

**TOXICIDADE DE ALDICARBE EM
Meloidogyne incognita NAS RELAÇÕES
NEMATOIDE-PLANTA E NO TEOR DO
LIPÍDIO CORPORAL**

ESDRAS HENRIQUE DA SILVA

2009

ESDRAS HENRIQUE DA SILVA

TOXICIDADE DE ALDICARBE EM *Meloidogyne incognita* NAS RELAÇÕES NEMATOIDE-PLANTA E NO TEOR DO LIPÍDIO CORPORAL

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientador

Prof. Dr. Vicente Paulo Campos

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2009

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Silva, Esdras Henrique da.

Toxicidade de aldicarbe em *Meloidogyne incognita* nas relações
nematóide-planta e no teor do lipídio corporal / Esdras Henrique da
Silva. – Lavras : UFLA, 2009.

54 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2009.

Orientador: Vicente Paulo Campos.

Bibliografia.

1. Aldicarbe. 2. *Meloidogyne incognita*. 3. Lipídios neutros. 4.
Soja. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 632.951

ESDRAS HENRIQUE DA SILVA

TOXICIDADE DE ALDICARBE EM *Meloidogyne incognita* NAS RELAÇÕES NEMATÓIDE-PLANTA E NO TEOR DO LIPÍDIO CORPORAL

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 03 de agosto de 2009.

Prof. Dr. Mário Sobral de Abreu UFLA

Prof. Dr. Luiz Antônio Augusto Gomes UFLA

Prof. Vicente Paulo Campos
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pois acredito que ele é o grande responsável pelo meu sucesso profissional, e por me conceder todas as coisas que pedi. Aos meus pais, minha irmã e meu cunhado, que sempre me deram forças para continuar a caminhada.

Às pessoas que me ajudaram a alcançar meus objetivos, pessoas essas que nunca serão esquecidas, como meus vizinhos Cleber e Lúcia, que me auxiliaram sempre que possível nas caronas e nas estadias. Creio que Deus os colocou ali para que assim eu chegasse até aqui, obrigado.

Aos meus primos, primas e tios, em especial aos tios Francisco, Edilton e Hélio e às tias Helena, Creuza e Gracenilda, que sempre me deram força e contribuíram para esta conquista.

Aos meus amigos de republica (Fábio, Andre, Carlos, Glauco e Walmes), pelos conselhos e companherismo ao longo dessa minha caminhada. Aos amigos do laboratório de nematologia (Lilian, Eduardo, Renata, Clara e Alex), pela companhia e amizade, e ao aluno Willian César Terra, que trabalhou e auxiliou na elaboração e na avaliação dos experimentos.

Aos funcionários do laboratório de nematologia, Cleber e Tarley, pela dedicação e conselhos. Ao professor Luiz Antônio Augusto Gomes, pela atenção e por ter aceitado o convite de participar da banca. Ao professor Renê, pelas sugestões e atenção.

À Universidade Federal de Lavras/Departamento de Fitopatologia, pela oportunidade de realizar este trabalho. Em especial, ao professor e orientador Dr. Vicente Paulo Campos que, além de ser um excelente profissional, é uma pessoa de grande caráter e um grande homem, um exemplo a ser seguido. Sua confiança foi essencial para a realização deste trabalho. Ao professor Mário Sobral, que sempre me deu apoio e conselhos, além de ser um grande profissional e amigo. Aos meus amigos de turma do mestrado e minha companheira e namorada, Rose, que sempre me deu força e conselhos. Enfim, a todos aqueles que torceram por mim e de uma forma ou de outra contribuíram para a conclusão deste trabalho, muito obrigado!

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
CAPITULO 1.....	01
1 Introdução geral.....	02
2 Referências bibliográficas.....	04
CAPÍTULO 2: Alteração promovida pelo aldicarbe no ciclo de vida e na reserva lipídica do juvenil do segundo estágio de <i>Meloidogyne incognita</i> em soja.....	06
Resumo.....	07
Abstract.....	08
1 Introdução.....	09
2 Material e métodos.....	11
2.1 Preparo da solução estoque de aldicarbe.....	11
2.2 Obtenção de juvenis do segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne incognita</i>	11
2.3 Efeito do aldicarbe na eclosão.....	12
2.4 Efeito no juvenil do segundo estágio (J2) exposto ao nematicida e/ou desintoxicado pela exposição em água.....	12
2.5 Efeito na reprodução de <i>Meloidogyne incognita</i> pela inoculação de juvenil do segundo estágio (J2) após exposição ao aldicarbe por 24 horas ou irrigado no substrato antes da inoculação.....	16
2.6 Efeito na formação de galhas e na reprodução de <i>Meloidogyne incognita</i> pela aplicação do aldicarbe após a infectividade de J2 saudáveis.....	17
3 Resultados.....	18
4 Discussão.....	25
5 Referências bibliográficas.....	31
CAPÍTULO 3: Efeito da incubação de juvenil do segundo estágio em aldicarbe em solução e no solo na mortalidade, danos e reprodução de <i>Meloidogyne incognita</i> em soja.....	35

Resumo.....	36
Abstract.....	37
1 Introdução.....	38
2 Material e métodos.....	40
2.1 Preparo da solução estoque de aldicarbe.....	40
2.2 Obtenção de juvenis do segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne incognita</i>	40
2.3 Obtenção das plântulas de soja.....	40
2.4 Efeito de tempo de exposição de juvenis do segundo estágio (J2) e de concentrações de aldicarbe na mortalidade do J2.....	41
2.5 Danos e reprodução de <i>Meloidogyne incognita</i> a partir de juvenis do segundo estágio (J2) incubados em solução ou no solo umedecido com aldicarbe.....	41
3 Resultados.....	44
4 Discussão.....	48
5 Referências bibliográficas.....	52

RESUMO

SILVA, Esdras Henrique da. **Toxicidade de aldicarbe em *Meloidogyne incognita* nas relações nematoide-planta e no teor do lipídio corporal**. 2009. 54 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG*.

O juvenil do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne* spp., vivendo em diversos ambientes (ovo, solo e planta), apresenta reações diferenciais no campo, com e sem aplicação de nematicidas. Dessa forma, objetivou-se, com a realização deste trabalho, estudar o efeito do aldicarbe: na incubação do J2 de *Meloidogyne incognita* em água pura, em solo irrigado ou não com solução de aldicarbe, em solução aquosa de aldicarbe; na incubação de ovos em solução de aldicarbe e em água; na aplicação de nematicida após a inoculação do J2 em soja; na energia corporal do J2 e na desintoxicação do juvenil após o retorno a água. A mortalidade de J2 incubado em aldicarbe só foi elevada aos 20 dias de incubação, período em que ocorreu perda da infectividade do J2, tanto em água quanto em aldicarbe. Também a incubação de J2 no solo encharcado com aldicarbe não provocou infectividade em soja. Entretanto, quando o solo infestado pelo J2 foi irrigado com água pura a formação de galhas e a reprodução decresceram com o período de incubação. A eclosão de J2 foi reduzida quando os ovos foram incubados em aldicarbe (5 e 10 µg/mL). O aldicarbe reduziu a mobilidade do J2 em 24 horas de incubação, porém, reversível com o retorno do nematoide para a água, sem a ocorrência de mortalidade. A penetração de J2 incubado por 24 horas em aldicarbe em soja, bem como a reprodução, foi reduzida, se comparada com a incubação em água. A aplicação do nematicida aos 5, 10 e 15 dias após inoculação do J2 reduziu mais o número de galhas quanto menor foi o período entre inoculação e adição do nematicida. Porém, a reprodução foi drasticamente reduzida em qualquer período de aplicação do nematicida. O teor de reserva energética corporal do J2 incubado em aldicarbe (imóvel) e em água (móvel) foi semelhante.

*Comitê de Orientação: Vicente Paulo campos – UFLA (Orientador); Renê Luís de Oliveira Rigitano – UFLA.

ABSTRACT

SILVA, Esdras Henrique da. **Aldicarb toxicity in *Meloidogyne incognita* – plant relationship and in the lipid content of second stage juveniles.** 2009. 54p. Dissertation (Masters in Phytopathology) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG*.

The second stage juveniles (J2s) of *Meloidogyne* spp living in diverse environments (egg, soil and plant) show differential reactions in the field with or without nematicida application. The aim of this work was to study the effect of aldicarb on the: a) storage of *Meloidogyne incognita* J2 in pure water, irrigated soil with aldicarb solution or not and in aldicarb water solution; b) egg storage in aldicarb solution and pure water; c) post embrionary development by applying the nematicide after J2 inoculation in soybean; d) body reserve energy of J2 and e) detoxication of aldicarb storage J2 after returning to water. The mortality of storage J2 in aldicarb was only high at 20 days storage, when the J2 infectivity was lost as in water as in aldicarb. Also, the J2 storage in irrigated soil with aldicarb resulted in soybean infectivity loss. However, when the soil infested with J2 and irrigated with pure water, the galls formation and *M. incognita* reproduction decreased with the storage period. The J2 hatching was reduced when eggs were storage in aldicarb (5 e 10 µg/mL). The aldicarb reduced J2 mortality in 24 h storage but reversible when the nematode returned to water, without mortality. The penetration in soybean roots of 24 h storage J2 in aldicarb, as well as reproduction were reduced compared to control (water storage). The nematicide application at 5, 10 and 15 days after J2 inoculation reduced the number of galls more when the period between inoculation and nematicide application shortened. But the reproduction was drastically reduced in either nematicide application period. The amounts of body reserve energy in aldicarbe stored J2 (immobilized) and in water (mobile) were alike.

*Advising committee: Vicente Paulo Campos – UFLA (Advisor); René Luís de Oliveira Rigitano – UFLA.

CAPÍTULO 1

Toxicidade de aldicarbe em *Meloidogyne incognita* nas relações nematoide-planta e no teor do lipídio corporal.

1 INTRODUÇÃO GERAL

O nematoide de galhas *Meloidogyne incognita* Chitwood, 1949, tem larga gama de hospedeiros entre monocotiledôneas e dicotiledôneas, causando prejuízos a diversas culturas, entre elas, a da soja (*Glycine max*) (Perry & Moens, 2006).

Aldicarbe, inseticida-nematicida sistêmico pertencente ao grupo dos carbamatos, tem sido amplamente empregado na agricultura brasileira e mundial para o controle de diversos insetos e fitonematoides. É comercializado em formulação granulada (Temik 150 G) para incorporação ao solo e absorção pelas raízes. É eficaz na redução populacional de fitonematoides no solo e nos danos à planta até 40 dias após a aplicação no solo (Huang et al., 1983; Lawrence et al., 1990; Hough et al., 1975; Mashela et al., 2008; Hafez & Sundararaj, 2000).

No ciclo de vida de *M. incognita* em soja, o juvenil do segundo estágio (J2) vive em diversos ambientes, como ovo, solo e planta. Com sua própria reserva energética sai do ovo, caminha pelo solo, penetra na ponta da raiz, caminha pelos tecidos internos até induzir a planta a produzir para si um local de alimentação (células gigantes). Nesse caminho, substâncias tóxicas, como os nematicidas, podem afetar sua fisiologia, alterando assim as relações entre *M. incognita* e a soja.

O efeito do aldicarbe em J2 e ovos de *Meloidogyne* spp. tem sido estudado sob diversos aspectos (Yousif & Badra, 1979; Huang et al., 1983; Rocha & Campos, 2003). O aldicarbe também tem sido estudado quanto à sua aplicação no campo e ao efeito na produção de culturas infestadas por *Meloidogyne* spp. (Campos & Silva, 2008; Brodie & Good, 1973; Reddy, 1975). Entretanto, o efeito do aldicarbe no J2 quanto aos aspectos de migração, energia corporal, desintoxicação, etc. necessita de mais pesquisas.

Dessa forma, objetivou-se, com a realização deste trabalho, incubar o J2 em aldicarbe preparado em solução aquosa e irrigado no substrato para estudar o seu efeito na infectividade, na energia corporal (lipídica), na mobilidade, na mortalidade, nos danos e na reprodução de *M. incognita* em soja.

2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRODIE, B.B.; GOOD, J.M. Relative efficacy of selected volatile and non volatile nematicides for control of *Meloidogyne incognita* on tobacco. **Journal of Nematology**, College Park, v. 5, n. 1, p. 14-18, 1973.

CAMPOS, V.C.; SILVA, J.R.C. Management of *Meloidogyne* spp in coffee plantation. In: SOUZA, R.M. (Ed.). **Plant-parasitic nematodes of coffee**. New York: Springer Science, 2008. p. 148-164.

HAFEZ, S.L.; SUNDARARAJ, P. Efficacy and persistence of nematicides against root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* on tomato. **Journal of Nematology**, College Park, v. 10, n. 1, p. 37-40, 2000.

HOUGH, A.; THOMASON, I.J.; FARMER, W.J. Behavior of Aldicarb in soil relative to control of *Heterodera schachtii*. **Journal of Nematology**, College Park, v. 7, n. 3, p. 214-221, 1975.

HUANG, S.P.; RESENDE, I.C.; SOUZA, P.E.; CAMPOS, V.P. Effect of aldicarb, ethoprop and carbofuran on control of coffee root-knot nematodes *Meloidogyne exigua*. **Journal of Nematology**, College Park, v. 15, n. 4, p. 510-514, 1983.

LAWRENCE, G.W.; MCLEAN, K.S.; BASTSON, W.E.; MILLER, D.; BORBON, J.C. Response of *Rotylenchulus reniformis* to nematicide applications on cotton. **Journal of Nematology**, College Park, v. 22, n. 4, p. 707-711, 1990.

