvenis de *M. javanica* de 86,31%.

Agradecimentos

À FAPEMIG pelo financiamento do projeto, pela concessão de bolsa de incentivo a produtividade e ao desenvolvimento tecnológico e bolsa de iniciação científica.

Referências

[1] COIMBRA, J.L.; CAMPOS V.P. Efeito de exsudatos de colônias e de filtrados de culturas de actinomicetos na eclosão, motilidade e mortalidade de juvenis do segundo estágio de *M. javanica*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, p.232-238, 2005.

[2] MOTOYAMA, M. *et al.* Indução de fitoalexinas em soja e em sorgo e efeito fungitóxico de extratos cítricos sobre *Colletotrichum lagenarium* e *Fusarium semitectum*. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v 25 n. 2 p.491-496. 2003. Brasil, 25 de abril de 2008. Disponível em: <<http://www.periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciAgron/article/view/2062/1617>> Acesso em: 09 de out. de 2009.

[3] CARNEIRO, S. M. T. P. G. Ação de Nim sobre fungos fitopogenicos. IN: **O NIM – Azadirachta indica: natureza, usos múltiplos, produção**. IAPAR:Londrina. p. 59 – 64, 2002.

[4] CHEN, S.Y., and D.W. Dickson. 2000. A technique for determining live second-stage juveniles of *Heterodera glycines*. **Journal of Nematology** 32:117-121.

[5] MARTINEZ, S. S. **O Nim – Azadirachta indica: natureza, usos múltiplos, produção**. IAPAR: Londrina, p. 59 – 64. 2002.

[6] ADEGBITE, A. A.; ADESIYAN, S. O. Root extracts of plants to control root-knot nematode on edible soybean. **World Journal of Agricultural Sciences**, v. 1, n. 1, p. 18-21, 2005.



[7] BONALDO, S. M .et al. Fungitoxicidade, Atividade Elicitora de Fitoalexinas e Proteção de Pepino contra Colletotrichum lagenarium, pelo Extrato Aquoso de Eucalyptus citriodora. Fitopatologia Brasileira. 29(2), 2004.

Tabela 1. Porcentagem de mortalidade de *Meloidogyne javanica* submetidos a diferentes concentrações de extratos aquosos de folhas de Nim *Azadiractha indica*, *in vitro*.

Concentrações (mL)	Tratamentos		
	Extrato de Nim	Extrato de nim autoclavado	Extrato de nim filtrado em membrana
0,75	0,00 a	0,00 a	82,31 b
1,5	0,00 a	0,00 a	86,31 b
2,25	17,67 a	74,63 b	90,18 b
3,00	48,73 a	100,00 b	100,00 b
3,75	51,69 a	91,47 b	100,00 b

Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem significativamente entre si pelo teste Tukey a 5%.

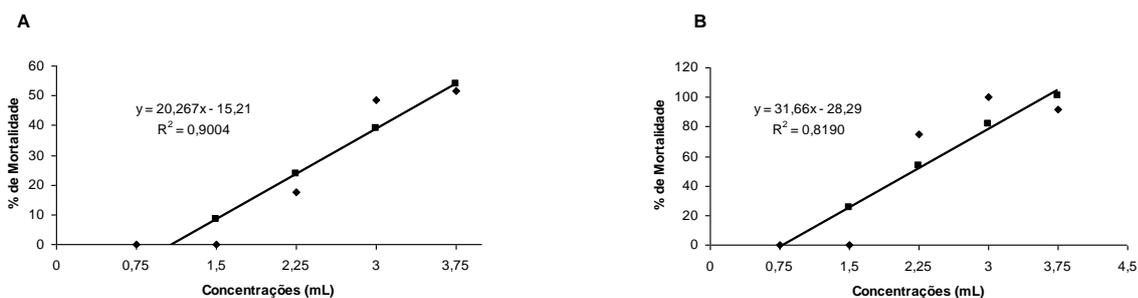


Figura 1. Porcentagem de mortalidade de *Meloidogyne javanica* submetidos a diferentes concentrações de extrato de folhas de nim, *in vitro*. **Fig. 1A:** extratos aquosos de folhas de nim; **Fig 1B:** extrato de nim autoclavado.