



**ASPECTOS DA COLORAÇÃO, CICLO DE VIDA,
PARASITISMO POR *PASTEURIA PENETRANS* E
SUAS RELAÇÕES COM A RESERVA
ENERGÉTICA DE JUVENIS DO SEGUNDO
ESTÁDIO DE *MELOIDOGYNE* SPP.**

FERNANDO DA SILVA ROCHA

2007

FERNANDO DA SILVA ROCHA

**ASPECTOS DA COLORAÇÃO, CICLO DE VIDA, PARASITISMO POR
PASTEURIA PENETRANS E SUAS RELAÇÕES COM A RESERVA
ENERGÉTICA DE JUVENIS DO SEGUNDO ESTÁDIO DE
MELOIDOGYNE SPP.**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do curso de Doutorado em Agronomia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de “Doutor”.

Orientador

Prof. Dr. Vicente Paulo Campos

LAVRAS
MINAS GERAIS –BRASIL
2007

Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da

Biblioteca Central da UFLA

Rocha, Fernando da Silva

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. / Fernando da Silva Rocha. – Lavras: UFLA, 2007.

148 p. : il.

Orientador: Vicente Paulo Campos.

Tese (Doutorado) – UFLA.

Bibliografia.

1. *Meloidogyne exigua*. 2. *Meloidogyne incognita*. 3. *Pasteuria penetrans*. 4. Lipídios neutros. 5. Parasitismo. 6. Reprodução. 7. Métodos de coloração. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-595.182

FERNANDO DA SILVA ROCHA

**ASPECTOS DA COLORAÇÃO, CICLO DE VIDA, PARASITISMO POR
PASTEURIA PENETRANS E SUAS RELAÇÕES COM A RESERVA
ENERGÉTICA DE JUVENIS DO SEGUNDO ESTÁDIO DE
*MELOIDOGYNE SPP.***

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras
como parte das exigências do curso de Doutorado
em Agronomia, área de concentração em
Fitopatologia, para obtenção do título de “Doutor”.

APROVADA em 14 de fevereiro de 2007

Prof. Dr. Ricardo Magela de Souza	UFLA
Prof. Dr. Mário Sobral de Abreu	UFLA
Prof. Dr. Jorge Teodoro de Souza	UFRB
Prof. Dr. Luiz Antônio Augusto Gomes	UFLA

Prof. Dr. Vicente Paulo Campos
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS –BRASIL

A Deus, pela vida, saúde e força na realização deste trabalho.

Ofereço

Aos meus pais, Felizaldo Rodrigues Rocha (*In memoriam*) e Maria das Graças Silva Rocha. Aos meus irmãos e cunhados, Felizardo, Fledston, Doralice, Joice, Suely, Magno, Ademar, Julmar, Lucimar e a todos os meus familiares e amigos, pelo carinho e pelo incentivo. À minha esposa, Silvânia, pelo Amor, carinho e compreensão durante todos esses anos e aos nossos futuros filhos.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela oportunidade de realização do Doutorado e pela concessão da bolsa de estudos.

Ao orientador Prof. Dr. Vicente Paulo Campos, pelos conselhos, incentivo, conhecimentos transmitidos e exemplo de dedicação profissional, que jamais será esquecido.

Aos membros da banca: Prof. Dr. Luiz Antônio Augusto Gomes, Mário Sobral de Abreu, Ricardo Magela de Souza e Jorge Teodoro de Souza, pelas valiosas sugestões.

Ao Prof. Dr. Ludwig Heinrich Pfenning, pela cessão do Laboratório de Micologia e ao colega Anderson, pelo auxílio na obtenção das fotografias, indispensável na realização deste trabalho.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia, pelos ensinamentos transmitidos.

Em especial à minha esposa, pela incansável ajuda na condução dos experimentos, incentivo na luta diária e exemplo de força e persistência.

Aos meus afilhados, Brígida e Fabrício, pela amizade, apoio e pela agradável convivência e carinho transmitido.

Ao funcionário Tarlei Luiz de Paula e aos alunos de graduação, Lílian, Maria Clara e Henrique, pelas inúmeras contribuições.

Aos colegas de curso: Anderson, Juliana, Jadir, Deila, Daniel e Pedro, cuja convivência e alegria tornaram melhor a realização deste trabalho.

Aos colegas de trabalho: Cleber, Eduardo, Fátima, José Mauro, Renata, Ricardo e Vanessa, pelo apoio, sugestões e convivência.

Aos demais colegas do Departamento de Fitopatologia, pela convivência e contribuição na realização deste trabalho.

BIOGRAFIA DO AUTOR

FERNANDO DA SILVA ROCHA, *filho de Felizaldo Rodrigues Rocha e Maria das Graças Silva Rocha, nasceu em 04 de março de 1975, no município de São João Evangelista, estado de Minas Gerais (MG).*

Em julho de 1995 ingressou na Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras, MG, e em fevereiro de 1996 ingressou no Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC), com pesquisas desenvolvidas na área de controle biológico de fitonematóides, sob a orientação do Prof. Dr. Vicente Paulo Campos, permanecendo até fevereiro de 2000. Em 27 de janeiro de 2001 obteve o título de Engenheiro Agrônomo e em março do mesmo ano iniciou o curso de pós-graduação em Agronomia, na UFLA, concentrando os seus estudos na área de Fitopatologia, sendo bolsista da Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), sob a orientação do Prof. Dr. Vicente Paulo Campos. Em 14 de fevereiro de 2003, obteve o título de “*Mestre*” e em março do mesmo ano iniciou o Doutorado em Fitopatologia, continuando seus estudos na área de nematologia, sob orientação do Prof. Dr. Vicente Paulo Campos, sendo bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Em 14 de fevereiro de 2007, submeteu-se à defesa de Tese para a obtenção do título de “*Doutor*”.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	iii
Introdução geral.....	1
Referencial teórico.....	4
Métodos de coloração de fitonematóides.....	4
Efeito do tempo de armazenamento de juvenis do segundo estágio na perda das reservas energéticas e na infectividade e reprodução.....	7
Mecanismo de orientação, natureza química e fontes atrativas e repelentes de fitonematóides.....	9
Fatores abióticos e bióticos que interferem na migração e penetração do juvenil do segundo estágio de <i>Meloidogyne</i> spp.	15
Efeito de fatores abióticos e bióticos na adesão de <i>Pasteuria penetrans</i>	17
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	20
ARTIGO 1: Coloração de fitonematóides com corantes usados na indústria alimentícia brasileira	34
Resumo.....	34
Summary.....	35
Conteúdo.....	35
Agradecimentos.....	42
Literatura citada.....	43
ARTIGO 2: Aspectos da reserva energética corporal de juvenis do segundo estágio de <i>Meloidogyne exigua</i> do cafeeiro	45
Resumo.....	45
Abstract.....	46

Introdução.....	47
Material e métodos.....	49
Flutuação populacional e do percentual de lipídios neutros de <i>Meloidogyne exigua</i> em cafeeiros infestados no campo.....	49
Correlação entre o teor corporal lipídico do juvenil do segundo estágio de <i>Meloidogyne exigua</i> e a infectividade e reprodução.....	51
Obtenção de juvenis do segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne exigua</i>	51
Obtenção de mudas de tomateiro.....	51
Instalação e avaliação do ensaio.....	51
Resultados e discussão.....	53
Flutuação populacional e do percentual de lipídios neutros de <i>Meloidogyne exigua</i> em cafeeiros infestados no campo.....	53
Correlação entre o teor corporal lipídico do juvenil do segundo estágio de <i>Meloidogyne exigua</i> e a infectividade e reprodução.....	60
Referências bibliográficas.....	65
ARTIGO 3: Migração de <i>Meloidogyne incognita</i> e hospedabilidade de cultivares de tomateiro a <i>M. exigua</i>.....	69
Resumo.....	69
Abstract.....	70
Introdução.....	71
Material e métodos.....	72
Obtenção de mudas de tomateiro.....	72
Obtenção de juvenis do segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne incognita</i> e <i>M. exigua</i>	72
Instalação e avaliação dos ensaios.....	73

Resultados e discussão.....	77
Efeito da inoculação de juvenis do segundo estágio de <i>Meloidogyne incognita</i> em diferentes distâncias de tomateiros na infectividade e reprodução.....	77
Efeito da privação alimentar de juvenis do segundo estágio de <i>Meloidogyne exigua</i> na infectividade e reprodução em tomateiros das cultivares Nemadoro e Kada.....	82
Referências bibliográficas.....	87
ARTIGO 4: Período de armazenamento e distância do inóculo em relação ao sistema radicular da soja na migração vertical de <i>Meloidogyne incognita</i>.....	91
Resumo.....	91
Summary.....	92
Introdução.....	93
Material e métodos.....	95
Obtenção das plântulas de soja.....	95
Obtenção de juvenis do segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne incognita</i>	95
Instalação e avaliação dos ensaios.....	95
Resultados e discussão.....	98
Efeito da distância entre o inóculo e o sistema radicular na migração vertical de juvenis de segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne incognita</i>	98
Efeito do período de armazenamento de juvenis do segundo estágio de <i>Meloidogyne incognita</i> inoculados a diferentes distâncias do sistema radicular.....	102
Literatura citada.....	108

ARTIGO 5: Período de armazenamento de juvenis do segundo estágio de <i>Meloidogyne incognita</i> infestados por <i>Pasteuria penetrans</i> no teor de lipídio corporal, na reprodução e danos causados ao tomateiro.....	111
Resumo.....	111
Abstract.....	112
Introdução.....	113
Material e métodos.....	115
Preparo das soluções tampões de fosfato de sódio.....	115
Obtenção de mudas de tomateiro.....	115
Obtenção dos endósporos de <i>Pasteuria penetrans</i>	115
Obtenção de juvenis do segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne incognita</i>	116
Instalação e avaliação do ensaio.....	116
Resultados e discussão.....	119
Referências bibliográficas.....	125
ARTIGO 6: Avaliação do conteúdo lipídico de juvenis do segundo estágio de <i>Meloidogyne exigua</i> e <i>M. incognita</i> e sua infectividade e reprodução.....	129
Resumo.....	129
Summary.....	130
Introdução.....	131
Material e métodos.....	133

Obtenção de mudas de tomateiro.....	133
Obtenção de juvenis do segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne incognita</i> e <i>M. exigua</i>	133
Instalação e avaliação dos ensaios.....	133
Resultados e discussão.....	136
Literatura citada.....	145
Considerações finais.....	148

RESUMO

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. Lavras:UFLA, 2007. 148p. (Tese - Doutorado em Fitopatologia)*