MASHELA, P.W.; SHIMELIS, H.A.; MUDAU, F.N. Comparison of the efficacy of ground wild cucumber fruits, aldicarbe and fenamiphos on suppression of *Meloidogyne incognita* in tomato. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 156, n. 5, p. 264-267, 2008.

PERRY, R.N.; MOENS, M. **Plant nematology**. Wallingford, UK: CAB International, 2006. 447 p.

REDDY, D.D.R. Comparisons of method of application and rate of granular nematicides for the control of *Meloidogyne* spp. on tobacco. **Plant Disease Reporte**, Washington, v. 59, n. 1, p. 83-85, 1975.

ROCHA, F.S.; CAMPOS, V.P. Efeito de baixa dose de aldicarbe nos processos de eclosão a penetração de juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne incognita*. **Nematologia Brasileira**, Campinas, v. 27, n. 2, p. 185-192, 2003.

YOUSIF, G.M.; BADRA, T. Effects of selected volatile, organophosphate and carbamate of *Meloidogyne javanica*. **Nematropica**, Bradenton, v. 9, n. 2, p. 181-185, 1979.

CAPÍTULO 2

Alteração promovida pelo aldicarbe no ciclo de vida e na reserva lipídica do juvenil do segundo estágio de *Meloidogyne incognita* em soja.

RESUMO

O aldicarbe foi aplicado em ovos, juvenis do segundo estágio (J2), nas várias fases do desenvolvimento pos-embriônico e em fêmeas de *Meloidogyne incognita* na soja. Ocorreu redução na eclosão, mobilidade e causou mortalidade de J2 causou, também, redução na penetração quando o J2 foi incubado na solução nematicida, mas a redução na reprodução foi menor comparado com a aplicação após a infecção da soja por J2 saudáveis. A aplicação feita mais próxima da inoculação causou maiores reduções de galhas e de ovos/g de raiz com maior efeito na redução de galhas e de ovos/g de raiz com maior efeito na reprodução. Em quanto os J2 incubados por 24 h em aldicarbe 50 µg/mL e inoculados em soja tiveram o número de ovos/g raiz reduzido em 2,5%, a aplicação da mesma concentração após a inoculação resulta em 95% de redução. A irrigação do substrato com solução de aldicarbe impediu a penetração e interrompeu o ciclo. O teor de energia lipídica corporal dos J2 foi avaliado por coloração com “Oil Red O” e fotografias analisadas por programa de análise de imagem. A energia corporal foi semelhante nos J2 incubados em aldicarbe e em água pura a 25 °C até 8 dias. Portanto, o aldicarbe afeta aditivamente, as várias fases do ciclo de vida de *M. incognita* com maior efeito na reprodução e na desorientação do J2 para as raízes de soja, sem preservar a energia corporal do J2 imóvel.

Palavras-chave: Aldicarbe, *Meloidogyne incognita*, lipídios neutros

ABSTRACT

Aldicarb was applied on eggs, second stage juveniles (J2), on various phases of embryonic development and on *Meloidogyne incognita* females in soybean. Reduction occurred on hatching, mobility and caused J2 mortality. The nematicide caused, also, reduction on penetration when J2 was stored in aldicarb solution, but the reduction on reproduction was smaller compared to application after soybean infection by healthy J2. The application made closer to inoculation caused greater galls and egg/g of root reductions with larger effect on reproduction. Whereas the 24 h stored J2 in aldicarb 50 µg/mL and inoculated in soybean had the number of eggs/g of root reduced at 2,5% compared to control, the application of the same aldicarb concentration after inoculation resulted on 95% reduction. The irrigation of the substrate with aldicarb solution impeded J2 penetration and interrupted the life cycle. The amount of lipid J2 body energy was assessed by staining with "Oil Red O" and photos analysed by image program. The body energy was or like on J2 stored in aldicarb and in pure water at 25 °C up to eight days. Therefore, the aldicarb affect, accumulatively, over various phases of *M. incognita* life cycle with greater effect on reproduction and J2 disorientation towards soybean roots, without preserving body energy of aldicarb stored J2.

Keywords: Aldicarb, *Meloidogyne incognita*, neutral lipids

1 INTRODUÇÃO

O nematoide de galhas *Meloidogyne incognita* tem larga gama de hospedeiros, causando prejuízos a diversas culturas (Perry & Moens, 2006) entre elas a soja (*Glicine max*).

Aldicarbe, inseticida-nematicida sistêmico pertencente ao grupo dos carbamatos, tem sido amplamente empregado na agricultura brasileira e mundial no controle de diversos insetos e fitonematoides. É comercializado em formulação granulada (Temik 150 G) para incorporação ao solo e absorção pelas raízes. É eficaz na redução populacional de fitonematoides no solo e nos danos à planta até 40 dias após a aplicação (Huang et al., 1983; Lawrence et al., 1990; Hough et al., 1975; Mashela et al., 2008; Hafez & Sundararaj, 2000).

Como produto sistêmico e de alta solubilidade em água, esse nematicida afeta o parasitismo do juvenil de segundo estágio (J2) dentro do hospedeiro, bem como fora dele, na solução do solo. Tem sido empregado em ensaios *in vitro* como tratamento controle (letal) de prospecção de moléculas tóxicas a juvenil de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne* spp. Sabe-se, entretanto, que esse nematicida não mata o J2 e que a mobilidade é reversível quando retornado em água (Nelmes, 1970). Contudo, a porcentagem dos J2 que reverterem à mobilidade, ainda precisa de mais pesquisas, bem como a sensibilidade diferencial entre espécies de fitonematoides (Hough & Thomason, 1975).

Nelmes (1970) verificou imobilização dos J2 de *Globodera rostochiensis* tratados por 24 horas em solução de aldicarbe 10 µg/mL. Entretanto, 67% dos J2 tratados retornaram à mobilidade após a retirada do produto e exposição à água. Esse efeito na imobilização, mesmo que não letal, pode afetar a migração do nematoide em direção à raiz. Maior ênfase em pesquisas precisa ser direcionada, também, para a natureza da sua ação ovicida e a sensibilidade diferencial dos

ovos entre espécies de fitonematoides.

Hough & Thomason (1975) encontraram estímulo à eclosão de *M. javanica* em baixas dosagens e completa supressão em alta concentração. Também ocorreu inibição total da eclosão de *Heterodera schachtii* em dosagem menor do que aquela verificada para *M. javanica*, demonstrando sensibilidade diferencial entre espécies.

Ainda não se têm informações sobre a preservação da energia corporal do J2 imóvel em solução de aldicarbe, na qual o ciclo do nematoide é interrompido temporariamente. Além disso, há necessidade de pesquisas sobre os efeitos deletérios dessa interrupção na infectividade do J2. Portanto, objetivou-se, com a realização deste trabalho: a) estudar o efeito deletério do aldicarbe na eclosão, na mobilidade, na infectividade de J2 e na reprodução de *M. incognita*; b) avaliar mobilidade do J2 após o retorno à água e c) analisar comparativamente a energia corporal do J2 imóvel em solução de aldicarbe e em água.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Preparo da solução estoque de aldicarbe

Solução estoque de 500 µg/mL de aldicarbe foi preparada pesando-se 6,66 g da formulação comercial Temik 150 G, colocado em erlenmayer com 1.000 cc de água destilada e homogeneizada por 30 minutos. A seguir, foi filtrada em algodão colocado no fundo do funil e mantida em geladeira a 8°C. Alíquotas foram obtidas para se avaliar o teor de aldicarbe em solução por meio de cromatografia a gás-líquido no laboratório de toxicologia de inseticidas da Universidade Federal de Lavras. Diluições da solução estoque foram feitas para se obter as concentrações empregadas nos ensaios.

2.2 Obtenção de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita*

Raízes de tomateiros (*L. esculentum* cv Kada) cultivados em casa de vegetação e infestadas com *M. incognita* foram lavadas, cuidadosamente, e cortadas em pedaços de 1 cm. A seguir, foram trituradas em liquidificador, por 20 segundos, em solução de hipoclorito de sódio a 0,5%, seguindo-se a técnica de Hussey & Barker (1973). Em seguida, foram colocados, aproximadamente, 3 g de caulim por tubo, realizando-se a limpeza dos ovos. Os ovos retidos na peneira de 0,025 mm foram recolhidos em béquer de 200 mL, utilizando-se pisseta contendo água. A suspensão de ovos foi colocada em câmara de eclosão e mantida à temperatura de 25°C. Os J2 recolhidos no primeiro e no segundo dia de incubação foram descartados, utilizando-se os eclodidos a partir do terceiro dia.

2.3 Efeito do aldicarbe na eclosão

Câmaras de eclosão foram preparadas empregando-se placas de Petri (4,5cm) forradas com peneiras de tecido poliéster (0,025 a 0,030mm de abertura) fixado em anéis de PVC (40mm x 10mm), sobre os quais colocaram-se 1.000 ovos de *M. incognita* por peneira que foram incubados em temperatura de 25 °C. Essas peneiras com ovos foram imersas em solução de aldicarbe nas concentrações de 1, 5 ou 10 µg/mL. Como controle utilizou-se água destilada. Os J2 eclodidos passaram pelos poros da peneira e ficaram na placa de Petri de onde eram recolhidos para contagem. A contagem dos J2 eclodidos iniciou-se dois dias após a montagem do ensaio e prosseguiu nos 14 dias subseqüentes de incubação, com intervalos de 48 horas, com o uso de microscópio de objetiva investida. A solução de aldicarbe ou água era substituída por nova solução (4 mL), após cada contagem.

Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado, com 4 repetições. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e teste Tukey, a 5% de probabilidade, para a comparação das médias.

2.4 Efeito no juvenil do segundo estágio (J2) exposto ao nematicida e/ou desintoxicado pela exposição em água.

a) Mobilidade e mortalidade após exposição a diversas concentrações de aldicarbe em um único período de tempo: duzentos e cinquenta µL de soluções de aldicarbe nas concentrações 5, 10, 50, 100 e 500 µg/mL foram colocados por célula de placa Elisa previamente esterilizada com álcool 95%. Água destilada foi utilizada como controle. J2 de *M. incognita* foram quantificados em microscópio de objetiva invertida e calibrada a suspensão para 50 J2 por 25 µL. Em cada célula foram pipetados 25 µL dessa suspensão. Após 24 horas, avaliou-se o número de J2 móveis e mortos, tendo a avaliação de mortalidade sido realizada conforme metodologia descrita por Chen & Dickson

(2000), em que espécimes que permaneceram imóveis após a adição de uma gota de NaOH 1 N à suspensão de nematoides foram classificados como mortos.

b) Mobilidade de J2 expostos ao aldicarbe e desintoxicados pela incubação em água: os J2 foram incubados em aldicarbe por 24 horas e, depois, em água pura por 24 horas. Para isso, 5 mL das concentrações de 0, 5, 10, 50, 100 e 500 µg/mL de aldicarbe foram colocados em frascos de vidro de 15 mL. Como controle utilizou-se água destilada. Em cada frasco, foram pipetados 30 µL de suspensão contendo 100 J2. Os frascos foram, então, deixados a 25°C em incubadora (BOD) por 24 horas. A seguir, a suspensão de J2 foi vertida em peneira de 11 µm, para eliminar toda a solução de aldicarbe. Os J2 retidos na peneira foram lavados por duas vezes em água de torneira e removidos com jatos de água através de pisseta, para os mesmos frascos de vidro utilizados na incubação. Os J2 foram mantidos em 5 mL de água e incubados a 25°C, por 24 horas. Após esse tempo, os J2 de cada frasco foram transferidos para placa Elisa, onde foram feitas as avaliações do número de J2 móveis e imóveis.

Nesses ensaios empregou-se o delineamento inteiramente casualizado com seis concentrações de aldicarbe e cinco repetições, tendo a concentração zero (água destilada) sido utilizada como controle.

c) Mobilidade, mortalidade e percentual de lipídios neutros em J2 expostos a diversas concentrações de aldicarbe em diferentes períodos de tempo: suspensões de J2 de *M. incognita* foram incubadas a 25°C, por 4, 8 e 12 dias, em soluções de aldicarbe, nas concentrações de 0, 5 e 50 µg/mL. Em frascos de vidro com capacidade de 15 mL foram colocados 5 mL das soluções e pipetados 100 µL de uma suspensão na qual havia 500 J2 recentemente eclodidos. Após os tempos de incubação, a suspensão de J2 foi vertida em peneira de 11 µm, para eliminar toda a solução de aldicarbe. Os J2 retidos na peneira foram lavados por duas vezes em água de torneira e removidos, com jatos de água através de pisseta, para os mesmos frascos de vidro utilizados na incubação. Na avaliação

da mobilidade e da mortalidade após a lavagem e a retirada do aldicarbe, os J2 foram mantidos em 5 mL de água e incubados a 25°C por 24 horas. Após esse tempo, os J2 de cada frasco foram transferidos para placa Elisa, nas quais foram feitas as avaliações do número de J2 móveis, imóveis e mortos. A avaliação da mortalidade foi realizada conforme metodologia descrita por Chen & Dickson (2000).

Na valiação de lipídios neutros utilizou-se a técnica Christophers (1997) e Storey (1983), adaptada por Campos (2003), empregando-se o corante Oil Red O. Para isso, após a lavagem e a retirada do aldicarbe, os J2 foram concentrados em 0,5 mL de água. Sobre essa suspensão foram adicionados 3 mL da solução corante Oil Red O. A suspensão foi aquecida em banho-maria, a 60°C, por 20 minutos. Após o resfriamento em temperatura ambiente, por 12 horas, os J2, já com teor de lipídio neutro colorido de vermelho em seu corpo, foram concentrados em 0,5 mL da solução corante por meio de centrifugação a 2.000 rpm, por 3 minutos. A seguir, foram adicionados 3 mL de solução de água destilada + glicerina pura (1:1) e armazenada à temperatura ambiente. Em seguida, foram montados em lâminas os J2 de cada tratamento e fotografados 10 J2 de cada repetição de cada período de armazenamento. A partir das fotografias, foi utilizado o programa *Quan-v102p* para estimar a área de coloração vermelha que corresponde à de lipídios e à área total do corpo do J2. Então, calculou-se o percentual de lipídios neutros em relação à área total do corpo dos J2 de *M. incognita*.

Para a montagem desses ensaios, foi empregado o delineamento inteiramente ao acaso, com fatorial 3 x 4, três concentrações, (a concentração zero foi utilizada como testemunha) quatro tempos de incubação, em 4 repetições. Na avaliação do percentual de lipídios neutros J2 recém-eclodidos, foram utilizados como testemunha.

d) Penetração de juvenis do segundo estágio (J2) em soja após incubação ou

irrigação do substrato com aldicarbe: sementes de soja (*Glycine max* L. cv. EMGOPA 313) foram distribuídas em bandejas plásticas previamente desinfestadas com álcool 95%, as quais continham areia umedecida com água. Em seguida, foram colocadas em câmara climatizada com 14 horas de luz e 10 horas de escuro, à temperatura de $27\pm 2^{\circ}\text{C}$, para permitir a germinação. Após 72 horas, as sementes germinadas com radícula de 2 cm de comprimento foram selecionadas para a instalação dos ensaios.

Oitenta J2 foram incubados, a 25°C , por 24 horas, nas soluções de 0, 5, 10, 50, 100 ou 500 $\mu\text{g/mL}$ de aldicarbe. Após 24 horas, os J2 foram lavados por duas vezes em água de torneira e inoculados em plântulas de soja. Para isso, sementes germinadas de soja foram transplantadas para bandeja de 144 células contendo substrato solo e areia (2:1), autoclavado por 2 horas, a 120°C e, após 7 dias, as plantas foram inoculadas. Na inoculação, os 80 J2 foram dispersos em 2 mL de água e distribuídos em 4 furos de ± 3 cm de profundidade ao redor das mudas. Em outro ensaio, após 7 dias, as plântulas foram irrigadas com 10 mL de solução de aldicarbe (5, 10, 50, 100 ou 500 $\mu\text{g/mL}$), seguindo-se a inoculação de 80 J2 por planta.

Cinco dias após a inoculação, avaliou-se a penetração de J2 nas raízes de soja. Para isso, a parte aérea das plantas foi eliminada e o sistema radicular, com substrato, foi colocado em água parada, num balde de 10 litros. As raízes foram separadas do substrato, lavadas e submetidas ao processo de clareamento e coloração dos nematoides no interior da raiz com solução contendo corante artificial, conforme técnica de Rocha et al. (2005). A seguir, as raízes foram lavadas para retirar o excesso do corante, colocadas em lâmina de vidro com glicerina pura sobreposta com outra lâmina de mesmo tamanho e formato. Em microscópio de objetivas invertidas, foi quantificado o número de J2 que penetrou no sistema radicular. Nesse ensaio, empregou-se o delineamento inteiramente casualizado com 6 concentrações de aldicarbe e 5 repetições, tendo

a concentração zero (água destilada) sido utilizada como controle.

2.5 Efeito na reprodução de *Meloidogyne. incognita* pela inoculação de juvenil do segundo estágio (J2) após exposição ao aldicarbe por 24 horas ou irrigado no substrato antes da inoculação.

Sementes de soja germinadas foram transplantadas para copos plásticos de 300 mL contendo 250g de substrato de solo e areia (2:1) e autoclavados por 2 horas, a 120°C. Após 7 dias do transplante, ocorreu a inoculação de 400 J2 incubados em solução (0, 5, 10, 50, 100 ou 500 µg/mL) de aldicarbe, por 24 horas e lavados por 2 vezes em água. Para realizar a inoculação, os J2 foram dispersos em 4 mL de água e distribuídos em 4 furos de 3 cm de profundidade, feitos ao redor das mudas. As mudas foram mantidas por 28 dias em câmara climatizada com 14 horas de luz e 10 horas de escuro, à temperatura de 27±2°C. A umidade dos copos foi mantida a 60% da capacidade de campo, durante os cinco primeiros dias após a inoculação.

Em outro ensaio o aldicarbe foi irrigado no substrato antes da inoculação. As plântulas de soja crescidas por 14 dias em bandeja de 144 células foram transplantadas para copos contendo substrato. Após o transplante, as plantas de soja foram irrigadas com soluções (0, 5, 10, 50, 100 ou 500 µg/mL) de aldicarbe até atingir 60% de campo, seguindo-se inoculação de 400 J2 recém-eclodidos por plântula de soja.

Vinte e oito dias após a inoculação, foram avaliados o número de massas de ovos e de ovos de *M. incognita* por grama de raiz nos dois ensaios. Para isto, eliminou-se a parte aérea e no sistema radicular as massas de ovos coloridas de vermelho (Rocha et al., 2005) foram contadas. A seguir, avaliou-se o peso da matéria fresca das raízes. Em microscópio de objetiva invertida foi quantificado o número de ovos de *M. incognita* por sistema radicular. Em seguida, calculou-se o número de massas de ovos e de ovos/g de raiz.

Nesses ensaios, empregou-se o delineamento inteiramente casualizado com 6 concentrações de aldicarbe e 5 repetições, tendo a concentração zero (água destilada) sido utilizada como controle.

2.6 Efeito na formação de galhas e na reprodução de *Meloidogyne incognita* pela aplicação do aldicarbe após a infectividade de J2 saudáveis.

Sementes de soja germinadas, foram transplantadas para copos de 300 mL contendo 250g de substrato de solo e areia (2:1) e mantidas em câmara climatizada, com 14 horas de luz e 10 horas de escuro, à temperatura de $27\pm 2^{\circ}\text{C}$. Cerca de 400 J2 de *M. incognita* recentemente eclodidos em câmara de eclosão foram inoculados 7 dias após o transplântio das sementes. Para isso, os J2 foram suspensos em 4 mL de água e distribuídos em 4 furos de ± 3 cm de profundidade ao redor das mudas. Aos 0, 5, 10 e 15 dias após a inoculação, 20 mL de soluções de aldicarbe, nas concentrações de 5 e 50 $\mu\text{g/mL}$, foram colocados em cada planta de soja.

Para a montagem desses ensaios, foi empregado o delineamento inteiramente ao acaso, com fatorial 2×4 , duas concentrações e quatro tempos de aplicação do aldicarbe, em 4 repetições. Como controle positivo, utilizaram-se plântulas sem aplicação de aldicarbe. Aos 28 dias após a inoculação, avaliaram-se a infectividade e a reprodução.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e ao teste Tukey, a 5% de probabilidade, para a comparação das médias. As variáveis significativas pelo teste F foram submetidas à análise de regressão para ajuste do melhor modelo capaz de descrever o fenômeno biológico em questão. As análises foram realizadas pelo programa R (R Development Core Team, 2009) Todos os ensaios realizados neste trabalho foram repetidos duas vezes, comprovando-se os resultados obtidos.

3 RESULTADOS

A eclosão de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita* foi reduzida em 55% e 89%, respectivamente quando os ovos foram expostos a 5 e 10 $\mu\text{g/mL}$ de aldicarbe comparados com a testemunha. Contudo, a 1 $\mu\text{g/mL}$, a eclosão foi semelhante à incubação em água (Figura 1).

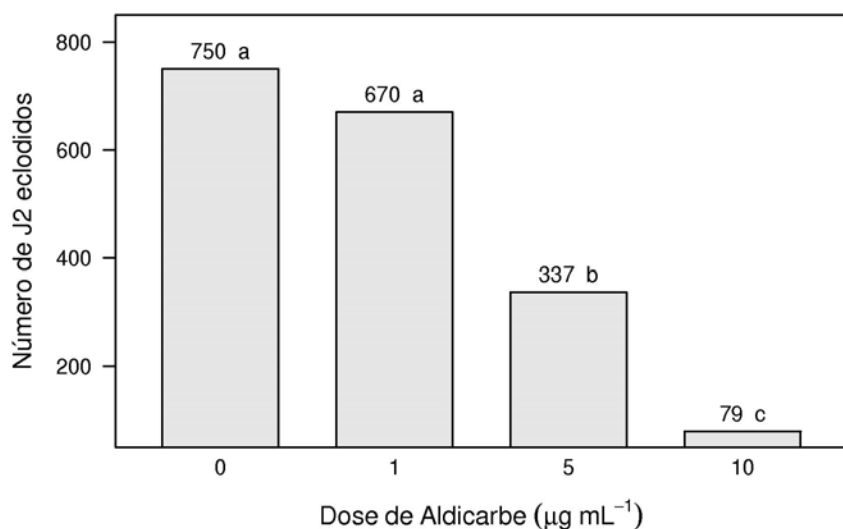


FIGURA 1 Número de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita* eclodidos após incubação por 14 dias em soluções de aldicarbe em várias concentrações. Barras seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Os J2 sofreram efeitos do aldicarbe de diferentes formas. A mobilidade foi significativamente reduzida durante a exposição ao aldicarbe por 24 horas, reduziram a mobilidade significativamente em qualquer concentração, comparados com o controle, chegando à imobilidade total da população estudada a partir de 50 $\mu\text{g/mL}$. A desintoxicação pela incubação em água pura

por 24 horas possibilitou retorno à mobilidade de elevado (90%) número de J2 nas concentrações de 5 e 10 µg/mL, regular (62%) em 50 µg/mL e baixo (14% e 3%, respectivamente) em 100 e 500 µg/mL (Figura 2). Porém, a mortalidade não ocorreu entre os J2 imóveis em nenhuma concentração testada, mesmo em 500 µg/mL.

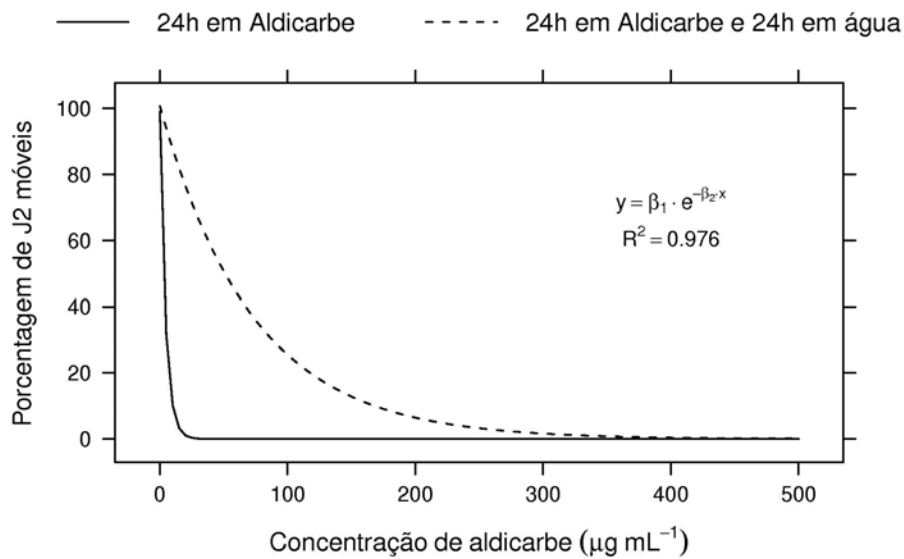


FIGURA 2 Porcentagem de juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita* móveis após 24 horas de exposição dos J2 a diferentes concentrações de Aldicarbe ou após incubação por 24 horas em Aldicarbe e 24 horas em água.

Portanto, em um único período de incubação (24 horas) à imobilização se acentuou bastante com o aumento da concentração de Aldicarbe a partir de 50 µg/mL e o retorno a mobilidade foi maior nas menores concentrações. Porém, a mortalidade não ocorreu entre os J2 imóveis em nenhuma concentração testada, mesmo em 500 µg/mL.

Alterando, então, o tempo de incubação tendo como concentração limite 50 µg/mL, a queda da mobilidade variou com o tempo de incubação e o número de J2 imóveis foi sempre maior na concentração de 50 µg/mL. Aumentando o tempo de exposição começa a ocorrer mortalidade. Aos 4 e 8 dias de incubação a mortalidade foi baixa. Entretanto, aos 12 dias, a mortalidade de J2 chegou a 14% e a 30% nas concentrações de 5 e 50 µg/mL, respectivamente (Figura 3).