Estudaram-se neste trabalho diversos aspectos relacionados à coloração de nematóides, migração, desenvolvimento, reprodução, infecção por *P. penetrans* e suas relações com a reserva energética de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne* spp. Desenvolveu-se um novo procedimento de coloração de fitonematóides baseado nos corantes bordeaux e vermelho bordeaux encontrados nos sucos em pó Q.refresco® sabor morango e uva e no Ki.Gostoso® sabor groselha, cuja intensidade de coloração assemelhou-se às da floxina B e fucsina ácida. Este procedimento está sendo empregado no Laboratório de Nematologia da UFLA. Estudos sobre teor lipídico corporal revelaram que este variou nos J2 de *M. exigua* no campo, durante o ano, com menor concentração em agosto e maior concentração de novembro a fevereiro. Quando este nematóide foi estocado em água ocorreu redução do teor lipídico a partir do terceiro dia acompanhado da redução de infectividade e reprodução em cultivares de tomateiros Nemadoro e Kada. *M. incognita* estocado em areia também sofreu redução no teor de lipídico a partir do quinto dia e a migração desse nematóide foi reduzida à medida que se aumentou a distância do inóculo inicial das raízes de soja. A estocagem em água de J2 de *M. incognita* com endósporos de *P. penetrans* aderidos à cutícula reduziu menos o teor lipídico quando comparado com os J2 sem endósporos aderidos à cutícula. Os J2 com endósporos tiveram também redução no parasitismo e no número de endósporos produzidos por fêmea, à medida que se aumentou o período de armazenamento. A área escura apresentada ao longo do corpo dos J2 de *M. incognita* na ausência de corantes correlacionou-se com a área colorida de vermelho pelo “Oil Red O”, infectividade e reprodução de *M. incognita*. Os lipídios neutros também correlacionaram-se com o índice lipídico, peso lipídico, infectividade e reprodução de *M. exigua*. O período de seis dias de estocagem dos J2 de *M. incognita* e *M. exigua* proporcionou perdas superiores a 50% do teor de lipídios neutros em relação ao nível original, representando o período limiar de infectividade em tomateiro, enquanto que para a reprodução esse período foi reduzido para três dias de estocagem. Os resultados deste estudo representam

* Comitê Orientador: Vicente Paulo Campos – UFLA (Orientador), Ricardo Magela de Souza-UFLA e Edson Ampélio Pozza-UFLA

uma contribuição para o melhor entendimento do papel da reserva energética de J2 de *Meloidogyne* spp. e do seu ciclo de vida em plantas hospedeiras.

ABSTRACT

ROCHA, F.S. Aspects of staining, life cycle, parasitism by *Pasteuria penetrans* and their relationships to body energy reserve of second stage juveniles of *Meloidogyne* spp. Lavras:UFLA, 2007. 148p. (Thesis – Doctorate Program in Phytopathology)*

Several aspects related to nematode staining, migration, development, reproduction, infection by *P. penetrans* and their relationships to the body energy reserve of second stage juveniles (J2) of *Meloidogyne* spp. were studied. A new procedure for nematode staining was developed using bordeaux and red bordeaux stains found in the powdered juices Q.refresco flavor strawberry and grape and Ki.Gostoso flavor blackcurrant. The color intensity produced by these stains was similar to the obtained with Phoxine B and acid fuchsin. This method is currently being used in the routine of UFLA'S Nematology Laboratory. Field studies showed that the amount of body lipids varied in *M. exigua* J2 during the year, with the lowest concentrations found in August and the highest from November to February. When J2 of this nematode were stored in water for three days, there was a decrease in the lipid content followed by a reduction on infectivity and reproduction in the cultivars Nemadoro and Kada of tomato. *Meloidogyne incognita* stored in sand also showed reduction on J2 lipid content from the fifth day of storage onward. The migration was reduced according to the increase of the distance between the inoculum source and the soybean roots. The storage in water of *M. incognita* J2 with *P. penetrans* endospores adhered to the cuticle caused less reduction in J2 lipid content when compared to J2 without endospores. The J2 with endospores also had a reduction on parasitism and on the number of endospores produced per female, following the increase of the storage period. The dark area observed along the body of *M. incognita* J2 in the absence of stains correlated to the area stained red by "Oil Red O", and to the infectivity and reproduction of *M. incognita*. The neutral lipids also correlated with lipid index, lipid weight and to infectivity and reproduction of *M. exigua*. *Meloidogyne incognita* and *M. exigua* J2 stored for six days lost more than 50% of the neutral lipid content. This level of lipid content and time of storage represent the threshold for tomato infectivity, whereas for reproduction the threshold was three days of storage. The results of this study will contribute to the better understanding of the role of body energy reserve in J2 of *Meloidogyne* spp. in their life cycle on roots of host plants.

* Guidance Committee: Vicente Paulo Campos – UFLA (Major Professor), Ricardo Magela de Souza-UFLA and Edson Ampélio Pozza-UFLA

INTRODUÇÃO GERAL

A evolução populacional de nematóides no solo varia em função do ambiente, dos fatores bióticos e abióticos, além das interações com o hospedeiro, os quais afetam o desenvolvimento embrionário, eclosão, migração e infectividade no hospedeiro (Campos & Campos, 2005; Evans, 1987; Prot & Van Gundy, 1981a; Van Gundy, 1985). Dos fatores ambientais, a temperatura e umidade estão entre os mais importantes, alterando os processos de eclosão e reprodução de *Meloidogyne* spp. (Agrios, 2005; Campos et al., 2001; Goodell & Ferris, 1989).

No solo, a movimentação do juvenil do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne* spp. em direção ao local de penetração ocorre, entre outros fatores, em resposta à atração por substâncias exsudadas pela raiz (Endo, 1975; Griffin & Waite, 1971; Young, 1992; Zhao et al., 2000). Para isso, o J2 traz consigo 30% de seu peso corporal em lipídios, constituindo-se a principal fonte energética para os gastos no processo de penetração e parasitismo do hospedeiro (Lee & Atkinson, 1977). A perda dessas reservas reduz a infectividade e a reprodução (Campos, 2003; Christophers et al., 1997; Reversat, 1981; Robinson et al., 1987), podendo levar até mesmo à morte. Van Gundy et al. (1967) verificaram perda na infectividade relacionada com redução de 50 a 60% das reservas energéticas lipídicas de J2 de *M. javanica*. A distância que o J2 de *Meloidogyne* percorre em direção à raiz e os fatores que afetam sua migração e penetração têm sido relatados por vários autores (Bird, 1959; Herman et al., 1991; Lavalley & Rohde, 1962; Prot, 1978; Prot, 1980; Prot & Van Gundy, 1981a; Prot & Van Gundy, 1981b; Van Gundy et al., 1967; Virglierchio, 1961; Wallace, 1958a; Wallace, 1971). Entretanto, alguns detalhes deste processo relacionados ao lipídio corporal e a infectividade necessitam ser investigados.

Na rizosfera, *Meloidogyne* spp. tem muitos inimigos, alguns deles com grande capacidade para o controle biológico (Barron, 1977; Campos, 1992; Mankau, 1980; Souza & Campos, 1997). Dentre eles, estão as bactérias do gênero *Pasteuria*, que produzem endósporos de grande persistência no solo, já que resistem à dessecação e a temperaturas extremas, além de sua habilidade em reduzir a penetração de J2 nas raízes e impedir ou reduzir drasticamente a produção de ovos por fêmeas (Davies et al., 1991; Oostendorp et al., 1991; Stirling, 1984). Os endósporos de *Pasteuria* sp. aderem-se prontamente à cutícula do nematóide hospedeiro, quando este se movimenta no solo na direção das raízes (Mankau, 1980), estabelecendo assim o primeiro passo para o parasitismo no nematóide. A supressão natural de *Meloidogyne* spp. por *P. penetrans* está associada a solos com grandes proporções de J2 com endósporos aderidos ao seu corpo (Mankau, 1980; Stirling & White, 1982).

A penetração desses nematóides na planta está relacionada, entre outros fatores, à concentração da bactéria no solo (Brown & Smart, 1984; Davies et al., 1991; Mateille et al., 1996a; Stirling, 1981) e ao número de endósporos aderidos à cutícula dos J2 (Davies et al., 1991; Gomes et al., 2002). Por ser um parasita obrigatório, a eficiência de *P. penetrans* em se reproduzir no nematóide depende do sucesso de penetração e desenvolvimento no hospedeiro suscetível. Contudo, as condições ambientais, o tempo de permanência no solo e a distância que o nematóide precisa percorrer em direção à raiz vão determinar o gasto de suas reservas lipídicas (Bergerson, 1959; Christophers et al., 1997), podendo interferir na infectividade do J2 parasitado por *P. penetrans*. A grande maioria dos trabalhos aborda a dinâmica entre o nível de inóculo de *P. penetrans* e a infecção do nematóide hospedeiro, porém a correlação entre o nível lipídico do J2 com *P. penetrans* e o sucesso no parasitismo e reprodução da bactéria ainda não foi estudada.

A quantificação de fitonematóides para diversos estudos nematológicos tem sido realizada usando-se o processo de coloração do nematóide no interior da raiz com fucsina ácida e das massas de ovos com floxina B (Dutra & Campos, 2003a; Gourd et al., 1993; Gomes et al., 2002; Herman et al., 1991). Esses produtos químicos empregados na coloração de nematóides trazem risco à saúde humana e o descarte inadequado de raízes coloridas traz danos ao meio ambiente (Byrd et al., 1983; Fenner, 1962; Holbrook et al., 1983; McBeth et al., 1941). Byrd et al. (1983) desenvolveram modificações no método de coloração do nematóide no interior da raiz, porém, eliminaram apenas o uso do lactofenol, mas não da fucsina ácida. Thies et al. (2002) desenvolveram um método seguro para coloração de massas de ovos e de nematóides na raiz, substituindo a fucsina ácida e floxina B por um corante alimentício (McCormick Schilling red food color®). Embora o método de coloração que usa corante alimentício seja eficiente, existem dificuldades na compra desse produto no comércio.

Dessa forma, objetivou-se, neste trabalho, estudar: a) a influência da distância do sistema radicular de plantas hospedeiras e do período de armazenamento de J2 de *M. incognita* e *M. exigua* na migração, penetração, infectividade e reprodução em tomateiro; b) a flutuação populacional de J2 de *M. exigua* e o seu percentual de lipídios neutros em uma área naturalmente infestada; c) o efeito do armazenamento de J2 de *M. incognita* com endósporos de *Pasteuria penetrans* aderidos à cutícula na reprodução da bactéria; d) a relação do armazenamento de J2 infestados ou não com *P. penetrans* com o lipídio corporal e infectividade na planta; e) a eficácia de corantes artificiais utilizados no preparo de sucos alimentícios na coloração de massas de ovos, ovos, juvenis e fêmeas de *M. incognita* no interior da raiz; f) o aspecto da migração de *M. incognita* e da hospedabilidade de cultivares de tomateiro a *M. exigua* e g) a correlação entre os processos utilizados na avaliação do teor lipídico de J2 de *M. exigua* e *M. incognita* e sua infectividade e reprodução.