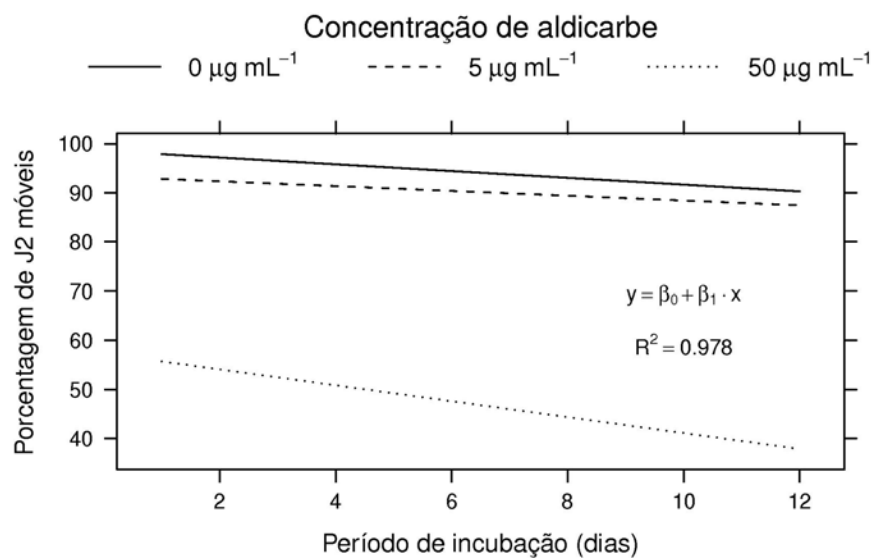


FIGURA 3 Porcentagem total de juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita* móveis, após incubação em solução de Aldicarbe por diversos períodos e retorno à água pura por 24 horas.

A exposição do J2 ao Aldicarbe afetou a penetração em soja reduzindo-a até a concentração de 150 µg/mL, mantendo-se baixa até 500 µg/mL (Figura 4). Entretanto, quando o Aldicarbe foi irrigado no solo antes da inoculação, nenhum J2 foi observado nas raízes.

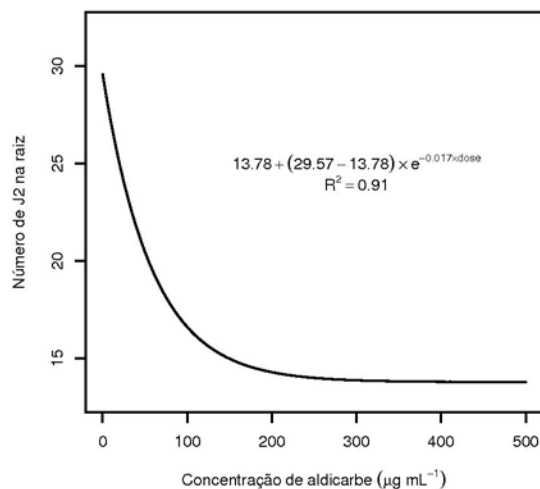


FIGURA 4 Número de juvenis do segundo estágio (J2) encontrados dentro das raízes de soja a partir da inoculação de J2 incubados em diversas concentrações de aldicarbe.

O teor de lipídio neutro corporal do J2 incubado em aldicarbe (5 e 50 µg/mL) foi semelhante ao incubado em água e decrescente até o 8º dia (Figura 5), apesar de elevada imobilidade em 50 µg/mL (Figura 3). No 8º dia de incubação o teor de lipídio alcançou 40% do total do corpo do J2 o que o torna infectivo. Entretanto continuou caindo até o 12º dia com decréscimos maiores nos J2 incubados em água contribuindo assim, o aldicarbe, para preservar o lipídio corporal, porém em baixo nível sem relevância para manter a infectividade do J2.

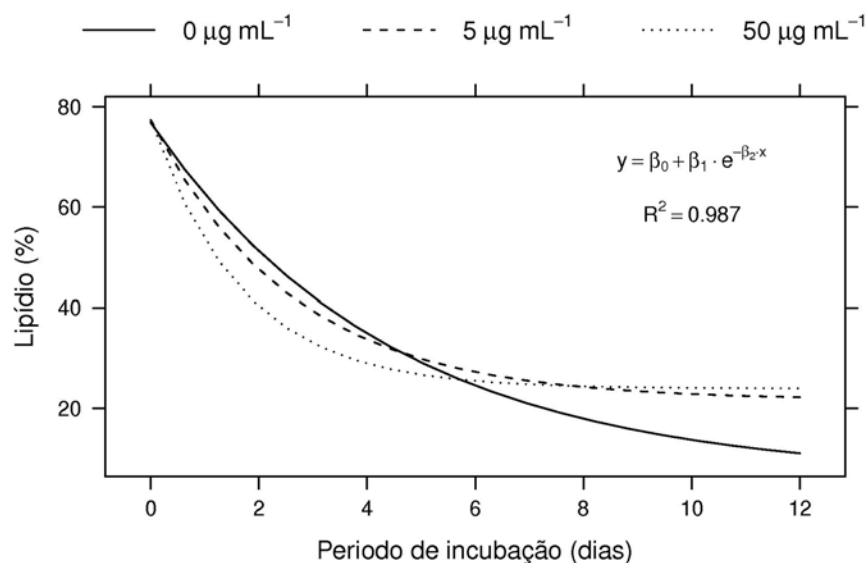


FIGURA 5 Porcentagem de lipídio neutro em juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne incognita*, após incubação em solução de aldicarbe (5 e 50 µg/mL) e em água pura por diversos períodos.

O efeito do aldicarbe na reprodução de *M. incognita* oriundo da inoculação com J2 incubado no nematicida (Figura 6 e 7) e de aplicação do aldicarbe após a infecção pelo J2 saudável caracteriza a eficácia do aldicarbe em etapas distintas do ciclo de vida desse patógeno em soja com mais redução na reprodução quando o nematicida foi aplicado após a inoculação.

O efeito na reprodução de *M. incognita* (Massa de ovos e ovos por grama de raiz) em soja pela incubação do J2 em aldicarbe por 24 horas foi decrescente com o aumento da concentração do nematicida (Figura 4), chegando a quedas de 23% e 25% em massa de ovos e ovos por grama de raiz, respectivamente, quando os J2 foram incubados em aldicarbe 150 µg/mL.

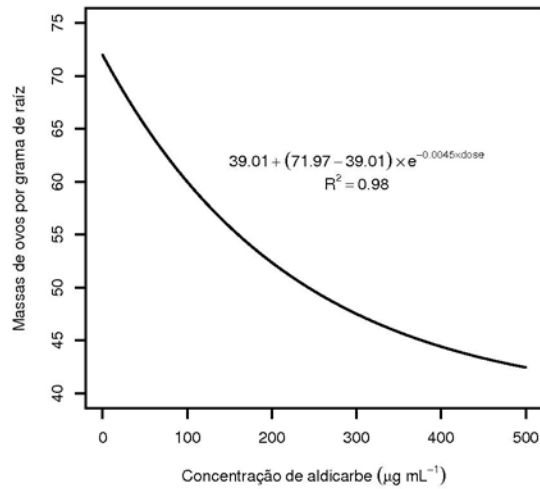


FIGURA 6 Número de massas de ovos de *Meloidogyne incognita* por grama de raiz de soja, a partir da incubação de juvenis do segundo estágio, por 24 horas, em diversas concentrações de aldicarbe e inoculação em soja.

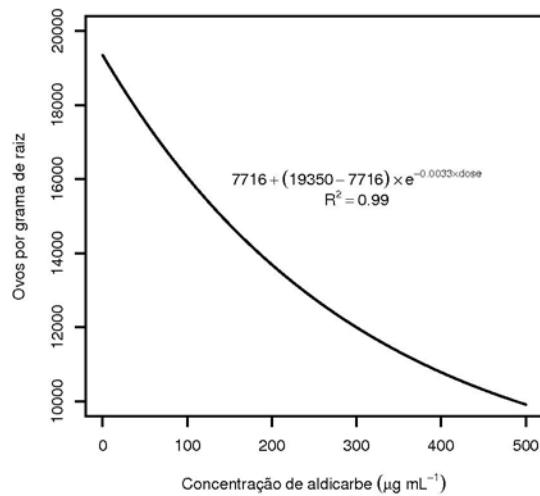


FIGURA 7 Número de ovos de *Meloidogyne incognita* por grama de raiz a partir da incubação de juvenis do segundo estágio (J2) por 24 horas, em diversas concentrações de aldicarbe e inoculação em soja.

O efeito do aldicarbe (5 e 50 $\mu\text{g/mL}$) foi maior na reprodução de *M. incognita* do que na formação de galhas em soja já infectada por J2 saudáveis (figura 8 e 9). A redução no número de ovos variou entre os tempos de aplicação do nematicida (5, 10 e 15) após a inoculação dos J2 saudáveis de 63 a 93% na concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$ é de 86 a 95% na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$, com maior redução quando o nematicida foi colocado aos 5 dias após a inoculação comparados com o controle (sem aldicarbe) (Figura 9). A aplicação do nematicida no momento da inoculação não propiciou a produção de ovos e de apenas uma galha (Figura 8 e 9). Redução significativa de galhas só ocorreu quando o aldicarbe 5 $\mu\text{g/mL}$ foi aplicado aos 5 dias, e aos 5 e 10 dias quando se aplicou a concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 8).

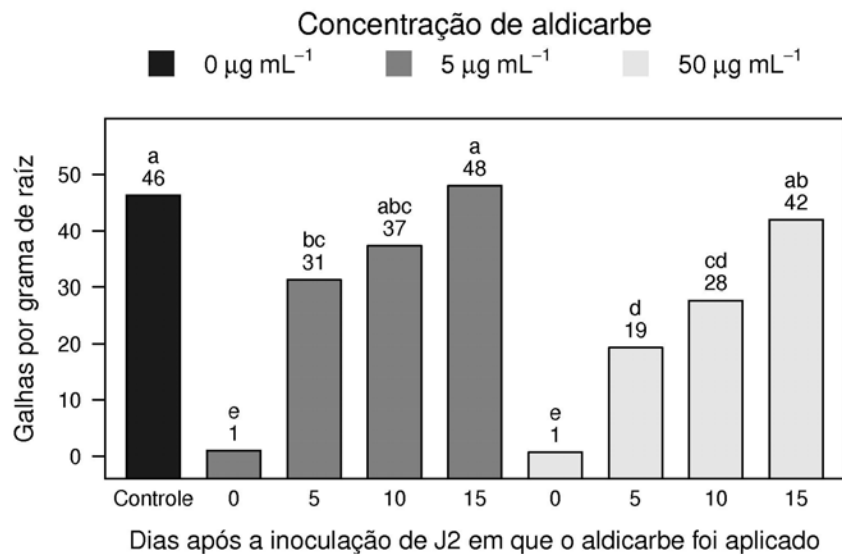


FIGURA 8 Número médio de galhas de *Meloidogyne incognita* por grama de raiz, a partir da inoculação de juvenis do segundo estágio (J2), seguida da aplicação de aldicarbe em duas concentrações (5 e 50 $\mu\text{g/mL}$), em diferentes períodos após a inoculação. Controle = sem aplicação de aldicarbe. Barras seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

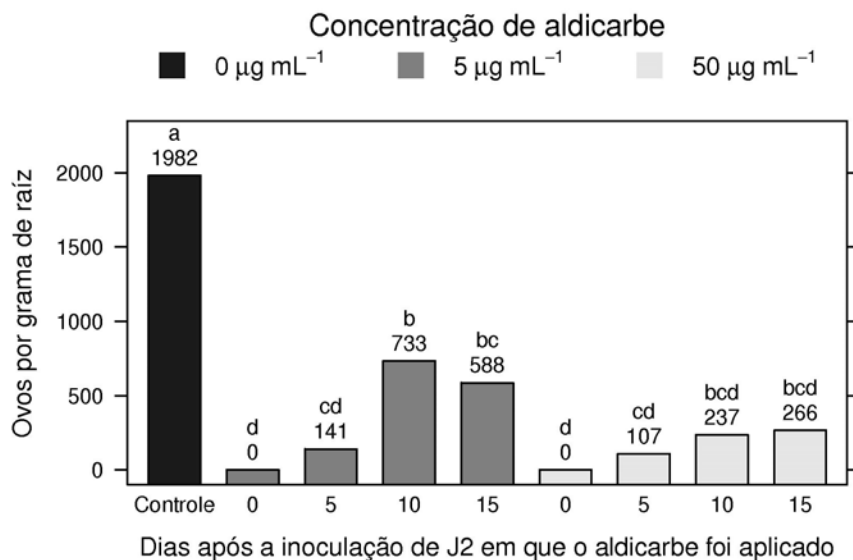


FIGURA 9 Número médio de ovos de *Meloidogyne incognita* por grama de raiz, a partir da inoculação de juvenis do segundo estágio (J2), seguida da aplicação de aldicarbe em duas concentrações (5 e 50 µg/mL), em diferentes períodos após a inoculação. Controle = sem aplicação de aldicarbe. Barras seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

4 DISCUSSÃO

A redução na eclosão de J2 de *M. incognita* observada neste trabalho envolve a interrupção ou o retardamento da evolução das diferentes fases do desenvolvimento embrionário e nos eventos que precedem a eclosão (alteração da casca e ativação do juvenil). A penetração do aldicarbe nos estágios iniciais do desenvolvimento embrionário dentro do ovo pode ser impedida pela seletividade das duas ou três camadas lipídicas localizadas abaixo da quitínica (casca), as quais formam a principal barreira à permeabilidade da casca (Jones et al. 1998; Perry et al., 1982). Estudos, contudo, são necessários para

correlacionar a permeabilidade da casca do ovo nesses estágios iniciais do desenvolvimento embrionário e a penetração de substâncias tóxicas, entre elas, os nematocidas.