REFERENCIAL TEÓRICO

Métodos de coloração de fitonematóides

A coloração de nematóides é uma prática rotineira em todos os laboratórios de nematologia de plantas. O contraste na visualização de fitonematóides no interior da raiz é essencial para muitas pesquisas nematológicas, incluindo avaliações de resistência de plantas hospedeiras, elucidações do desenvolvimento e ciclo de vida, eficácia do controle biológico, estudo de produtos nematicidas e de sobrevivência (Alves & Campos, 2001; Chen & Dickson, 2000; Costa et al., 2001; Dutra & Campos, 2003b; Rocha & Campos, 2003; Rocha & Campos, 2004; Serracin, et al., 1997).

Para detectar fitonematóides no interior da raiz, McBeth et al. (1941) desenvolveram um processo envolvendo o clareamento do tecido com lactofenol e coloração do nematóide com fucsina ácida. Este método por requerer o uso de produto tóxico, o fenol, Byrd et al. (1983) realizaram modificações do método utilizando para o clareamento do tecido a combinação de componentes como hipoclorito de sódio (NaOCl) ou água oxigenada (H₂O₂), seguido da coloração do nematóide com fucsina ácida, eliminando assim o lactofenol.

A resistência de plantas a fitonematóides é definida como a redução ou inibição da reprodução do nematóide (Rohde, 1972; Taylor & Sasser, 1978). Assim, a quantificação das massas de ovos tem sido utilizada para avaliar a reprodução de *Meloidogyne* spp. (Fassuliotis, 1979; Holbrook et al., 1983). Para isto, as raízes devem ser lavadas em água parada e imersas em solução corante de floxina B a 0,0015% por 15-20 minutos (Taylor & Sasser, 1978). Silva et al. (1988) realizaram a coloração das massas de ovos utilizando como corante a fucsina ácida, obtendo bons resultados. Thies et al. (2002) desenvolveram um método de coloração em substituição à floxina B e fucsina ácida. Segundo os

autores, o corante para carnes, McCormick Schilling red food color®, colore eficazmente massas de ovos de *M. incognita* e outros estádios de desenvolvimento do nematóide no interior da raiz de pimentão (*Capsicum annuum* L.), em comparação com floxina B e fucsina ácida. Apesar da eficácia do corante testado por Thies et al. (2002), é difícil obtê-lo no mercado brasileiro.

A sobrevivência do nematóide normalmente baseia-se na movimentação espontânea ou induzida (Chen & Dickson, 2000; Costa et al., 2001; Rocha & Campos, 2004). Na maioria dos casos, o movimento é um bom método para avaliar a sobrevivência do nematóide. Entretanto, nematóides expostos a condições de estresse subletal perdem o movimento, apesar de ainda estarem viáveis (Van Gundy, 1965; Zuckermann, 1971). Heald & Robinson (1987) observaram que juvenis de *Rotylenchulus reniformis* expostos a altas temperaturas requerem 10 dias para retornarem à mobilidade. Similarmente, a mobilidade do nematóide pode ser inibida pela exposição em doses subletais dos nematicidas phenamifos e Aldicarbe (Marban-Mendoza & Viglierchio, 1980; Rocha & Campos, 2003). Outros métodos de avaliação da sobrevivência incluem o uso de corantes (Chadhouri et al., 1966; Jatala, 1975; Ogiga & Estey, 1974; Shepard, 1962), indução enzimática fluorescente (Bird, 1979) e autofluorescência (Forge & MacGuidwin, 1989). Dentre os corantes mais usados podem-se citar o iodide, acridine orange, chrysoïdin, new blue R, floxina B, meldola blue, eosin-y, azul do nilo A, e KMnO_4 (permanganato de potássio) (Cairns, 1960; Hooper, 1986). Ogiga & Estey (1974) avaliaram esses diferentes corantes para separação dos nematóides vivos dos mortos e verificaram que o azul do nilo a 0,1% foi mais eficiente que os demais corantes. A metodologia de separação dos nematóides vivos dos mortos consiste em adicionar 0,2 mL do corante azul do nilo 0,1% em 4 mL de suspensão contendo os nematóides, deixando em repouso por 24 horas. Após esse tempo, observam-se em microscópio ótico, os nematóides vivos (coloração normal ou levemente

azulada) e mortos (cor azul intensa). Os corantes vitais requerem certa permeabilidade da cutícula e, portanto, são dependentes da natureza do evento que causou a morte do nematóide, da espécie e do tempo de sua morte (Chen & Dickson, 2000). A avaliação por autofluorescência não depende da permeabilidade da cutícula, mas exige microscópio equipado com iluminação epifluorescente. Devido à diversidade de respostas dos nematóides às condições adversas do ambiente, este método não é recomendado como procedimento de rotina para avaliar a sobrevivência de nematóides. A escolha do método deve ser baseada na avaliação cuidadosa da fisiologia, histórico da espécie e o tipo de condição adversa estudada.

A principal fonte de energia do J2 no exercício de suas funções vitais e para parasitar o hospedeiro é lipídica (Christophers et al., 1997; Lee & Atkinson, 1977; Storey, 1983). Utilizando o corante “Oil Red O”, Christophers et al. (1997) coloriram de vermelho todo o corpo de J2 de *M. incognita* e correlacionaram a área colorida com a infectividade. De forma semelhante, Storey (1984) empregou o mesmo corante para estimar a concentração de lipídios neutros em J2 de *Globodera pallida* e *G. rostochiensis* em microdensitômetro. Campos (2003) estudando a infectividade de J2 de *M. javanica* armazenados por diferentes períodos, verificou que o corante “Oil Red O” coloriu, no máximo, 85,55% do corpo dos J2 recentemente eclodidos, indicando a possibilidade do lipídio neutro inexistir ou não ocorrer em concentração elevada em certas partes do corpo do nematóide. O corante “Oil Red O” reage com o lipídios neutros dos nematóides produzindo coloração vermelha, conforme demonstrações de Storey (1983) e Christophers et al. (1997). Entretanto, os órgãos aparentemente sem lipídio podem obter energia por meio de outras fontes como glicogênio e trealose (Lee & Atkinson, 1977; Qiu & Bedding, 2000).

Efeito do tempo de armazenamento de juvenis do segundo estágio na perda das reservas energéticas e na infectividade e reprodução

Os J2 de *M. javanica* após eclosão possuem 30% do seu peso corporal em lipídios, como fonte de reserva energética, a qual é utilizada no processo de migração e parasitismo na planta (Lee & Atkinson, 1977). O consumo dessa energia ocorre de acordo com a temperatura, umidade, taxa de oxigenação e outros fatores (Van Gundy et al., 1967). Em condições de aerobiose, os J2 infectivos de *M. javanica* e *Tylenchulus semipenetrans* utilizam suas reservas lipídicas rapidamente a 27°C, mas conservam o lipídio a 5°C ou com a redução da oxigenação entre 2 a 3% (Van Gundy et al., 1967). O consumo das reservas de lipídios de J2 de *M. javanica* foi estimado em 60%, após 10 dias de armazenamento a 27°C (Van Gundy et al., 1967), 65% após 7 dias a 28°C (Reversat et al., 1980) e 65% após 14 dias em meio líquido a 28°C (Reversat et al., 1981). Story (1984) verificou que o armazenamento de J2 de *Globodera rostochiensis* e *G. pallida* em água, a 28°C, por 36 ± 4 dias, proporcionou perda de 50% de suas reservas corporais. Robinson et al. (1987) observaram redução significativa na mobilidade e na infectividade de J2 de *Globodera rostochiensis* e *G. pallida* após perdas superiores a 65% do lipídio original e que os J2 de *G. rostochiensis* perdem mais rapidamente suas reservas lipídicas que *G. pallida*. Essa heterogeneidade pode indicar diferenças entre o metabolismo dos J2 dentro da população podendo levar alguma invasão tardia ao hospedeiro, assegurando, desta forma, redução na competição intra-específica (Storey, 1984). Essa diferença entre os J2 pode estar relacionada à base genética, até mesmo dentro de um único cisto, uma vez que mais de um macho pode fertilizar uma única fêmea (Green et al., 1970).

O tempo de armazenamento do J2, aliado às condições do ambiente, é determinante na manutenção dessa reserva e na infectividade (Christophers et

al., 1997; Van Gundy et al., 1967). Campos (2003) verificou perda de 38,82 e 56,12% no lipídio corporal de J2 de *M. javanica* a partir do segundo e quarto dia de armazenamento dos J2 em água parada a 28°C, respectivamente, o que refletiu em redução de 44,64% na produção de ovos e 73,68% no número de fêmeas, respectivamente. Reversat et al. (1981) encontraram 46% de infectividade quando os J2 de *M. javanica* foram estocados, por uma semana, em meio de fosfato de sódio diluído. Entretanto, com a estocagem dos J2 de *M. incognita* em água a 28°C, por 2 dias, Freire et al. (2007) encontraram aproximadamente 42% de infectividade expressa em galhas por sistema radicular de tomateiro em relação à testemunha e chegou a 0,3% após 6 dias de estocagem. Van Gundy et al. (1967) verificaram que o armazenamento de J2 de *M. incognita* a 25°C, por 16 dias, causou perda de 94,67% no teor de lipídios neutros, o que resultou na perda de 72,53 e 62,07% da mobilidade e infectividade, respectivamente.

A sobrevivência do nematóide é maior em solo do que em água e está associada com a retenção de reservas do corpo. Observa-se que a mobilidade e a capacidade de infestação *in vitro* são independentes, até a perda de 50-60% das reservas energéticas (Van Gundy et al., 1967). Bergeson (1959) verificou que alguns J2 de *M. incognita* sobreviveram e foram infectivos em solo mantido a 10°C, talvez pela redução no seu metabolismo e que entre 10 e 15,6°C a atividade desses J2 e a utilização de suas reservas aumentaram, diminuindo em 50% a sua sobrevivência. No entanto, em substrato com baixa umidade e altas temperaturas, o conteúdo das reservas corporais é rapidamente perdido, reciprocamente, o teor de lipídio é conservado em baixas temperaturas, solo úmido e baixa concentração de oxigênio (Van Gundy et al., 1967). Robinson et al. (1987) verificaram redução da mobilidade e perda de 50% do lipídio corporal após 6,7 a 10,9 dias do armazenamento dos J2 de *G. rostochieinsis* em areia úmida. Freire et al. (2007) verificaram que a infectividade em tomateiros dos J2

de *M. incognita* estocados no solo neossolo quartzarênico de textura arenosa decresceu significativamente, a 28°C, durante 6 dias, chegando a aproximadamente, 98% de redução a partir de 4 dias de estocagem.

Mecanismo de orientação, natureza química e fontes atrativas e repelentes de fitonematóides

Os principais órgãos sensoriais dos nematóides são as papilas labiais e os anfídios, localizados na região labial. Somam-se a eles o hemizonídio, localizado na região esofagiana e os fasmídeos na cauda ou próximo dela (Ferraz & Monteiro, 1995; Perry & Aumann, 1998; Wright, 1981). A principal concentração de sensilas ocorre na região cefálica do nematóide (Perry & Aumann, 1998; Wang & Chen, 1985). Além dos órgãos sensoriais, os carboidratos na superfície da cutícula dos nematóides exercem um papel crucial na interação específica entre o nematóide e seu hospedeiro (Zuckermann & Jonsson, 1984). Uma maior concentração de carboidratos na superfície da cutícula sugere um aumento na percepção do sinal molecular do químico atrativo pelo receptor. Os tipos de resíduos de carboidratos e sua distribuição ao longo do corpo dos nematóides são diferentes entre as espécies, indicando especificidade a sinais químicos atrativos (Zuckerman, 1983).

Existem dois tipos de receptores: os quimiorreceptores, ligados à membrana do neurônio, e os receptores de superfície, ambos contendo carboidratos (Jonsson, 1987). A ligação do químico atrativo à terminação do carboidrato do receptor da glicoproteína resulta em interação normal de quimiotactismo, podendo essa interação ser bloqueada pela ação de lectinas que se ligam ao terminal do carboidrato ou inibir completamente o quimiotactismo pela ação de enzimas hidrolíticas (Jonsson, 1987). No nematóide, após o recebimento de estímulo químico externo pelo órgão sensorial, as moléculas

interagem com as células vizinhas e destas até as células nervosas, chegando ao sistema nervoso central, onde a resposta é processada e transformada em uma ação comportamental (Jonsson, 1987).

O mecanismo da fisiologia sensorial iniciado pelo ambiente externo, principalmente pelas quimiosensilas, é organizado na seguinte seqüência temporal: eventos de pré-interação, evento receptor, eventos de pós-interação, transdução e transmissão (Perry & Aumann, 1998). A fase inicial de pré-interação inclui eventos de sinais do ambiente externo através de secreções das sensilas para a membrana de células nervosas do receptor sensorial. As secreções que preenchem a cavidade do receptor sensorial das quimiosensilas formam uma camada protetora na terminação dos dendritos dos nervos sensoriais das células contra dessecação e ataque de microrganismos. O mecanismo de transmissão sensorial do sinal se inicia com a ativação da proteína G ligada ao receptor, a qual altera a atividade enzimática e catalisa a formação de mensageiros secundários. Os mensageiros secundários se ligam a canais de íons, resultando na abertura desses canais. Na sinapse, as moléculas neurotransmissoras se ligam a receptores específicos de células nervosas vizinhas (Aumann, 1993; Riddle et al., 1997- citado por Perry & Aumann, 1998).

Os movimentos laterais repetitivos com a parte anterior do nematóide indicam uma exploração do espaço, importante no papel de orientação. Estímulos alternados nas musculaturas dorsal e ventral durante o movimento serpentiforme em consequência da alternância sincronizada e lateral da parte anterior do nematóide, promovem a formação de meia onda (Croll, 1967). Além disso, a orientação por tactismo altera a atividade e a freqüência de movimentos, causando mudança de direção no caminhar do nematóide, reduzindo seus movimentos quando próximo da fonte de estímulo. A barreira física e os bolsões de ar que ocorrem em substrato heterogêneo podem confinar o nematóide e/ou a

substância atrativa (Perry & Aumann, 1998), aumentando o uso da reserva energética e reduzindo a patogenicidade. A difusão do estímulo no solo pode também ser perdida em partículas de argilas e de matéria orgânica por adsorção e absorção, pela degradação de microrganismos ou pela temperatura produzida por esses durante o metabolismo (Zuckerman et al., 1971). Dentre as fontes de estímulos a nematóides, apenas os químicos, temperatura, dióxido de carbono, vibração e estímulo tátil podem ser reconhecidos no solo (Green, 1971). Assim, as substâncias atrativas exsudadas pela raiz da planta hospedeira formam um gradiente de concentração na solução do solo, orientando a migração dos nematóides em direção à raiz (Lavalley & Rohde, 1962; Virglierchio, 1961). Prot (1980) demonstrou que os nematóides podem se orientar em direção às raízes, a uma distância de 75 cm ou mais, talvez usando CO₂ e temperatura como estímulo.

Viglierchio (1961) estudando a atração de *M. hapla* a centeio, colocou telas separando as raízes das seções onde foram colocados os nematóides, e verificou atração em solo e repelência em areia, sugerindo que os compostos atrativos dependem do balanço entre o estímulo atrativo e repelente. Resultado semelhante foi observado por Griffin (1969) em meio ágar-água com plantas de alfafa resistentes e suscetíveis a *M. hapla*. No entanto, Zhao et al. (2000) verificaram que, mesmo na presença de exsudato atrativo, a alta concentração das substâncias pode causar um efeito nulo, inibindo a movimentação dos J2 de *M. incognita* agregados próximos às raízes. Embora seja conhecido por muitos anos que os nematóides são atraídos por raízes de plantas hospedeiras suscetíveis (Griffin, 1969; Lavalley & Rohde, 1962; Silva et al., 1989) e exsudatos radiculares (Bird, 1959; Zhao et al., 2000), pouco se conhece sobre compostos derivados de plantas que podem produzir tais respostas e sua natureza química. Em alguns casos, exsudatos de plantas hospedeiras apresentam atividade repelente (Diez & Dusenbery, 1989). Por outro lado,

vários compostos com atividade nematicida foram identificados em plantas antagonistas, como α -terthienil (*Tagetes* spp.), glicosídeo dhurrin (*Sorghum bicolor*), allyl isotiocianato (*Brassica nigra*), thiarubrine C (*Rudbeckia hirta*), monocrotalina (*Crotalaria spectabilis*), linalool, α -tomatine, α -choconine, chaparrinone e allicin (*Allium sativum*), entre outros (Chitwood, 2002). Vários compostos químicos identificados em exsudatos radiculares (Rovira, 1969), talvez estejam associados à resposta sensorial dos nematóides. Em muitos casos, o fator químico atrativo, provavelmente são composto muito específico, como é o caso para o nematóide dos citros *Tylenchulus semipenetrans* (Zuckerman & Jonsson, 1984). Raízes de milho exsudam o ácido hidroxâmico cíclico (2,4-dihydroxy-7-methoxy-1,4-benzoxazin-3-one), atrativo a *Pratylenchus zeae* em concentrações observadas na raiz hospedeira (Chitwood, 2002). Bird (1959) estudando a atração de J2 de *M. javanica* e *M. hapla* às raízes de tomateiro, observou que o ácido glutâmico isolado do exsudato radicular do hospedeiro foi o fator químico responsável pela atração dos nematóides. Klingler (1965), observou, em teste *in vitro*, que certos aminoácidos e CO₂ excretados pelas raízes das plantas exerceram atração a fitonematóides.

Alguns sais benéficos para as plantas, como a amônia, podem ser tóxicos a organismos, devido ao efeito deletério sobre a membrana plasmática (Rush & Lyda, 1982). Oka & Pivonia (2002) estudando o uso da amônia no controle de *M. javanica*, observaram grande atividade nematicida de NH₄ e NH₂ em concentrações de 300 mg N/Kg, sendo NH₄OH altamente tóxico. Castro et al. (1990) observaram que os sais inorgânicos K⁺, Cs⁺, NH⁺, NO₃⁻, Cl⁻, Br⁻ e I⁻ são extremamente repelentes a J2 infectivos de *M. incognita*. Em baixa concentração, esses sais podem atuar como estímulo quimiotactico aos nematóides, como observado por vários autores (Abou-Setta & Duncan, 1998; Bird, 1959; Diez & Dusenbery, 1989; Hewlett et al., 1997; Riddle & Bird, 1985; Saux & Quénéhervé, 2002). A resposta comportamental do nematóide a

diferentes sais parece estar relacionada com a espécie, como constatado por Saux & Quénehervé (2002). De maneira geral, o que se constata é a preferência das espécies de nematóides pelo Cl^- , principalmente no caso de *T. semipenetrans*, Na^+ , K^+ e compostos à base de N e S (Abou-Setta & Duncan, 1998; Riddle & Bird, 1985; Saux & Quénehervé, 2002). A preferência por esses compostos talvez esteja relacionada à liberação pela planta. Huettel (1986) observou que os principais metabólicos produzidos pelas raízes contem K^+ , Na^+ e Cl^- , além de H^+ , HO^- , carboidratos, aminoácidos e ácidos orgânicos.

O fator atrativo que comanda a movimentação orientada do nematóide ao local preciso do parasitismo ainda é pouco esclarecido. Campos (2003) e Wyss et al. (1992) relatam que essa migração estaria relacionada às características morfológicas das células do tecido radicular, visto que a penetração dos J2 de *Meloidogyne* spp. ocorre na região da coifa, onde as paredes são mais finas e, em seguida, o J2 migra em direção ao cilindro central. Acredita-se que a endoderme com as estrias de Caspary suberificadas constituem em obstáculo intransponível para o nematóide. Diferentemente de *Meloidogyne* spp., os nematóides dos cistos penetram na região da raiz distante da meristemática e movimenta-se lateralmente, de forma intracelular, até alcançar o cilindro central (Campos, 2003).

Para migrar internamente no tecido, espécies de nematóides endoparasitas penetram usando métodos mecânicos e bioquímicos (Davis et al., 2004). O estilete em combinação com secreções da glândula esofagiana intermediam a penetração e migração através do tecido (Hussey & Grundler, 1998). Os fitonematóides possuem um arsenal de enzimas hidrolíticas para digestão dos polímeros da parede celular. Genes que codificam secreções enzimáticas para modificação da parede celular têm sido localizados nas células da glândula esofaseana do nematóide, incluindo enzimas que degradam os polissacarídeos (pectase, liase e poligalacturonases) que compõem a região da

lamela média entre as células da planta (Popeijus et al., 2000) e enzimas que degradam a celulose (endoglucanases) e hemicelulose (xylanase), componentes estruturais da parede celular (Davis et al., 2000; Hussey et al., 2002; Jasmer et al., 2003). Um fato interessante é que as enzimas que modificam a parede celular parecem ser ativadas apenas nas células da glândula subventral do nematóide. No caso dos nematóides dos cistos, as endoglucanases são ativadas apenas durante a migração do nematóide dentro da raiz (Davis et al., 2004; Goellner et al., 2001; Jasmer et al., 2003). As endoglucanases regulam na planta modificações no provável sítio de alimentação, incluindo as células especializadas (Goellner et al., 2001). A descoberta de um gene que codifica secreção homóloga da expansão da célula da planta (Cosgrove et al., 2002) é expressa na glândula subventral dos nematóides dos cistos (Davis et al., 2000), sugerindo um único mecanismo para o nematóide vencer a parede celular e migrar intracelularmente através do tecido da planta (Davis et al., 2004). Hutangura et al. (1999) sugeriram que os flavonóides poderiam estar relacionados como sinalizadores moleculares orientando os nematóides até o sítio de alimentação. Entretanto, plantas transgênicas de *Arabidopsis* que não produzem flavonóides apresentam taxa de infecção e desenvolvimento do nematóide a nível equivalente àquele apresentado pela planta controle (Burbulis et al., 1996). Os flavonóides, talvez, não sejam essenciais na interação parasitária tendo apenas um papel secundário.