Entretanto, avanços têm sido alcançados no conhecimento dos eventos que precedem a saída do J2 do ovo. No início do processo de eclosão ocorre alteração da permeabilidade da casca e da camada lipídica, mediada por enzimas, resultando na entrada de água e na subsequente reidratação do juvenil, proporcional ao início do seu movimento (Jones et al. 1998; Wright & Perry, 2006; Perry, 2002). Acredita-se, então, que, nessa reidratação, penetra o aldicarbe no corpo do juvenil dentro do ovo, imobilizando-o e impedindo, por exemplo, a formação da linha de clivagem da casca (Doncaster & Shepherd, 1967), bem como inibindo a enzima acetilcolinesterase (Opperman & Chang, 1991), impossibilitando a orientação do estilete do juvenil para perfurar a casca (Nelmes, 1970).

Entretanto, como ocorreram, neste trabalho, diferenças significativas entre concentrações de aldicarbe na redução da eclosão (Figura 1), em concentrações mais altas, o aldicarbe, possivelmente, afetar o desenvolvimento embrionário nos seus estágios iniciais, alterando assim a permeabilidade das membranas em adição ao efeito nos eventos da eclosão. A eclosão de *Tylenchulus semipenetrans* é inibida apenas em concentrações maiores que 10 µg/mL, tendo essa inibição sido atribuída ao atraso do desenvolvimento embrionário (Huang & Van Gundy, 1976). Por outro lado, a eclosão de *Heterodera schachtii* é totalmente inibida em concentrações maiores que 4,8 µg/mL; para *M. javanica*, essa concentração inibiu parcialmente a eclosão (Hough & Thomason, 1975), a redução na eclosão de *M. exigua* foi de 34% e de 44% nas concentrações de 0,1 e 1 µg/mL de aldicarbe, respectivamente (Huang et al., 1983), enquanto para *M. incognita*, no experimento aqui descrito, não ocorreu efeito nessa concentração (Figura 1). Entretanto, eclosão de J2 de *M.*

arenaria foi observada em concentrações de 10 e 20 µg/mL (Berge & Cuany, 1972). Sendo assim, o efeito do aldicarbe na eclosão é diferente, mesmo para as espécies.

Tem sido relatada reversão da inibição à eclosão de *Meloidogyne exigua* após retorno dos ovos à água, porém, parcial quando os ovos são expostos a concentrações maiores que 1 µg/mL, demonstrando morte de células, embriões ou J2 dentro do ovo (Huang et al., 1983). A eclosão de *H. schachtii* foi inibida em concentrações de 1 e 5 µg/mL de aldicarbe, porém, quando os cistos foram lavados e expostos em água por 14 dias, a eclosão foi estatisticamente igual ao controle (cistos expostos apenas em água) (Steele & Hodges, 1975).

A imobilização sem morte do J2 na solução de aldicarbe observado neste trabalho envolve, certamente, a neurotransmissão de estímulos. Já se constataram vários neurotransmissores em nematoides, como acetilcolina, gama aminobutírico (GABA), dopamina e vários neuropeptídeos (Stewart et al., 2001; Stewart et al., 1994; Schuske et al., 2004; Wright & Perry, 2006). Entretanto, conhece-se apenas que o aldicarbe inibe a enzima acetilcolinesterase controladora do neurotransmissor acetilcolina (Opperman & Chang, 1991). Em coluna de areia sob exposição contínua a aldicarbe (1 e 5 µg/mL), a migração de J2 de *M. javanica* e *H. schachtii* é inibida (Hough & Thomason, 1975).

O retorno à mobilidade dos J2 em água pura, após exposição ao aldicarbe neste trabalho, demonstra reversibilidade da transmissão de estímulo pelos neurônios. Contudo, essa reversibilidade é dependente da concentração do aldicarbe, reduzindo a mobilidade significativamente a partir de 50 µg/mL (Figura 2) e do tempo de incubação que reduz significativamente a mobilidade do J2 aos 12 dias de exposição ao aldicarbe (50 µg/mL) (Figura 3). Como, neste trabalho, os J2 foram incubados em água pura por apenas 24 horas após a exposição ao aldicarbe, o prolongamento desse período pode aumentar a mobilidade do J2. Também J2 de *Globodera rostochiensis* reduz a mobilidade

em 24 horas de exposição ao aldicarbe 10 µg/mL e apenas 67% deles retornam à mobilidade em água (Nelmes, 1970).

Embora nematoides vivos sejam seletivos quanto à permeação a algumas substâncias nos seus tecidos, a cutícula não é uma barreira a hidrocarbonos halogenados. Entretanto, dentro do nematoide, a substância pode ser estocada em tecido sem função vital para o organismo. O nematoide pode desintoxicar-se, excretar a substância tóxica ou evitar toxicidade (Van Gundy & Mckerry, 1977).

O mesmo teor de lipídio corporal nos J2 de *M. incognita* incubados em aldicarbe e em água pura, a 25°C, por 8 dias, demonstra que, mesmo imóvel, o gasto energético está ocorrendo, devido, talvez, à transmissão de estímulos pelos neurônios de modo descontrolado, pois a enzima reguladora do processo (acetilcolinesterase) é inativada pelo aldicarbe (Opperman & Chang, 1991), não havendo economia de energia corporal pela inatividade. Maior gasto energético ocorre em J1 de *Heterorhabditis amazonensis* incubados por 5 dias em herbicidas, comparadoz com os J1 incubados em água pura (Andaló et al., 2009).

A drástica redução na penetração, em soja, de J2 de *M. incognita* incubado em aldicarbe e a penetração nula quando o nematicida foi irrigado no solo antes da inoculação indicam que o aldicarbe afetou a orientação do juvenil em relação à ponta da raiz ou o imobilizou, temporariamente. Contudo, não foi provado se a exposição em água pelo mesmo período restabeleceria o movimento e a orientação. Exposição de machos de *H. schachtii* a aldicarbe (0,01 µg/mL em coluna de areia), por 72 horas, impossibilitaram-nos que eles encontrassem as fêmeas (Hough & Thomason, 1975), indicando obstrução ou ruptura do sistema nervoso sensorial do macho. Efeito semelhante pode ter ocorrido com sistema sensorial de *M. incógnita*, impedindo o reconhecimento da substância atrativa pela raiz da soja. Gourd et al. (1993) observaram efeito supressivo na penetração de J2 de *M. incognita* em raízes de soja, com adição de

1,37 gramas de aldicarbe por m² de solo, por um período de 28 dias. Rocha & Campos (2003) observaram que a incubação de J2 de *M. incognita* em solução de aldicarbe a 65 µg/mL por 12 e 24 horas reduz a penetração em raiz de soja, onde menor penetração foi observada em J2 incubados por 24 horas. Esses mesmos autores verificaram que, quando se incubou o J2 de *M. incognita* por 12 horas em aldicarbe 65 µg/mL, seguido por 12 horas em água, houve aumento na penetração, comparado com a incubação de J2 somente em aldicarbe 65 µg/mL. Hough & Thomason (1975) observaram que não houve penetração de J2 de *M. javanica* e *H. schachtii*, quando foi adicionado ao substrato 1 µg/mL de aldicarbe.

A redução na reprodução de *M. incognita* ocorreu por efeito deletério no sistema sensorial do J2 ao ser incubado em aldicarbe durante 24 horas, porém com maior reversibilidade proporcional as menores concentrações. Além disto durante o processo de parasitismo pode ter ocorrido desintoxicação dos juvenis pois concentração de 150 µg/mL na solução incubadora ainda proporciona reprodução regular. Contudo, quando o aldicarbe foi aplicado após a inoculação da soja com J2 saudáveis, a redução na reprodução ocorreu ao que tudo indica, pelo retardamento do desenvolvimento embrionário, absorção do nematicida pelo corpo da fêmea impedindo postura ou diminuindo a utilização dos nutrientes das células gigantes. A redução na formação de galhas só ocorre quando o aldicarbe é aplicado em período próximo à inoculação de J2 saudáveis demonstrando, assim, efeitos na formação do sitio de alimentação diminuindo, talvez, a capacidade do J2 em produzir elicitores para a formação das células gigantes ou mesmo afetando processos que levam a alteração no hospedeiro (hiperplasia e hipertrofia de células). Sikora & Hartwig (1991) observaram que aldicarbe retarda o desenvolvimento de juvenis de *H. schachtii*, quando o mesmo é adicionado ao solo três dias após a inoculação, quando apenas 19% da população atingiu o estágio de J4. Os mesmos autores verificaram que o

carbofuram foi menos eficiente do que o aldicarbe, tendo 46% e 20% da população atingiu o estágio J4 e adultos, respectivamente. Retardamento no desenvolvimento de J2 de *H. shachtii* foi observado por Steele & Hodges (1975), quando mudas de beterraba infectadas foram transplantadas para solo com 0,75 e 3 µg/mL de aldicarbe por grama de solo e o desenvolvimento do nematoide foi inversamente proporcional ao aumento da concentração de aldicarbe e do tempo de exposição do nematoide ao nematicida.

O aldicarbe, portanto, age deletoriamente nas diversas fases do ciclo de vida de *M. incognita* em soja, com destaque na desorientação do J2 no processo de busca do hospedeiro e na reprodução. Porém, o ciclo não é prolongado pela imobilidade do J2 exposto à solução de aldicarbe, já que não há economia de energia corporal, mas é interrompido em diversas fases, causando danos aos órgãos sensoriais, na ontogenia e na reprodução.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDALÓ, V.; MOREIRA, G.F.; MAXIMINIANO, C.; MOINO JUNIOR, A.; CAMPOS, V.P. Influence of herbicides on lipid reserves, mortality and infectivity of *Heterorhabditis amazonensis* (Rhabditida: Heterorhabditidae). **Nematologia Mediterranea**, Bari, v. 37, n. 1, p. 11-15, 2009.
- BERGE, J.B.; CUANY, A. Activite de l'aldicarbe sur les oeufs de *Meloidogyne arenaria*. **Academie d' Agriculture de France**, Paris, v. 38, n. 3, p. 371-376, 1972.
- CAMPOS, H.D. **Aspectos do parasitismo e da privação alimentar do nematóide de galhas (*Meloidogyne javanica*) e do cisto (*Heterodera glycines*) em soja**. 2003. 203 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- CHEN, S.Y.; DICKSON, D.W. A technique for determining live second-stage juveniles of *Heterodera glycines*. **Journal of Nematology**, College Park, v. 32, n. 1, p. 117-121. 2000.
- CHRISTOPHERS, A.E.P.; PATEL, M.N.; BENSON, J.A.; SAKA, V.W.; EVANS, A.A.F.; WRIGHT, D.J. A rapid field-laboratory bioassay to assess the infectivity of *Meloidogyne* spp. second stage juveniles. **Nematologica**, Leiden, v. 43, n. 1, p. 117-120. 1997.
- DONCASTER, C.C.; SHEPHERD, A.M. The behaviour of second-stage *Heterodera rostochiensis* larvae leading to their emergence from the egg. **Nematologica**, Leiden, v. 13, n. 3, p. 476-478, 1967.
- GOURD, T.R.; SCHMITT, D.P.; BARKER, K.R. Use of nematodes as biomonitors of nonfumigant nematicide movement through field soil. **Journal of Nematology**, College Park, v. 25, n. 1, p. 63-70, 1993.
- GUNDY, S.D. van.; MCKERRY, M.V. Action of nematicides. In: HORSFALL, J.G.; COWLING, E.B. (Ed.). **Plant disease an advanceal treative**. New York: Academic, 1977. v. 1, p. 263-283.
- HAFEZ, S.L.; SUNDARARAJ, P. Efficacy and persistence of nematicides against root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* on tomato. **Indian Journal of Nematology**, New Delhi, v. 10, n. 1, p. 37-40, 2000.

HOUGH, A.; THOMASON, I.J. Effects of aldicarb on the behavior of *Heterodera schachtii* and *Meloidogyne javanica*. **Journal of Nematology**, College Park, v. 7, n. 3, p. 221-229, 1975.

HOUGH, A.; THOMASON, I.J.; FARMER, W.J. Behavior of aldicarb in soil relative to control of *Heterodera schachtii*. **Journal of Nematology**, College Park, v. 7, n. 3, p. 214-221, 1975.

HUANG, S.P.; GUNDY, S.D. van. Effects of aldicarb and its sulfoxide and sulfone on the biology of *Tylenchus semipenetrans*. **Journal of Nematology**, College Park, v. 10, n. 1, p. 100-106, 1976.

HUANG, S.P.; RESENDE, I.C.; SOUZA, P.E.; CAMPOS, V.P. Effect of aldicarb, ethoprop and carbofuran on control of coffee root-knot nematodes *Meloidogyne exigua*. **Journal of Nematology**, College Park, v. 15, n. 4, p. 510-514, 1983.

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

JONES, P.W.; TYLKA, G.L.; PERRY, R.N. Hatching. In: PERRY, R.N.; WRIGHT, D.J. (Ed.). **The physiology and biochemistry of free-living and plant-parasitic nematodes**. Wallingford, UK: CAB International, 1998. p. 181-212.

LAWRENCE, G.W.; MCLEAN, K.S.; BASTSON, W.E.; MILLER, D.; BORBON, J.C. Response of *Rotylenchulus reniformis* to nematicide applications on cotton. **Journal of Nematology**, College Park, v. 22, n. 4, p. 707-711, 1990.

MASHELA, P.W.; SHIMELIS, H.A.; MUDAU, F.N. Comparison of the efficacy of ground wild cucumber fruits, aldicarbe and fenamiphos on suppression of *Meloidogyne incognita* in tomato. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 156, n. 5, p. 264-267, 2008.

NELMES, A.J. Behavioral responses of *Heterodera rostochiensis* larvae to aldicarbe and its sulfoxide and sulfone. **Journal of Nematology**, College Park, v. 2, n. 3, p. 223-227, 1970.