O conhecimento da fisiologia dos órgãos sensoriais e das respostas comportamentais dos nematóides a estímulos químicos possibilita o surgimento de novas estratégias de controle de fitonematóides. O Aldicarbe é um exemplo do sucesso no controle de nematóides pela ação da molécula 2-metil-2-(dimetiltio)-propionaldeído-O-(metilcarbamoil) oxima responsável pela inibição da acetilcolinesterase no nematóide o que impede a movimentação do J2 para as

raízes, bem como a transmissão de estímulos nervosos, provocando distúrbios irreversíveis (Franco, 1992; Nelmes, 1970).

Fatores abióticos e bióticos que interferem na migração e penetração do juvenil do segundo estágio de *Meloidogyne* spp.

O ambiente em que vivem os nematóides sofre a influência, dentre outros fatores, da umidade, potencial osmótico, textura, aeração e temperatura, podendo afetar a atividade e sobrevivência dos J2 de *Meloidogyne* (Van Gundy, 1985). Assim, a reprodução dos fitonematóides não depende somente do hospedeiro, mas sim do sucesso da sua movimentação pelo solo, influenciada pelo tamanho dos poros entre as partículas e a espessura do filme de água existente nos espaços (Ferris & Ferris, 1998). Van Gundy (1985) verificou que a migração de J2 no solo diminui à medida que as frações de argila e silte aumentam na textura, não ocorrendo migrações em solos com mais do que 30% de argila, além de silte. Prot & Van Gundy (1981a) verificaram que o percentual de J2 de *M. incognita* hábeis em percorrer 20 cm até a raiz de tomateiro aumentou de zero para 31,5%, quando reduziram-se as frações de argila e de silte do solo, de 32,7 para 14%, demonstrando que a maior capacidade de migração de J2 de *M. incognita* está associada a solos arenosos. Os mesmos autores também observaram que não ocorreu migração dos J2 em areia silicatada. Porém, quando 5 ou 10% de argila foram misturadas a areia silicatada, respectivamente, 34 e 36% dos J2 migraram 20 cm. Isto sugere, segundo esses autores, que as partículas de argila ajudam na migração dos J2 a longas distâncias por absorverem e reterem exsudados radiculares ou produtos bacterianos, os quais formam um gradiente de concentração habilitando o nematóide a locomover-se até a raiz.

Os J2 movem-se entre os espaços das partículas de solo, onde estão as fases líquidas e gasosas, porém, quanto maior a fase líquida, menor é o nível de oxigênio. Portanto, sua boa atividade ocorre em solo com níveis de umidade entre 40 e 60% da capacidade de campo (Van Gundy, 1985).

A reserva energética do J2 infectivo, aliada à temperatura adequada e à compatibilidade com o hospedeiro, pode proporcionar maior rapidez na penetração e no estabelecimento do sítio de alimentação (Anwar & McKernry, 2000; Endo, 1971; Windham & Willians, 1994). A temperatura é um fator que tem proporcionado grande influência na capacidade de penetração de J2 de várias espécies de *Meloidogyne* (Gourd et al., 1993). Alta taxa de penetração de J2 de *M. javanica*, *M. incognita* e *M. arenaria*, após 48 horas da inoculação de plantas de soja, ocorreu em temperatura média de 25°C (Gourd et al., 1993; Herman et al., 1991; Pedrosa et al., 1996). Segundo Prot & Van Gundy (1981b) a temperatura entre 18 e 22°C proporcionou melhor migração de *M. incognita*. Campos (2003) observou maior penetração de J2 de *M. javanica* em raiz de soja a $27 \pm 2^\circ\text{C}$, após 72 horas da inoculação.

A textura do solo e o tamanho dos poros influenciam a migração dos nematóides (Prot & Van Gundy, 1981a). Wallace (1958a, 1958b) sugeriu que existe um tamanho ótimo de partícula para o movimento de cada espécie de nematóide no solo. De fato, Prot & Van Gundy (1981a) estudando a migração vertical de quatro populações de *Meloidogyne*, verificaram que 50% dos J2 de *M. incognita* percorreram 50 cm e penetraram na raiz de tomateiro em 9 dias, enquanto na população de *M. javanica* e *M. arenaria*, ocorreu redução de 15% na penetração. Em outro estudo, Prot (1977) verificou que as percentagens de J2 de *M. javanica* capazes de migrar verticalmente 25, 50 e 75 cm de distância da raiz de tomateiro, aos 9 dias, foram de 66, 50 e 25%, respectivamente. Prot & Van Gundy (1981b) verificaram que, aproximadamente, 33% dos J2 de *M. incognita* migraram verticalmente 20 cm em 7 dias, quando colocados sob 12

horas de luz e 12 horas de escuro, enquanto apenas 7% migraram quando a luz foi constante durante 24 horas.

Efeito de fatores abióticos e bióticos na adesão de *Pasteuria penetrans*

A adesão dos endósporos de *Pasteuria* sp. em J2 é um processo físico-químico que ocorre no solo quando o nematóide, em sua fase suscetível, entra em contato com os endósporos imóveis da bactéria (Chen & Dickson, 1998). Entretanto, a adesão não é garantia de infecção. Para que ocorra o parasitismo, deve-se garantir uma adesão de, no mínimo, 5 endósporos ao nematóide hospedeiro, uma vez que somente 20 a 30% deles são capazes de germinar (Sayre & Wergin, 1977; Stirling, 1984). No entanto, os J2 com 3 ou 5 endósporos resultam num índice de 90% ou 40%, conforme resultados de Stirling (1984) e Rao et al. (1997), respectivamente, contrariando o esperado de 100%, já que, com 5 endósporos/J2, todas as fêmeas estariam, presumivelmente, infectadas. Isto é devido, talvez, ao fato de que nem todos os J2 contendo endósporos seriam capazes de penetrar no sistema radicular (Rao et al., 1997) ou, então, pelo desprendimento dos endósporos com o movimento dos nematóides no solo (Ratnasoma et al., 1991).

Vários fatores abióticos podem interferir no processo de adesão do endósporo ao nematóide (Campos et al., 1998). Segundo Stirling (1991), a adesão dos endósporos pode ser afetada pela textura, estrutura e matéria orgânica. Maximiniano et al. (2001b) e Spaul (1984) observaram maior número de endósporos aderidos aos J2 em solos arenosos do que em solos argilosos. Por outro lado, solos arenosos favorecem a percolação dos endósporos (Oostendorp et al., 1990), podendo causar perda de até 67,7% (Mateille et al., 1996b). Outro fenômeno que pode influenciar a perda dos endósporos no solo, uma vez que sua superfície é de cargas negativas, é a adsorção desses pelas partículas de argila

por meio de pontes catiônicas com Ca^{2+} ou Mg^{2+} (Mateille et al., 1996b; Souza, 1997).

O ciclo de *P. penetrans* e seu hospedeiro são altamente dependentes da temperatura do solo (Campos et al., 1998; Stirling 1981). O comprimento do ciclo de vida de *P. penetrans* é reduzido em cerca de 70%, a 30°C, comparado com aquele em 20°C (Stirling, 1981). Souza (1997) verificou que a morte do J2 de *M. javanica* e *M. incognita*, por meio do tratamento térmico a 60°C, por 5 minutos, reduziu drasticamente a adesão de endósporos à cutícula. Freitas et al. (1997) relataram baixa adesão do endósporo de *P. penetrans* em J2, a 60°C ou à temperatura superior a esta, sugerindo que altas temperaturas promovem a solubilização ou a desnaturação no endósporo do sítio de reconhecimento da proteína da cutícula do nematóide. Altos regimes de umidade, por sua vez, reduzem o número de fêmeas e a taxa de desenvolvimento de *Pasteuria* sp. (Davies et al., 1991). A superfície dos endósporos possui uma rede de cargas negativas (Afolabi et al., 1995), o que os tornam dependentes do pH da solução do solo. Ratnasoma & Gowen (1996) verificaram maior adesão dos endósporos em pH 5,0, enquanto O'Brien (1980) não encontrou diferença na taxa de adesão entre pH 4,5 a 8,5. Maximiniano et al. (2001c) observaram que a densidade de endósporos nos J2 aumentou com o aumento do pH, estabilizando entre os níveis 5,5 e 6,5.

A natureza química da cutícula do J2 é de fundamental importância para que ocorra a adesão dos endósporos de *Pasteuria* sp. em J2 de *Meloidogyne* sp. Portanto, qualquer mudança na cutícula pode afetar o processo de adesão. Spiegel et al. (1996) verificaram que o pré-tratamento dos J2 de *M. javanica* com o detergente dodecil sulfato de sódio, lectinas concavalina A e aglutamina do germe do trigo reduziram a adesão dos endósporos à cutícula dos J2. Outras substâncias, como enzimas (quitinase, muramidase, proteinase K, pepsina A, lipase, hialuronidase, α -glucosidase, celulase), ácido siálico e açúcares (fucose

ou α -metil manosídeo, N-acetil-D-glucosamine, D-xilose), quando empregadas na incubação do J2 de *Meloidogyne* sp., diminuíram a adesão dos endósporos de *P. penetrans* (Davies & Danks, 1993; Maximiniano et al., 2001a; Spiegel et al., 1996; Stirling et al., 1986). Ratnasoma et al. (1991) testaram o efeito da pectinase no desprendimento de endósporos aderidos em J2 de *M. javanica*, durante 24 horas e verificaram que cerca de 20% dos endósporos se desprenderam da cutícula. Segundo os autores, isso sugere que algum substrato, possivelmente alguma forma de carboidrato, que pode ser degradada pela pectinase esteja envolvida no processo de adesão.

A aderência do endósporo ao J2 de *Meloidogyne* spp. constitui o início do ciclo de vida da bactéria, além de propiciar a continuação desse ciclo através de gerações do nematóide. Por isso, vários outros aspectos desse processo de adesão têm sido investigados por muitos pesquisadores (Davies & Danks, 1993; Ratnasoma et al., 1991; Spiegel et al., 1996; Stirling et al., 1986). Maximiniano et al. (2001b) verificaram que solo argiloso e substrato de folhas moídas de *Crotalaria juncea* reduziram a adesão de endósporos de *P. penetrans* a J2 de *M. javanica*. Rocha & Campos (2000) e Maximiniano et al. (2001c) verificaram que filtrados fúngicos de *Arthrobotrys conoides* e *Paecilomyces lilacinus* e de rizobactérias antagônicas a *Meloidogyne* spp. reduziram a adesão do endósporo de *P. penetrans* em *M. incognita* e *M. javanica*, respectivamente. Freitas et al. (2000) observaram que a incorporação de folhas de repolho ao solo, seguido de incubação, a 50°C, por 10 dias, afetaram a formação de endósporos no interior da fêmea de *M. arenaria*. Freitas et al. (2000) observaram inibição à formação dos endósporos de *P. penetrans*, com nematicidas à base de cloropicrina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOUT-SETTA, M. M.; DUNCAN, L. W. Attraction of *Tylenchulus semipenetrans* and *Meloidogyne javanica* to salts *in vitro*. **Nematopica**, Leiden, v. 28, n. 1, p. 49-59, June 1998.

AFOLABI, P.; DAVIES, K. G.; O'SHEA, P. S. The eletrostatic nature of the spore of *Pasteuria penetrans*, the bacterial parasite of root-knot nematodes. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 79, n. 3, p. 244-249, Sept. 1995.

AGRIOS, G. N. Plant disease caused by nematodes. In: _____. **Plant pathology**. 5. ed. San Diego, California: Academic Press, 2005. p. 826-872.

ALVES, F. R.; CAMPOS, V. P. Efeito do aquecimento do solo na resistência de plantas a *Meloidogyne javanica* e *Meloidogyne incognita* raça 3. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v. 25, n. 2, p. 153-162, 2001.

ANWAR, S. A.; McKENRY, M. V. Penetration, development and reproduction of *Meloidogyne arenaria* on two new resitants *Vitis* spp. **Nematopica**, Auburn, v. 30, n. 1, p. 9-17, June 2000.

AUMANN, J. Chemosensory physiology of nematodes. **Fundamental and Applied Nematology**, Paris, v. 16, n. 3, p. 193-198, 1993.

BARRON, S. L. **The nematode-destroying fungi**. Canada: Canadian Biological Publications, 1977. 140 p.

BERGESON, G. B. The influence of temperature on the survival of some species of the genus *Meloidogyne*, in the absence of a host. **Nematologica**, Leiden, v. 4, p. 344-354, 1959.

BIRD, A. F. The attractiveness of roots to the plant parasitic nematodes *Meloidogyne javanica* and *M. hapla*. **Nematologica**, Leiden, v. 4, p. 322-335, 1959.

BIRD, A. F. A method distinguishing between living and dead nematodes by enzymatically induced fluorescence. **Journal of Nematology**, Lakeland, v. 11, n. 1, p. 103-105, Jan. 1979.

BROWN, S. M.; SMART, G. C. Attachment of *Bacillus penetrans* to *Meloidogyne incognita*. **Nematropica**, Auburn, v. 14, n. 2, p. 171-172, 1984.

BURBULIS, I. E.; LACOBUCCI, M.; SHIRLEY, B. W. A null mutation in the first enzyme of flavonoid biosynthesis does not affect male fertility in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, Rockville, v. 8, n. 6, p. 1013-1025, June 1996.

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

CAIRNS, E. J. Methods in nematology. A review. In: SASSER, J. N.; JENKINS, W. R. (Ed.). **Nematology, fundamentals and recent advances with emphasis on plant-parasitic and soil forms**. Chapel Hill, N. C. : University of North Carolina Press, 1960. p. 33-38.

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. Doutorado (Tese em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

CAMPOS, H. D.; CAMPOS, V. P. Estudos de inóculo, inoculação e de extração do nematóide de galhas (*Meloidogyne javanica*). **Nematologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 1, p. 75-82, 2005.

CAMPOS, V. P. Perspectivas do controle biológico de fitonematóides. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 16, n. 172, p. 23-26, 1992.

CAMPOS, V. P.; CAMPOS, J. R.; SILVA, L. H. C. P.; DUTRA, M. R. Manejo de nematóides em hortaliças. In: SILVA, L. H. C. P.; CAMPOS, J. R.; NOJOSA, G. B. A. **Manejo integrado: doenças e pragas em hortaliças**. Lavras: UFLA, 2001. p. 125-158.

CAMPOS, V. P.; SOUZA, J. T. de; SOUZA, R. M. de. Controle de fitonematóides por meio de bactérias. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 6, p. 285-327, 1998.

CASTRO, C. E.; BELSER, N. O.; MCKINNEY, H. E.; THOMASON, I. . J. Strong repellency of the root knot nematode, *Meloidogyne incognita* by specific inorganic ions. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 16, n. 4, p. 1199-1205, Apr. 1990.

CHADHOURI, N.; DICK, R. I.; ENGLEBRECHT, R. S.; AUSTIN, J. H. Staining of free-living nematodes by eosin-y dye. **Nematologica**, Leiden, v. 12, n. 2, p. 337-342, 1966.

CHEN, S. Y.; DICKSON, D. W. A technique for determining live second-stage juveniles of *Heterodera glycines*. **Journal of Nematology**, Lakeland, v. 32, n. 1, p. 117-121, Mar. 2000.

CHEN, Z. X.; DICKSON, D. W. Review of *Pasteuria penetrans*: Biology, Ecology, and Biological Control Potential. **Journal of Nematology**, Lakeland, v. 30, n. 3, p. 313-340. Sept. 1998.

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

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, Jan. 1997.

COSGROVE, D. J.; LI, L. C.; CHO, H. T.; HOFFMANN-BENNING, S.; MOORE, R.; BLECKER, D. The growing world of expansins. **Plant and Cell Physiology**, Paris, v. 43, n. 12, p. 1436-1444, Dec. 2002.

COSTA, M. J. N.; CAMPOS, V. P.; PFENNING, L. H.; OLIVEIRA, D. F. Toxicidade de filtrados fúngicos a *Meloidogyne incognita*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 4, p. 749-755, dez. 2001.

CROLL, N. A. The mechanism of orientation in nematodes. **Nematologica**, Leiden, v. 13, n. 1, p. 17-22, 1967.

DAVIES, K. G.; DANKS, C. Carbohydrate/protein interactions between the cuticle of infective juveniles of *Meloidogyne incognita* and spores of the obligate hyperparasite *Pasteuria penetrans*. **Nematologica**, Leiden, v. 39, n. 1, p. 53-64, Jan. 1993.

DAVIES, K. G.; LAIRD, V. E.; KERRY, B. R. The mobility, development and infection of *Meloidogyne incognita* encumbered with spores of the obligate hyperparasite *Pasteuria penetrans*. **Revue de Nématologie**, Montrouge Cedex, v. 14, n. 4, p. 611-618, Oct. 1991.

- DAVIS, E. L.; HUSSEY, R. S.; BAUM, T. J. Getting to the roots of parasitism by nematodes. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 20, n. 3, p. 134-141, Mar. 2004.
- DAVIS, E. L.; HUSSEY, R. S.; BAUM, T. J.; BAKKER, J.; SCHOTS, A.; ROSSO, M. N.; ABAD, P. Nematode parasitism genes. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 38, p. 365-396, 2000.
- DIEZ, J. A.; DUSENBERY, D. B. Repellent of root-knot nematodes from exudate of host roots. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 15, n. 10, p. 2445-2455, Oct. 1989.
- DUTRA, M. R.; CAMPOS, V. P. Efeito do manejo do solo e da água na população de *Meloidogyne javanica* (Treub, 1885) em quiabeiro em campo. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 29, n. 3, p. 249-254, jul./set. 2003a.
- DUTRA, M. R.; CAMPOS, V. P. Manejo do solo e da irrigação como nova tática de controle de *Meloidogyne incognita* em feijoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 6, p. 608-614, nov./dez. 2003b.
- ENDO, B. Y. Nematode-induced syncytia (giant cells). Host-parasite relationships of Heteroderidae. In: ZUCKERMAN, B. M.; MAI, W. F.; ROHDE, R. A. **Plant parasitic nematodes**. New York: Academic, 1971, v. 2, p. 91-117.
- ENDO, B. Y. Pathogenesis of nematode-infected plants. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 13, p. 213-238, 1975.
- EVANS, A. A. F. Diapause in nematodes as a survival strategy. In: VEECH, J. A.; DICKSON, D. W. (Ed.). **Vistas on Nematology**. Hyattsville, M. D. : Society of Nematologist, 1987. p. 180-187.
- FASSULIOTIS, G. Plant breeding for root-knot nematode resistance. In: LAMBERTI, F.; TAYLOR, C. E. (Ed.). **Root-knot nematode (*Meloidogyne* species) systematics, biology and control**. New York: Academic Press, 1979. 477 p.
- FENNER, L. M. Determination of nematode mortality. **Plant Disease Reporter**, St. Paul, v. 46, p. 383, 1962.

FERRAZ, L. C. C. B.; MONTEIRO, A. R. Nematóides. In: FILHO, A. B.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de fitopatologia**. 1995. v. 1, p. 168-201, 1995.

FERRIS, J. M.; FERRIS, V. R. Biology of plant-parasitic nematodes. In: BARKER, K. R.; PEDERSON, G. A.; WINDHAM, G. L. **Plant and nematode interactions**. Hardcover: American Society of Agronomy, 1998. p. 21-35.

FORGE, T. A.; MACGUIDWIN, A. E. Nematode autofluorescence and its use as an indicator of viability. **Journal of Nematology**, Lakeland, v. 21, n. 3, p. 399-403, July 1989.

FRANCO, J. F. Controle químico de fitonematóides. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 16, n. 172, p. 1-2 e 78-84, 1992.

FREITAS, L. G.; DICKSON, D. W.; MITCHELL, D. J.; HEWLETT, T. E. Infectivity and suppression of *Pasteuria penetrans* to *Meloidogyne arenaria* race 1 in tomato following soil fumigation. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 2, p. 157-166, 2000.

FREITAS, L. G.; MITCHELL, D. J.; DICKSON, D. W. Temperature effects on the attachment of *Pasteuria penetrans* endospores to *Meloidogyne arenaria* race 1. **Journal of Nematology**, Lakeland, v. 29, n. 4, p. 547-555, Dec. 1997.

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, 2007. (No prelo).

GOELLNER, M.; WANG, X.; DAVIS, E. L. Endo- β -1,4-glucanase expression in compatible plant-nematode interactions. **Plant Cell**, Rockville, v. 13, n. 10, p. 2241-2255, Oct. 2001.