OPPERMAN, C.H.; CHANG, S. Effects of aldicarb and fenamiphos on acetylcholinesterase and motility of *Caenorhabditis elegans*. **Journal of Nematology**, College Park, v. 23, n. 1, p. 20-27, 1991.

PERRY, R.N. Hatching. In: LEE, D.L. (Ed.). **The biology of nematodes**. London: TAYLOR & FRANCIS, 2002. p. 184-169.

PERRY, R.N.; MOENS, M. **Plant nematology**. Wallingford, UK: CAB International, 2006. 447 p.

PERRY, R.N.; WHARTON, D.A.; CHARKE, A.J. The structure of the egg-shell of *Globodera rostochiensis* (Nematoda: Tylenchida). **International Journal of Parasitology**, Oxford, v. 12, n. 4, p. 481-485, 1982.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R**: a language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2009. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acesso em: 22 maio 2009.

ROCHA, F.S.; CAMPOS, V.P. Efeito de baixa dose de Aldicarbe nos processos de eclosão a penetração de juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne incognita*. **Nematologia Brasileira**, Campinas, v. 27, n. 2, p. 185-192, 2003.

ROCHA, F.S.; MUNIZ, M.F.S.; CAMPOS, V.P. Coloração de fitonematóides com corantes usados na indústria alimentícia brasileira. **Nematologia Brasileira**, Campinas, v. 29, n. 2, p. 293-297, dez. 2005.

SCHUSKE, K.; BEGY, A.A.; JORGENSEN, E.M. The GABA nervous system in *Caenorhabditis elegans*. **Trends in Neurosciences**, Oxford, v. 27, n. 4, p. 407-414, 2004.

SIKORA, R.A.; HARTWIG, J. Mode-of-action of the carbamate nematicides cloethocarb, aldicarb and carbofuran on *Heterodera schachtii*: 2. systemic activity. **Revue de Nématologie**, Bondy, v. 14, n. 4, p. 531-536, 1991.

STEELE, A.E.; HODGES, L.R. In vitro and in vivo effects of aldicarb on survival and development of *Heterodera schachtii*. **Journal of Nematology**, College Park, v. 7, n. 3, p. 305-312, 1975.

STEWART, G.R.; PERRY, R.N.; WRIGHT, D.J. Immunocytochemical studies on the occurrence of gamma-aminobutyric acid (GABA) in the nervous system of the nematodes *Panagrellus redivivus*, *Meloidogyne incognita* and *Globodera rostochiensis*. **Fundamental and Applied Nematology**, Montrouge, v. 17, n. 4, p. 433-439, 1994.

STEWART, G.R.; PERRY, R.N.; WRIGHT, D.J. Occurrence of dopamine in *Panagrellus redivivus* and *Meloidogyne incognita*. **Nematology**, Leiden, v. 3, n. 6, p. 843-848, 2001.

STOREY, R.M.J. The initial neutral lipid reserves of juveniles of *Globodera* spp. **Nematologica**, Leiden, v. 29, n. 2, p. 144-150, 1983.

WRIGHT, D.J.; PERRY, R.N. Reproduction, physiology and biochemistry. In: PERRY, R.N.; MOENS, M. (Ed.). **Plant nematology**. Wallingford: CAB International, p. 187-209, 2006.

CAPÍTULO 3

Efeito da incubação de juvenil do segundo estágio em aldicarbe em solução e no solo na mortalidade, danos e reprodução de *Meloidogyne incognita* em soja

RESUMO

O juvenil do segundo estágio (J2) tem reserva energética limitada para se mover no solo e na planta, em busca do local de alimentação, porém, sofrendo influências de substâncias tóxicas, como nematicidas. Vários ensaios foram realizados incubando-se o J2 em aldicarbe em solução e no solo, para estudar o efeito na mortalidade, danos e reprodução de *M. incognita* em soja. A mortalidade de J2 em aldicarbe (5 e 50 µg/mL) só foi elevada aos 20 dias de incubação com maior ($P \leq 0,05$) efeito na concentração de 50 µg/mL e menor no controle (água), ocorrendo, então, interação sinérgica entre o aldicarbe e o período de 20 dias de carência alimentar do J2. O número de galhas e de ovos/g de raiz foi reduzido inversamente proporcional ao tempo de incubação do J2 em água e em aldicarbe (5, 10 e 20 dias), com reduções significativas em cada período de incubação em água pura e em aldicarbe a 5 µg/mL. Os J2, quando incubados em aldicarbe 50 µg/mL por 5 e 10 dias, proporcionaram sempre os mesmos ($P \leq 0,05$) valores relativos a número de galhas e ovos/g de raiz. A incubação por 20 dias resultou em perda da infectividade do J2, tanto em água quanto em aldicarbe (5 e 50 µg/mL), não ocorrendo praticamente galhas e ovos. Também quando os J2 foram incubados no solo com aplicação de solução de aldicarbe (5 e 50 µg/mL) e água até 60% da capacidade de campo seguido do plantio de soja, 0, 5, 10 e 20 dias após a aplicação do aldicarbe, a infectividade dos J2 foi nula, não ocorrendo nem galhas, nem ovos. Entretanto, quando o solo infestado com J2 foi irrigado com água pura, a formação de galhas e a reprodução decresceram com o período de incubação do J2, com redução drástica a partir do 5º dia. Portanto, a duração do período sem alimento do J2 a temperaturas de 25°C e a exposição ao aldicarbe afetam o ciclo de *M. incognita* em soja e interagem sinérgicamente aos 20 dias de exposição ao nematicida.

Palavras-chave: *Meloidogyne incognita*, Soja, aldicarbe

ABSTRACT

The *Meloidogyne* spp second stage juveniles (J2s) have body reserve energy only enough to move among soil particles and inside plant to search for the feeding site, however, suffering influences of toxic substances such as nematicides. Various assays were done by storing J2 in irrigated soil with aldicarb as well as in aldicarb water solution in order to study the effect on J2 mortality, damage and *M. incognita* reproduction in soybean. The mortality of J2 stored in aldicarb (5 and 50 µg/mL) was only high at 20 days storage period with greater ($P \leq 0,05$) effect at 50 µg/mL dosage and least at control (water), occurring, then, synergistic interaction between aldicarb and the twenty days period of J2 starvation. The number of galls and eggs/g of roots was inversely reduced proportional to the J2 storage periods in aldicarb solution and pure water (0, 5, 10 e 20 days), with significant reduction at either storage period in aldicarb solution (5 µg/mL) and pure water. The J2s when stored in aldicarb 50 µg/mL per 5 and 10 days gave, always, the smallest ($P \leq 0,05$) values of number of galls and eggs per got roots. The 20 days storage resulted in J2 infectivity loss as in water as in aldicarb (5 and 50 µg/mL) producing, practically, no galls or eggs. When the J2s were stored in soil irrigated with aldicarb (5 and 50 µg/mL) solutions at 60% of field capacity followed by soybean planting at 5, 10 and 20 days after aldicarb application, the J2 infectivity was null without galls or eggs productions. However, when the soil infested with J2 was irrigated with pure water the galls formation and reproduction decreased with the J2 storage period with drastic reduction from the 5th day on. Therefore, the J2 starvation period duration at temperature of 25 °C and exposure to aldicarb interact, synergistically, increasing J2 mortality and affect, detrimentally, the *M. incognita* life cycle in soybean.

Keywords: *Meloidogyne incognita*, soybean, aldicarb.

1 INTRODUÇÃO

O ciclo de vida dos nematoides de galhas (*Meloidogyne* spp) envolve diversas fases, como migração do juvenil do segundo estágio (J2) pelo solo à procura da ponta das raízes novas, penetração pelo tecido meristemático, migração interna até encontrar o local apropriado para estabelecer o sítio de alimentação (células gigantes), desenvolvimento pós-embriológico e reprodução, além dos aspectos de alteração do hospedeiro, entre os quais as galhas e os eventos que ocorrem dentro do ovo em associação com o hospedeiro (Agrios, 1997). Como essas fases e eventos funcionam em sincronia para a manifestação da doença, o efeito tóxico de uma molécula interrompe o ciclo, retardando-o ou, mesmo, eliminando o patógeno e impedindo a consumação do mesmo.

As moléculas tóxicas dos grupos organofosforados e carbamatos a fitonematoides já comercializadas, chamadas de nematicidas, têm efeito temporário já comprovado na redução populacional dos nematoides e nos danos à planta (Lawrence et al., 1990; Mashela et al., 2008). O aldicarbe é um exemplo de nematicida de sucesso utilizado no controle de fitonematoides pela ação da molécula 2-metil-2-(dimetiltio)-propionaldeído-O-(metilcarbamoil) e reduz a população de *Meloidogyne* spp. no solo e os danos nas plantas até 40 dias após a sua aplicação (Hough et al., 1975).

No controle dos nematoides de cisto *Heterodera rostochiensis*, alguns estudos sugerem que o aldicarbe age diretamente no nematoide no solo e não indiretamente pela atuação na planta (Hague & Pain, 1973; Miller, 1970). Tratamento de solo com aldicarbe previne a penetração nas raízes de batata, resultando no acúmulo de J2 de *H. rostochiensis* no solo (Pain & Hague, 1971 citado por Steele & Rodges, 1975).

O aldicarbe afeta a migração do J2 no solo e a mobilidade em soluções (Huang et al., 1983; Sikora & Hartwig, 1991). A evolução dos conhecimentos a

partir desses estudos leva à conceituação do aldicarbe como nematicida que retarda o ciclo dos nematoides de galhas, atuando na imobilização temporária e reversível do J2 no solo, sendo, então, uma molécula de efeito nematostático (Nelmes, 1970; Rocha & Campos, 2003).

Contudo, pesquisas desenvolvidas nos últimos dez anos, sobre incubação dos J2 de *Meloidogyne* spp. em água a 28°C, demonstraram que a infectividade desses J2 diminui de acordo com o tempo de incubação (Rocha, 2007; Campos, 2003). Rocha (2007) verificou que o decréscimo no teor lipídico em J2 de *Meloidogyne incognita* afeta diferentemente sua infectividade e a reprodução com o tempo de armazenamento, tendo, aos seis dias de armazenamento dos J2 de *M. incognita*, ocorrido perdas superiores a 50% do teor de lipídios neutros em relação ao nível original. Nesse trabalho o autor verificou que o decréscimo no teor lipídico com o armazenamento correlacionou-se com a queda no número de galhas e de ovos de *M. incognita*. Somam-se a isto os estudos de Andaló et al. (2009), em que J1 de *Heterorhabditis amazonensis*, incubado em solução de herbicidas, teve perda da energia corporal acelerada sem a ocorrência de mortalidade.

Portanto, a eficácia do aldicarbe no controle de fitonematoides ainda necessita de muitas pesquisas fundamentais envolvendo as diversas fases e eventos do ciclo dos nematoides de galhas afetado por essa molécula. Dessa forma, decidiu-se aprofundar estudos sobre o efeito do aldicarbe nos J2 de *M. incognita* em soja, envolvendo a avaliação da mortalidade, dos danos e da reprodução desse nematoide após a incubação do J2 em diversos tempos e concentrações de aldicarbe, tanto em solução como no solo irrigado com o nematicida.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Preparo da solução estoque de aldicarbe

Solução estoque de 500 µg/mL de aldicarbe foi preparada pesando-se 6,66 g da formulação comercial Temik 150 G, colocado em erlenmayer com 1.000 cc de água destilada e homogeneizada por 30 minutos. A seguir, foi filtrada em algodão colocado no fundo do funil e mantida em geladeira a 8°C. Alíquotas foram obtidas para se avaliar o teor de aldicarbe em solução por meio de cromatografia a gás-líquido no laboratório de toxicologia de inseticidas da Universidade Federal de Lavras. Diluições da solução estoque foram feitas para se obter as concentrações empregadas nos ensaios.

2.2. Obtenção de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita*

Raízes de tomateiros (*L. esculentum* cv Kada) cultivados em casa de vegetação e infestadas com *M. incognita* foram lavadas, cuidadosamente, e cortadas em pedaços de 1 cm. A seguir, foram trituradas em liquidificador, por 20 segundos, em solução de hipoclorito de sódio a 0,5%, seguindo-se a técnica de Hussey & Barker (1973). Em seguida, foram colocados, aproximadamente, 3 g de caulim por tubo, realizando-se a limpeza dos ovos. Os ovos retidos na peneira de 0,025 mm foram recolhidos em béquer de 200 mL, utilizando-se piseta contendo água. A suspensão de ovos foi colocada em câmara de eclosão e mantida à temperatura de 25°C. Os J2 recolhidos no primeiro e no segundo dia de incubação foram descartados, utilizando-se os eclodidos a partir do terceiro dia.

2.3 Obtenção das plântulas de soja

Sementes de soja (*Glycine max* L. cv. Doko) foram distribuídas em bandejas plásticas previamente desinfestadas com álcool 95%, as quais

continham areia umedecida com água. Em seguida, foram colocadas em câmara climatizada, com 14 horas de luz e 10 horas de escuro, à temperatura de $27\pm 2^{\circ}\text{C}$, para permitir a germinação. Após 72 horas, as sementes germinadas com radícula de 2 cm de comprimento foram selecionadas para a instalação dos ensaios.

2.4 Efeito de tempo de exposição de juvenis do segundo estágio (J2) e de concentrações de aldicarbe na mortalidade do J2

Suspensões de 500 J2 por 100 μL foram preparadas e colocadas em frascos de 15 mL, juntamente com 5 mL de solução de aldicarbe por frasco, nas concentrações 0, 5 ou 50 $\mu\text{g/mL}$. Os frascos foram vedados e incubados, a 25°C , por 5, 10 e 20 dias. Ao final do período de incubação, a suspensão de J2 foi vestida em peneira de 11 μm , para eliminar toda a solução de Aldicarbe. Os J2 retidos na peneira foram lavados por duas vezes em água de torneira e transferidos para placa Elisa, ns quais foram feitas as avaliações do número de J2 mortos. A avaliação de mortalidade foi realizada conforme metodologia descrita por Chen & Dickson (2000), em que espécimes que permaneceram imóveis após a adição de uma gota de NaOH 1 N à suspensão de nematoides foram classificados como mortos.

2.5 Danos e reprodução de *Meloidogyne incognita* a partir de juvenis do segundo estágio (J2) incubados em solução ou no solo umedecido com aldicarbe

No primeiro ensaio, os J2 foram incubados por 5, 10 e 20 dias em soluções de aldicarbe (0, 5 ou 50 $\mu\text{g/mL}$), a 25°C . Após esse período, os J2 foram vertidos em peneira de 11 μm para eliminar toda a solução de aldicarbe. Os J2 retidos na peneira foram lavados por duas vezes em água de torneira, removidos com jato de água através de pisseta e acondicionados em frasco, para

a inoculação. Previamente, sementes de soja germinadas foram plantadas em 250g de substrato de solo e areia (2:1), autoclavadas por 2 horas a 120°C, em copos plásticos de 300 mL e mantidos em câmara climatizada com 14 horas de luz e 10 horas de escuro, à temperatura de 27±2°C. Após quatro dias do transplântio, fez-se a inoculação dos J2 dispersos em 4 mL de água e distribuídos em 4 furos de 3 cm de profundidade, feitos ao redor das plântulas.

Em outro ensaio, os J2 foram incubados no solo por 0, 5, 10 e 20 dias antes do transplântio das mudas. Aos copos plásticos com 250g substrato de solo e areia (2:1) foram adicionadas soluções de aldicarbe 0, 5 ou 50 µg/mL por copo até atingir 60% da capacidade de campo. No centro do substrato de cada copo colocou-se um molde de gesso revestido por parafina no mesmo formato, tamanho e volume das células da bandeja de isopor (144 células). Setecentos J2 foram dispersos em 2 mL de água e colocados em 4 furos feitos com o auxílio de um bastão de vidro, na profundidade de 3 cm ao redor do molde de gesso, de cada copo. Os furos feitos foram recobertos com o mesmo substrato. A seguir, os copos foram colocados em incubadoras BOD a 25°C e mantida a umidade do solo a 60% da capacidade de campo, com irrigações diárias com água. Aos 0, 5, 10 e 20 dias, os moldes de gesso foram substituídos por mudas de soja. Para isso, sementes de soja germinadas foram plantadas em bandejas de 144 células contendo os mesmo substratos utilizados nos copos e mantidas em sala climatizada, nas condições já mencionadas anteriormente, por até 10 dias, quando, então, as plantas foram transplantadas para os copos.

No ensaio em que J2 foram incubados em solução, foi empregado o delineamento inteiramente ao acaso, com fatorial 3 x 3, três concentrações (a concentração zero foi utilizada como testemunha) e três tempos de incubação, em 4 repetições. Já no ensaio em que J2 foram incubados no solo, foi empregado o mesmo delineamento, com fatorial 3 x 4, três concentrações e quatro tempos

de incubação (0, 5, 10 e 20 dias), em que, no tempo zero, mudas de soja foram transplantadas logo após a inoculação dos J2 no solo, em cinco repetições.

Nos dois ensaios, os danos e a reprodução foram avaliados aos 30 dias após a inoculação dos J2. Para isso, a parte aérea foi cortada e o sistema radicular no solo foi colocado em água parada num balde de 10 litros e cuidadosamente separado do solo. As raízes foram deixadas sobre papel-toalha por 10 minutos para avaliação do peso da matéria fresca das raízes, seguida da contagem do número de galhas por sistema radicular. Para a quantificação do número de ovos por sistema radicular, as raízes foram cortadas em pedaços de, aproximadamente, 2 cm de comprimento e os ovos obtidos pela técnica de Hussey & Barker (1973). Em microscópio de objetiva invertida, quantificou-se o número de ovos de *M. incognita* por sistema radicular. Em seguida, estimou-se o número de galhas e de ovos/g de raiz.

Os dados obtidos quando necessário, foram transformados em $\sqrt{x+1}$ e, em seguida, submetidos à análise de variância e ao teste Tukey, a 5% de probabilidade, para a comparação das médias. As variáveis significativas pelo teste F foram submetidas à análise de regressão para ajuste do melhor modelo capaz de descrever o fenômeno biológico em questão. As análises foram realizadas pelo programa R (R Development Core Team, 2009).

3 RESULTADOS

A mortalidade de juvenis do segundo estágio (J2), aos 20 dias de incubação em água ou em aldicarbe, aumentou significativamente, comparada com a dos demais períodos. Mas, os aumentos maiores ($P \leq 0,05$) ocorreram na incubação em aldicarbe, comparado com o controle, com maior ($P \leq 0,05$) mortalidade (84%) na concentração 50 $\mu\text{g/mL}$. A mortalidade de J2 nas concentrações (5 e 50 $\mu\text{g/mL}$) de aldicarbe nos 5 e 10 dias de incubação foi de, aproximadamente, 12% (Figura 1).

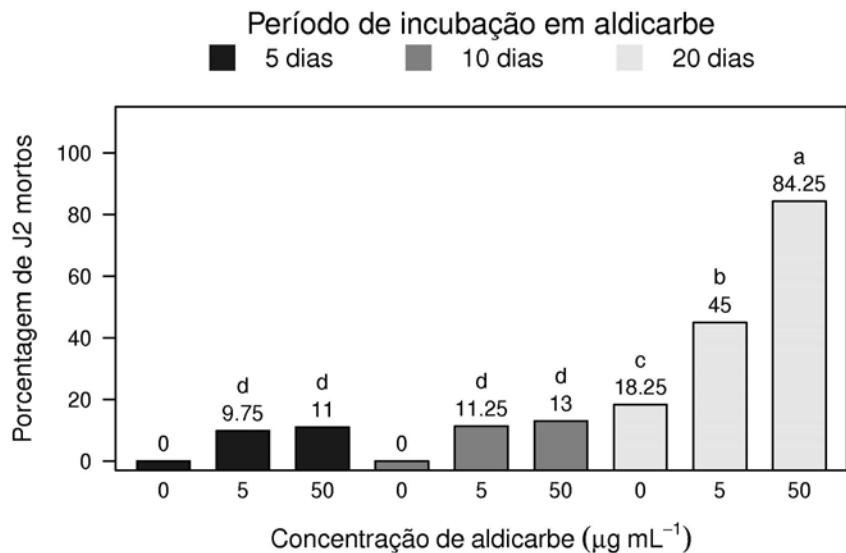


FIGURA 1 Porcentagem total de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita* mortos após a incubação em soluções de aldicarbe por diversos períodos. Barras seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

A incubação dos J2 em água e em aldicarbe promoveu redução do número de galhas e de ovos/g de raiz inversamente proporcional ao tempo de incubação com reduções significativas em cada período, quando o J2 foi

incubado em água pura e em aldicarbe 5 µg/mL. Os J2 incubados em aldicarbe 50 µg/mL por 5 e 10 dias proporcionaram sempre o menor ($P \leq 0,05$) número de galhas e de ovos/g de raiz. Em qualquer solução utilizada para a incubação do J2 (água ou aldicarbe), no período de 10 dias, reduziu mais de 50% o número de galhas e, entre 20%-50%, o número de ovos/g de raiz, em relação a 5 dias de incubação. No 20º dia, a infectividade do J2 incubado em água e no aldicarbe (5 e 50 µg/mL) foi quase nula, não ocorrendo, praticamente, galhas e ovos (Figuras 2 e 3).

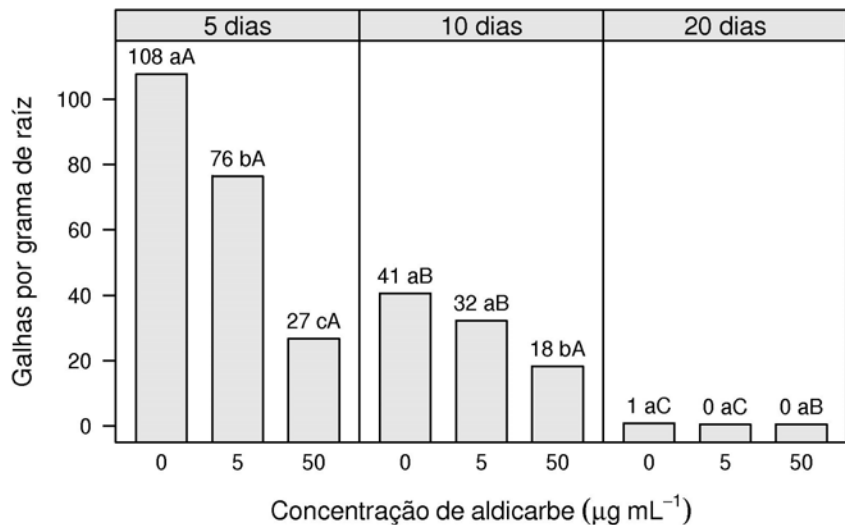


FIGURA 2 Número médio de galhas por grama de raiz de soja resultante da inoculação de juvenil do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita* incubados em aldicarbe por diversos períodos. Letras minúsculas comparam as concentrações dentro de cada período de incubação (dias) e letras maiúsculas comparam cada concentração nos diferentes períodos de incubação (dias). Barras seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

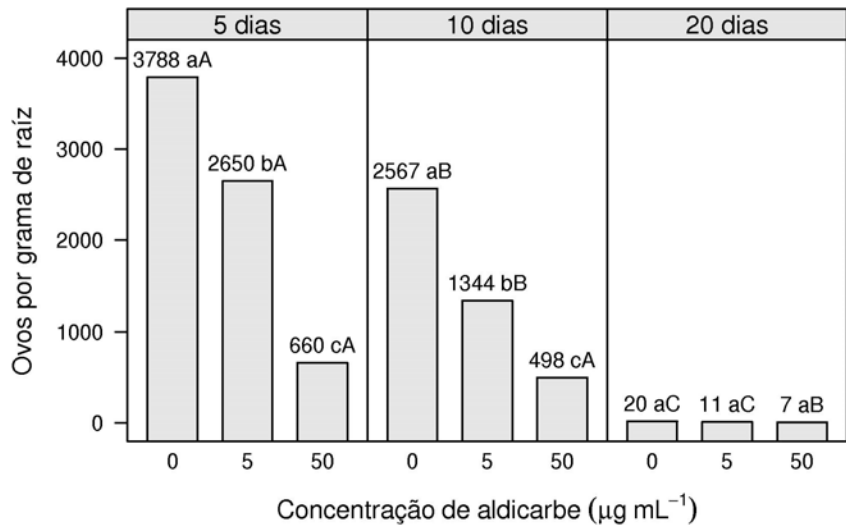


FIGURA 3 Número médio de ovos por grama de raiz de soja, resultante da inoculação de juvenil do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita* incubados em aldicarbe por diversos períodos. Letras minúsculas comparam as concentrações dentro de cada período de incubação (dias) e letras maiúsculas comparam cada concentração nos diferentes períodos de incubação (dias). Barras seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

A incubação dos J2 de *M. incognita* em substrato com aplicação de aldicarbe por 0, 5, 10 e 20 dias não proporcionou a formação de galhas nem ovos nas raízes, em nenhum período. Entretanto, na incubação em solo irrigado com água pura, a formação de galhas e a reprodução de *M. incognita* decresceram com o período de incubação do J2, com redução drástica a partir do 5º dia. A redução no número de ovos com o tempo de incubação do J2 foi mais rápida do que galhas/g de raiz de soja (Figuras 4 e 5).

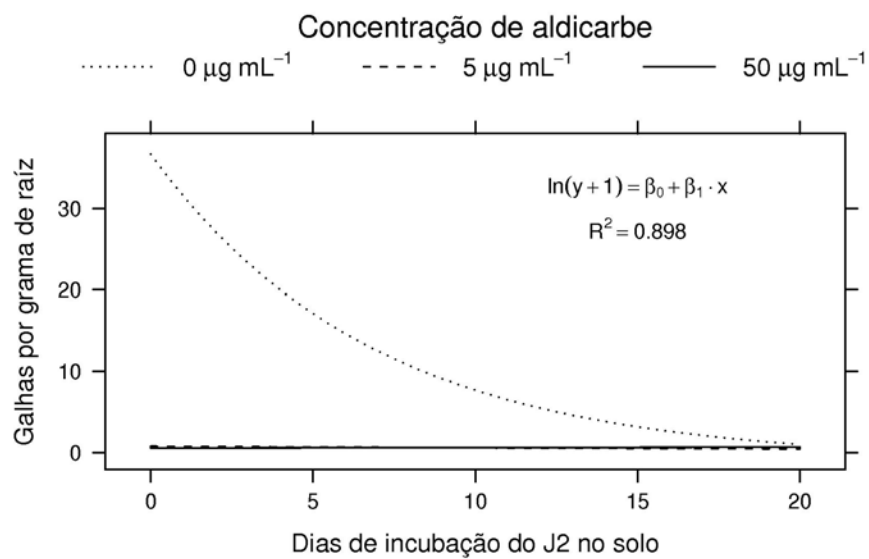


FIGURA 4 Numero médio de galhas por grama de raiz de soja resultante da incubação de juvenil do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita* em substrato com aldicarbe por diversos períodos.