GOMES, C. B.; FREITAS, L. G.; FERRAZ, S.; OLIVEIRA, R. D. L.; OSÓRIO, V. A. Efeito do número de endósporos de *Pasteuria penetrans* e do método de promoção da adesão sobre a penetração de *Meloidogyne javanica* e produção da bactéria em tomateiro. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 2, p. 119-130, 2002.

GOODELL, P. B.; FERRIS, H. Influence of environmental factors on the hatch and survival of *Meloidogyne incognita*. **Journal of Nematology**, Lakeland, v. 21, n. 3, p. 328-334, July 1989.

GOURD, T. R.; SCHMITT, D. P.; BARKER, K. R. Penetration rates of second-stage juveniles of *Meloidogyne* spp. and *Heterodera glycines* into soybean roots. **Journal of Nematology**, Raleigh, v. 25, n. 1, p. 38-41, Mar. 1993.

GREEN, C. D. Mating and host finding behaviour of plant nematodes. In : ZUCKERMAN, B. M., MAI, W. F.; ROHDE, R. A. (Ed.). **Plant parasitic nematodes**. vol. II: Cytogenetics, Host-parasite interaction and physiology. New York. Academic press, 1971. p. 247-266.

GREEN, C. D.; GREET, D. N.; JONES, F. G. W. The influence of multiple mating on the reproduction and genetics of *Heterodera rostochiensis* and *H. schachtii*. **Nematologica**, Leiden, v. 16, n. 2, p. 309-326, 1970.

GRIFFIN, G. D. Attractiveness of resistant and susceptible alfalfa to stem and root-knot nematodes. **Journal of Nematology**, Lakeland, v. 1, n. 1, p. 9, Jan. 1969.

GRIFFIN, G. D.; WAITE, W. W. Attraction of *Ditylenchus dipsaci* and *Meloidogyne hapla* by resistant and susceptible alfalfa seedling. **Journal of Nematology**, Lakeland, v. 3, n. 3, p. 215-219, July 1971.

HEALD, C. M.; ROBINSON, A. F. Effects of soil solarization on *Rotylenchulus reniformis* in the lower Rio Grande Valley of Texas. **Journal of Nematology**, Lakeland, v. 19, n. 1, p. 93-103, Jan. 1987.

HERMAN, M.; HUSSEY, R. S.; BOERMA, H. R. Penetration and development of *Meloidogyne incognita* on roots of resistant soybean genotypes. **Journal of Nematology**, Lake Alfred, v. 23, n. 2, p. 155-161, Arp. 1991.

HEWLETT, T. E.; HEWLETT, E. M., DICKSON, D. W. Response of *Meloidogyne* spp., *Heterodera glycines*, and *Radopholus similis* to tannic acid. **Journal of Nematology**, Lakeland, v. 29, n. 4, p. 742-745, Dec. 1997. Supplement.

HOLBROOK, C. C.; KNAUFT, D. A.; DICKSON, D. W. A technique for screening peanut for resistance to *Meloidogyne arenaria*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 67, n. 9, p. 957-958, Sept. 1983.

HOOPER, D. J. Handling, fixing, staining and mounting nematodes. In: SOUTHEY, J. F. (Ed.). **Laboratory methods for plant and soil nematodes**. London: Her Majesty's Stationery Office, 1986. p. 59-80.

HUETTEL, R. N. Chemical communication in nematodes. **Journal of Nematology**, Lakeland, v. 18, n. 1, p. 3-8, Jan. 1986.

HUSSEY, R. S.; DAVIS, E. L.; BAUM, T. J. Secrets in secretions: genes that control nematode parasitism of plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 14, n. 3, p. 183-194, Sept./Dec. 2002.

HUSSEY, R. S.; GRUNDLER, F. M. W. Nematode parasitism of plants. In: PERRY, R. N.; WRIGHT, D. J. (Ed.). **Physiology and biochemistry of free-living and plant-parasitic nematodes**. CAB International Press, 1998. p. 213-243.

HUTANGURA, P. U.; MATTHESIUS, M. G.; JONES, K.; ROLFE, B. G. Auxin induction is a trigger for root gall formation caused by root-knot nematodes in white clover and is associated with the activation of the flavonoid pathway. **Australian Journal of Plant Physiology**, Collingwood, v. 26, n. 3, p. 221-231, 1999.

JASMER, D. P.; GOVERSE, A.; SAMANT, G. Parasitic nematode interactions with mammals and plants. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 41, p. 245-270, 2003.

JATALA, P. Efficiency of potassium permanganate in differentiating between live and dead nematodes. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 80, n. 1, p. 109-113, 1975.

JONSSON, H. B. Receptors and recognition in nematodes. In: **Vistas on nematology**. 1987. Cap. 22. p. 153-158.

KLINGLER, J. On the orientation of plant nematodes and of some other soil animals. **Nematologica**, Leiden, v. 11, n. 1, p. 4-18, Jan. 1965.

LAVALLEE, W. H.; ROHDE, R. A. Attractiveness of plant roots to *Pratylenchus penetrans* (Cobb). **Nematologica**, Leiden, v. 8, p. 252-260, 1962.

LEE, D. L.; ATKINSON, H. J. **Physiology of nematodes**. New York: Columbia University Press, 1977. 215 p.

MANKAU, R. Biological control of nematodes pests by natural enemies. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 18, p. 415-440, 1980.

MARBAN-MENDOZA, N.; VIGLIERGIO, D. R. Behavioral effects of carbofuran and phenamiphos on *Pratylenchus vulnus*. I. Motility and dispersion. **Journal of Nematology**, Lakeland, v. 12, n. 2, p. 102-113, Apr. 1980.

MATEILLE, T.; DUPONNIS, R.; DABIRÉ, K.; N'DIAYES, S.; DIOP, M. T. Influence of abiotic soil factors and the host plant on the infection of phytoparasitic nematodes of the genus *Meloidogyne* by *Pasteuria penetrans*. **European Journal Soil Biology**, Paris, v. 32, n. 2, p. 81-83, 1996a.

MATEILLE, T.; DUPONNOIS, R.; DABIRÉ, K.; N'DIAYES, S.; DIOP, M. T. Influence of the soil on the transport of the spores of *Pasteuria penetrans*, parasite of nematodes of the genus *Meloidogyne*. **European Journal of Soil Biology**, Paris, v. 32, n. 2, p. 81-88. 1996b.

MAXIMINIANO, C.; CAMPOS, V. P.; SOUZA, R. M. de. Efeito de enzimas na adesão de endósporos e de raças de *Meloidogyne incognita* na infectividade de *Pasteuria penetrans*. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v. 25, n. 1, p. 27-34, 2001a.

MAXIMINIANO, C.; CAMPOS, V. P.; SOUZA, R. M. de. Efeito de solo argiloso e substratos orgânico e mineral na adesão de endósporos de *Pasteuria penetrans*. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v. 25, n. 1, p. 15-20, 2001b.

MAXIMINIANO, C.; CAMPOS, V. P.; SOUZA, R. M. de.; ALMEIDA, A. R. de. Efeito do pH e filtrados bacterianos na adesão de endósporos de *Pasteuria penetrans*. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v. 25, n. 1, p. 21-26, 2001c.

McBETH, C. W. A.; TAYLOR, A. L.; SMITH, A. L. Note on staining nematodes in root tissues. **Proceedings of the Helminthological Society of Washington**, Washington, v. 8, n. 1, p. 26, 1941.

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

O'BRIEN, P. C. Studies on parasitism of *Meloidogyne javanica* by *Bacillus penetrans*. **Journal of Nematology**, Lakeland, v. 12, n. 4, p. 234, Oct. 1980.

OGIGA, I. R.; ESTEY, R. H. The use of meldola blue and Nile blue A for distinguishing dead from living nematodes. **Nematologica**, Leiden, v. 20, n. 3, p. 217-276, 1974.

OKA, Y.; PIVONIA, S. Use of ammonia-releasing compounds for control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica*. **Nematology**, Leiden, v. 4, n. 1, p. 65-71, 2002.

OOSTENDORP, M.; DICKSON, D. W.; MITCHELL, D. J. Host range and ecology of isolates of *Pasteuria* spp. from the southeastern United States. **Journal of Nematology**, Lakeland, v. 22, n. 4, p. 525-531, Dec. 1990.

OOSTENDORP, M.; DICKSON, D. W.; MITCHELL, D. J. Population development of *Pasteuria penetrans* on *Meloidogyne arenaria*. **Journal of Nematology**, Lakeland, v. 23, n. 1, p. 58-64, Jan. 1991.

PEDROSA, E. M. R.; HUSSEY, R. S.; BOERMA, H. R. Penetration and post-infectious development and reproduction of *Meloidogyne arenaria* race 1 and 2 on susceptible and resistant soybean genotypes. **Journal of Nematology**, Lakeland, v. 28, n. 3, p. 343-351, Sept. 1996.

PERRY, R. N.; AUMANN, J. Behaviour and sensory responses. In: PERRY, R. N.; WRIGHT, D. J. **The physiology and biochemistry of free-living and plant-parasitic nematodes**. 1998. p. 75-269.

POPEIJUS, H.; OVERMARS, H.; JONES, J.; BLOK, V.; GOVERSE, A.; HELDER, J.; SCHOTS, A.; BAKKER, J.; SMART, G. Enzymology: degradation of plant cell walls by a nematode. **Nature**, London, v. 406, n. 6791, p. 36-37, July 2000.

PROT, J. C. Amplitude et cinétique des migrations du nématode *Meloidogyne javanica* sous l'influence d'un plant de tomate. **Cahiers Orstom - Série Biology**, Bondy Cedex, v. 11, p. 157-166, 1977.

PROT, J. C. Migration of plant-parasitic nematodes towards plant roots. **Revue de Nématologie**, Montrouge Cedex, v. 3, n. 2, p. 305-318, 1980.

PROT, J. C. Vertical migration of four natural populations of *Meloidogyne*. **Revue de Nématologie**, Montrouge Cedex, v. 1, p. 109-112, 1978.

PROT, J. C.; VAN GUNDY, S. D. Effect of soil texture and the clay component on migration of *Meloidogyne incognita* second-stage juveniles. **Journal of Nematology**, Lakeland, v. 13, n. 2, p. 213-217, Apr. 1981a.

PROT, J. C.; VAN GUNDY, S. D. Influence of photoperiod and temperature on migration of *Meloidogyne* juveniles. **Journal of Nematology**, Lakeland, v. 13, n. 2, p. 217-220, Apr. 1981b.

QIU, L.; BEDDING, R. A. Energy metabolism and survival of the infective juveniles of *Steinernema carpocapsae* under oxygen-deficient conditions. **Journal of Nematology**, Lakeland, v. 32, n. 3, p. 271-280, Sept. 2000.