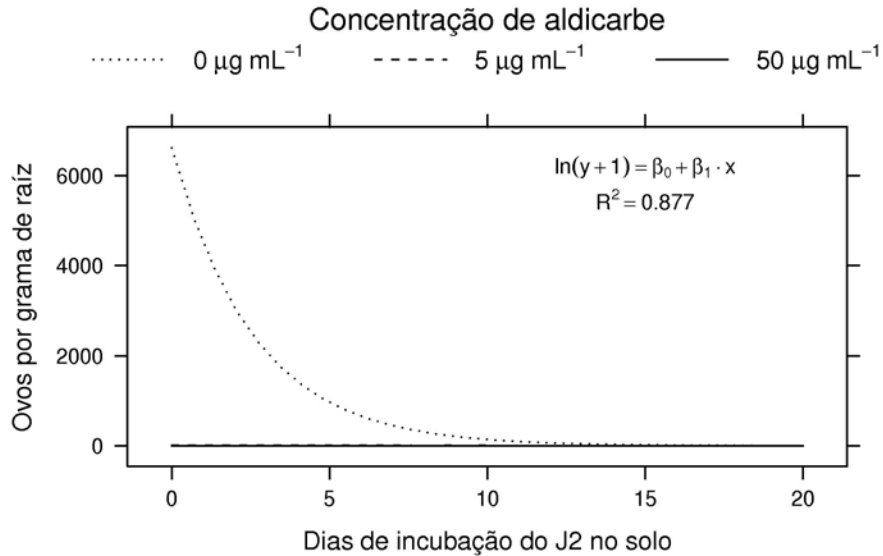


FIGURA 5 Número médio de ovos por grama de raiz de soja, resultante da incubação de juvenil do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita* em substrato com aldicarbe por diversos períodos.

4 DISCUSSÃO

A baixa mortalidade de J2 de *M. incognita* nas soluções (5 e 50 µg/mL) de aldicarbe, durante os 10 dias de incubação e o aumento drástico aos 20 dias de incubação definem dois quadros fisiológicos distintos do J2, com sensibilidade diferente ao nematicida, ocorrendo, então, interação sinérgica entre o aldicarbe e o período de 20 dias de carência alimentar do J2. Como a temperatura de incubação foi de 25°C, os J2 incubados nas soluções estarão gastando a energia de reserva que veio do desenvolvimento embrionário. Quando este nível energético ainda é elevado (até 10 dias), o efeito letal do aldicarbe é muito baixo. Contudo, quando essa energia declina sensivelmente, (20 dias), o efeito letal do nematicida é drástico e com resposta diferencial entre concentrações. Herbicidas não causam mortalidade em juvenis do primeiro

estádio (J1) de *Heterorhabditis amazonensis* em cinco dias de incubação, porém, reduzem ainda mais o teor de lipídio corporal, comparados com o J1 incubado em água pura (Andaló et al., 2009). Gundy et al. (1967) verificaram que o armazenamento de J2 de *M. javanica*, a 25°C, por 4 dias, causou perda lipídica de 41,33%, porém, não afetou a mobilidade dos J2.

Também o maior número de galhas e de ovos por grama de raiz de soja, nos 10 dias de incubação dos J2 com redução drástica aos 20 dias, semelhante ao da mortalidade (Figuras 1, 2 e 3), comprova, inicialmente, que a alta mortalidade nas soluções aos 20 dias de incubação (Figura 1) conseqüentemente não propiciou sucesso no parasitismo. Entretanto, dentro do período de 10 dias de incubação, a redução na reprodução (ovos/g de raiz) pela exposição ao aldicarbe nas duas concentrações testadas indica que os efeitos do aldicarbe estão ligados à redução da atração do J2 pelas raízes, além de outros danos fisiológicos, como menor utilização dos nutrientes nas células gigantes.

Quando a reprodução de *M. incognita* resultante de J2 incubado por 10 dias em aldicarbe 5 µg/mL é diferente do controle, a produção de galhas é semelhante. Este resultado indica que, embora a penetração e o sucesso na formação da célula gigante tenham ocorrido, a capacidade da célula gigante pode ter sido deficitária ou a fisiologia do J2 incubado no aldicarbe 5 µg/mL pode ter sido afetada deletariamente pelo nematicida. Já a solução 50 µg/mL de aldicarbe tem efeito no J2, durante a incubação, bem mais pronunciada nos eventos já citados ou, mesmo, em outros aspectos do direcionamento do nematoide e de sua fisiologia, pois sempre reduziu significativamente o número de galhas e de ovos de *M. incognita*. Steele & Hodges (1975) verificaram que o efeito de aldicarbe em J2 de *H. schachtii* estocados por 4, 8 e 14 dias em soluções de aldicarbe (0,1; 2 e 5 µg/mL) foi proporcional ao tempo de incubação (dias) e às concentrações.

A não formação de galhas e de ovos na rizosfera de soja transplantada para solo no qual foram adicionadas soluções de aldicarbe demonstra o insucesso no parasitismo, podendo ter ocorrido imobilização do J2 e simultânea perda da energia corporal, como ocorre com J1 de *H. amazonensis* incubado em solução de herbicidas (Andaló et al., 2009). Como, nas condições deste trabalho, a temperatura e a umidade foram controladas e o substrato utilizado tinha baixa atividade microbiana, isso, provavelmente, contribuiu para que a meia vida do aldicarbe se estendesse por mais de 20 dias. No campo, a lixiviação da solução de nematicida pelo perfil do solo, bem como temperaturas elevadas e uma alta atividade microbiana, faz com que ocorra uma redução no tempo da meia-vida do aldicarbe.

Piffer & Rigitano (1991) estimaram valores de meia-vida de degradação dos resíduos de aldicarbe em torno de 20 dias em um Latossolo Vermelho distroférico, no qual ocorreu rápida degradação do aldicarbe e de seus resíduos (sulfóxido e sulfona de aldicarbe). A perda ou a degradação de aldicarbe no campo levaria sua redução a concentrações muito baixas, fazendo com que o nematoide se tornasse ativo e capaz de causar dano as plantas.

A reprodução e o desenvolvimento de fêmeas de *Tylenchulus semipenetrans* foram completamente inibidos por 50 dias, quando se adicionaram ao solo 10,6 µg/mL de aldicarbe (Huang & Gundy, 1976). Steele & Hodges (1975) sugeriram que a concentração de 11,5 µg/mL de aldicarbe na solução do solo é capaz de suprimir a penetração e o desenvolvimento de *H. shachtii*. Entretanto, a concentração de 5 µg/mL inibe a eclosão de J2. Hafez & Sundararaj (2000) verificaram 100% de controle quando J2 de *M. incognita* foram incubados por 14, 21, 28 e 35 dias, em solos tratados com 4,5 kg ai/ha.

A redução drástica do número de galhas e de ovos resultantes da incubação de J2 em solo ao quale não foram adicionadas soluções de aldicarbe (Figuras 4 e 5), a partir do 5º dia, resultou nas quedas da infectividade e da

energia corporal durante o período de carência alimentar pelo J2. Freire et al. (2007) verificaram que reprodução e infectividade de J2 de *M. incognita* estocados a 28°C decresceram, ao longo de 6 dias de estocagem, em solo (neossolo quartzarênico) de textura arenosa. Rocha (2007) observou que o decréscimo no teor lipídico em J2 de *Meloidogyne incognita* afeta diferentemente sua infectividade e a reprodução, com o tempo de armazenamento. Aos 6 dias de armazenamento dos J2 de *M. incognita*, ocorreram perdas superiores a 50% do teor de lipídios neutros em relação ao nível original e houve decréscimo no teor lipídico com o armazenamento, correlacionando-se com a queda no número de galhas e de ovos de *M. incognita*. Campos (2003) verificou perdas de 38,82% e de 56,12% no lipídio corporal de J2 de *M. javanica* a partir do segundo e do quarto dias de armazenamento em água parada a 28°C, o que refletiu em redução de 44,64% na produção de ovos e de 73,68% no número de fêmeas.

Portanto, a duração do período sem alimento para o J2, à temperatura de 25°C e à exposição ao aldicarbe, interage sinergisticamente aos 20 dias de exposição ao nematicida e afeta detrimentalmente o ciclo de *M. incognita* em soja.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIOS, G.N. **Plant pathology**. 4. ed. San Diego: Academic, 1997. 635 p.
- ANDALÓ, V.; MOREIRA, G.F.; MAXIMINIANO, C.; MOINO JUNIOR, A.; CAMPOS, V.P. Influence of herbicides on lipid reserves, mortality and infectivity of *Heterorhabditis amazonensis* (Rhabditida: Heterorhabditidae). **Nematologia Mediterranea**, Bari, v. 37, n. 1, p. 11-15, 2009.
- CAMPOS, H.D. **Aspectos do parasitismo e da privação alimentar do nematóide de galhas (*Meloidogyne javanica*) e do cisto (*Heterodera glycines*) em soja**. 2003. 203 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- CHEN, S.Y.; DICKSON, D.W. A technique for determining live second-stage juveniles of *Heterodera glycines*. **Journal of Nematology**, College Park, v. 32, n. 1, p. 117-121, Mar. 2000.
- FREIRE, E.S.; CAMPOS, V.P.; DUTRA, M.R.; ROCHA, F.S.; SILVA, J.R.C.; POZZA, E.A. Infectividade de juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne incognita* em tomateiro após privação alimentar em solo e água em diferentes condições. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, n. 3, p. 270-274, 2007.
- GUNDY, S.D.; BIRD, A.F.; WALLACE, H.R. Aging and starvation in juvenile of *Meloidogyne javanica* and *Tylenchulus semipenetrans*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 57, n. 6, p. 559-571, 1967.
- HAFEZ, S.L.; SUNDARARAJ, P. Efficacy and persistence of nematicides against root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* on tomato. **Indian Journal of Nematology**, New Delhi, v. 10, n. 1, p. 37-40, 2000.
- HAGUE, N.G.M.; PAIN, B.F. The effect of organophosphorus compounds and oxime carbamates on the potato cyst nematode *Heterodera rostochiensis* Woll. **Pesticide Science**, Oxford, v. 7, n. 4, p. 459- 465, 1973.
- HOUGH, A.; THOMASON, I.J.; FARMER, W.J. Behavior of aldicarb in soil relative to control of *Heterodera schachtii*. **Journal of Nematology**, College Park, v. 7, n. 3, p. 214-221, 1975.

HUANG, S.P.; GUNDY, S.D. van. Effects of aldicarb and its sulfoxide and sulfone on the biology of *Tylenchus semipenetrans*. **Journal of Nematology**, College Park, v. 10, n. 2, p. 100-106, 1976.

HUANG, S.P.; RESENDE, I.C.; SOUZA, P.E.; CAMPOS, V.P. Effect of aldicarb, ethoprop and carbofuran on control of coffee root-knot nematodes *Meloidogyne exigua*. **Journal of Nematology**, College Park, v. 15, n. 4, p. 510-514, 1983.

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

LAWRENCE, G.W.; MCLEAN, K.S.; BASTSON, W.E.; MILLER, D.; BORBON, J.C. Response of *Rotylenchulus reniformis* to nematicide applications on cotton. **Journal of Nematology**, College Park, v. 22, n. 4S, p. 707-711, 1990.

MASHELA, P.W.; SHIMELIS, H.A.; MUDAU, F.N. Comparison of the efficacy of ground wild cucumber fruits, aldicarbe and fenamiphos on suppression of *Meloidogyne incognita* in tomato. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 156, n. 5, p. 264-267, 2008.

MILLER, P.M. Failure of several non-volatile and contact nematicides to kill eggs in cysts of *Heterodera tabacum*. **Plant Disease Reporter**, Washington, v. 54, n. 8, p. 781-783, 1970.

NELMES, A.J. Behavioral responses of *Heterodera rostochiensis* larvae to aldicarbe and its sulfoxide and sulfone. **Journal of Nematology**, College Park, v. 2, n. 3, p. 223-227, 1970.

PIFFER, R.; RIGITANO, R.L.O. Lixiviação e degradação do inseticida aldicarbe em dois diferentes solos. **Ciência e Prática**, Lavras, v. 15, n. 3, p. 355-363, 1991.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R**: a language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2009. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acesso em: 25 maio 2009.

ROCHA, F.S. **Aspectos da coloração, ciclo de vida, parasitismo por *Pasteuria penetrans* e suas relações com a reserva energética de juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne* spp.** 2007. 148 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

ROCHA, F.S.; CAMPOS, V.P. Efeito de baixa dose de aldicarbe nos processos de eclosão a penetração de juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne incognita*. **Nematologia Brasileira**, Campinas, v. 27, n. 2, p. 185-192, 2003.

SIKORA, R.A.; HARTWIG, J. Mode-of-action of the carbamate nematicides cloethocarb, aldicarb and carbofuran on *Heterodera schachtii*: 2. systemic activity. **Revue de Nématologie**, Bondy, v. 14, n. 4, p. 531-536, 1991.

STEELE, A.E.; HODGES, L.R. In vitro and in vivo effects of aldicarb on survival and development of *Heterodera schachtii*. **Journal of Nematology**, College Park, v. 7, n. 3, p. 305-312, 1975.