RAO, M. S.; GOWEN, S. R.; PEMBROKE, B.; PARVATHA REDDY, P. Relationships of *Pasteuria penetrans* spore encumbrance on juveniles of *Meloidogyne incognita* and their infection in adults. **Nematologia Mediterranea**, Bari, v. 25, n. 1, p. 129-131, ging. 1997.

RATNASOMA, H. A.; GOWEN, S. R. Spore attachment of *Pasteuria penetrans* on juvenils of *Meloidogyne incognita* as affected by pH and organic matter. **Nematologia Mediterranea**, Bari, v. 24, n. 2, p. 283-285, dic. 1996.

RATNASOMA, H. A.; GOWEN, S. R.; HAGUE, N. G. M. Observations on the detachment of spores of *Pasteuria penetrans* from pre-parasitic second-stage juveniles of *Meloidogyne* spp. **Nematologia Mediterranea**, Bari, v. 19, n. 2, p. 225-227, dic. 1991.

REVERSAT, G. Consumption of food reserves by starved second-stage juveniles of *Meloidogyne javanica* under conditions inducing osmobiosis. **Nematologica**, Leiden, v. 27, n. 2, p. 207-214, 1981.

REVERSAT, G. Effect of vitro storage time on the physiology of second stage juveniles of *Heterodera oryzae*. **Revue de Nématologie**, Montrouge, v. 3, n. 2, p. 233-241, 1980.

RIDDLE, D. L.; BIRD, A. F. Responses of the plant parasitic nematodes *Rotylenchulus reniformis*, *Anguina agrostis* and *Meloidogyne javanica* to chemical attractants. **Parasitology**, New York, v. 91, p. 185-195, 1985.

ROBINSON, M. P.; ATKINSON, H. J.; PERRY, R. N. The influence of soil moisture and storage time on the motility, infectivity and lipid utilization of second stage juveniles of the potato cyst nematodes *Globodera rostochiensis* and *G. pallida*. **Revue de Nématologie**, Montrouge Cedex, v. 10, n. 3, p. 343-348, 1987.

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**, Brasília, v. 27, n. 2, p. 185-192, dez. 2003.

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

ROCHA, F. S.; CAMPOS, V. P. Efeito de filtrados fúngicos na adesão de endósporos de *Pasteuria penetrans* e na infectividade e parasitismo de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne incognita*. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v. 24, p. 239-244, 2000.

ROHDE, R. A. Expression of resistance in plants to nematodes. **Annual of Phytopathology**, Palo Alto, v. 10, p. 233-252, 1972.

ROVIRA, A. D. Plant root exudates. **The Botanical Review**, New York, v. 35, n. 1, p. 35-57, 1969.

RUSH, C. M.; LYDA, S. D. Effects of anhydrous ammonia on mycelium and sclerotia of *Phymatotricum omnivorum*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 72, n. 8, p. 1085-1089, Aug. 1982.

SAUX, R. L.; QUÉNÉHÉRVÉ, P. Differential chemotactic responses of two plant-parasitic nematodes, *Meloidogyne incognita* and *Rotylenchulus reniformis*, to some inorganic ions. **Nematology**, Leiden, v. 4, n. 1, p. 99-105, 2002.

SAYRE, R. M.; WERGIN, W. P. Bacterial parasite of plant nematode: morphology and ultrastructure. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 129, n. 2, p. 1091-1101, Feb. 1977.

SERRACIN, M.; SCHUERGER, A. C.; DICKSON, D. W.; WEINGARTNER, D. P. Temperature-dependent development of *Pasteuria penetrans* in *Meloidogyne arenaria*. **Journal of Nematology**, v. 29, n. 2, p. 228-238, Apr. 1997.

SHEPARD, A. M. New blue R, a stain that differentiates between living and dead nematodes. **Nematologica**, Leiden, v. 8, p. 201-207, 1962.

SILVA, G. S. da; FERRAZ, S.; SANTOS, J. M. Atração, penetração e desenvolvimento de larvas de *Meloidogyne javanica* em raízes de *Crotalaria* spp. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v. 13, p. 151-163, 1989.

SILVA, G. S. da; SANTOS, J. M. dos; FERRAZ, S. Novo método de coloração de ootecas de *Meloidogyne* sp. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATIOLOGIA, 12., 1988, Dourados, MS. **Resumos...** Dourados, MS, 1988. p. 7.

SOUZA, J. T. de. **Epidemiologia, infectividade e parasitismo de *Pasteuria* spp. em fitonematóides.** 1997. 123 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)- Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SOUZA, J. T. de; CAMPOS, V. P. Efeito do isolado P1-UFLA de *Pasteuria penetrans* sobre a primeira geração de *Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 2, p. 93-102, dez. 1997.

SPAULL, V. W. Observations on *Bacillus penetrans* infecting *Meloidogyne* in sugarcane fields in South Africa. **Revue de Nématologie**, Montrouge Cedex, v. 7, n. 3, p. 277-282, 1984.

SPIEGEL, Y.; MOR, M.; SHARON, E. Attachment of *Pasteuria penetrans* endospores to the surface of *Meloidogyne javanica* second-stage juveniles. **Journal of Nematology**, Lakeland, v. 28, n. 3, p. 328-334, Sept. 1996.

STIRLING, G. R. Biological control of *Meloidogyne javanica* with *Bacillus penetrans*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 74, n. 1, p. 55-60, Jan. 1984.

STIRLING, G. R. **Biological control of plant-parasitic nematodes:** progress, problems and prospects. Melksham: Redwood Press, 1991. 282 p

STIRLING, G. R. Effect of temperature on infection of *Meloidogyne javanica* by *Bacillus penetrans*. **Nematologica**, Leiden, v. 27, n. 4, p. 458-462, 1981.

STIRLING, G. R.; BIRD, A. F.; CAKURS, A. B. Attachment of *Pasteuria penetrans* spores to the cuticles of root-knot nematodes. **Revue de Nématologie**, Montrouge Cedex, v. 9, n. 3, p. 251-260, 1986.

STIRLING, G. R.; WHITE, A. M. Distribution of a parasite of root-knot nematodes in South Australia vineyards. **Plant Disease**, St. Paul, v. 66, n. 1, p. 52-53, Jan. 1982.

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

STOREY, R. M. J. The relationship between neutral lipid reserves and infectivity for hatched and dormant juveniles of *Globodera* spp. **Annual Applied Biology**, Warwick, v. 104, n. 3, p. 511-520, 1984.

TAYLOR, A. L.; SASSER, J. N. **Biology, identification and control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* species)**. Raleigh: North Carolina State University Graphics, 1978. 111 p.

THIES, J. A.; MERRILE, S. B.; CORLEY, E. L. Red food coloring stain: New, safer procedures for staining nematodes in roots and egg masses on root surfaces. **Journal of Nematology**, Lakeland, v. 34, n. 2, p. 179-181, June 2002.

VAN GUNDY, S. D. Ecology of *Meloidogyne* spp. - emphases on environmental factors affecting survival and pathogenicity. In: SASSER, J. N.; CARTER, C. C. **An advanced treatise on *Meloidogyne***. North Carolina: Raleigh, 1985. v. 1, p. 177-182.

VAN GUNDY, S. D. Factors in survival of nematodes. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 3, p. 43-68, 1965.

VAN GUNDY, S. D.; BIRD, A. F.; WALLACE, H. R. Aging and starvation in juvenile of *Meloidogyne javanica* and *Tylenchulus semipenetrans*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 57, n. 6, p. 559-571, June 1967.

VIRGLIERCHIO, D. R. Attraction of parasitic nematodes by plant root emanations. **Phytopathology**, St. Paul, v. 51, n. 2, p. 136-142, Feb. 1961.

WALLACE, H. R. Abiotic influence in the soil environment. In: ZUCKERMAN, B. M.; MAI, W. F.; ROHDE, R. A. **Plant parasitic nematodes**. New York: Academic, 1971. v. 1, p. 257-280.

WALLACE, H. R. Movement of eelworms. I. The influence of pore size and moisture content of the soil on the migration of larvae of the beet ellworm, *Heterodera schachtii* Schmidt. **Annual of Applied Biology**, Warnick, v. 46, n. 1, p. 74-85, 1958a.

WALLACE, H. R. Movement of eelworms. II. A comparative study of the movement in soil of *Heterodera schachtii* Schmidt and of *Ditylenchus dipsaci* (Kuhn) Filipjev. **Annual of Applied Biology**, Warnick, v. 46, n. 1, p. 86-94, 1958b.

WANG, K. C.; CHEN, T. A. Ultrastructure of the phasmids of *Scutellonema brachyurum*. **Journal of Nematology**, Lakeland, v. 17, n. 2, p. 175-186, 1985.

WINDHAM, G. L.; WILLIAMS, W. P. Penetration and development of *Meloidogyne incognita* in roots of resistant and susceptible corn genotypes. **Journal of Nematology**, Lakeland, v. 26, n. 1, p. 80-85, 1994.

WRIGHT, D. J. Nematicides: mode of action and new approaches to chemical control. In: ZUCKERMAN, B. M.; ROHDE, R. A. **Plant parasitic nematodes**. New York: Academic Press, 1981. v. 3. p. 421-449.

WYSS, U.; GRUNDLER, F. M. W.; MUNCH, A. The parasitic behaviour of second stage juveniles of *Meloidogyne incognita* in roots of *Arabidopsis thaliana*. **Nematologica**, Leiden, v. 38, n. 1, p. 98-111, Jan. 1992.

YOUNG, L. D. Epiphytology and life cycle. In: RIGGS, E. D.; WRATHER, J. A. (Ed.). **Biology and management of the soybean cyst nematode**. 1992. p. 27-36.

ZHAO, X.; SCHMITT, M.; HAWES, C. M. Species-dependent effects of border cell and root tip exudates on nematodes behavior. **Phytopathology**, St. Paul, v. 90, n. 11, p. 1239-1245, Nov. 2000.

ZUCKERMAN, B. M. Gnotobiology. In: ZUCKERMAN, B. M.; MAI, W. F.; ROHDE, R. A. **Plant parasitic nematodes**. New York: Academic Press, 1971. v. 2, p. 159-184.

ZUCKERMAN, B. M. Hypotheses and possibilities of intervention in nematode chemoresponses. **Journal of Nematology**, Lakeland, v. 15, n. 2, p. 173-182, Apr. 1983.

ZUCKERMAN, B. M.; JANSSON, H. B. Nematode chemotaxis and possible mechanisms of host/prey recognition. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 22, p. 95-113, 1984.

ARTIGO 1

Coloração de Fitonematóides com Corantes Usados na Indústria Alimentícia Brasileira*

(Preparado de acordo com as normas da revista “Nematologia Brasileira”)

FERNANDO DA SILVA ROCHA¹, MARIA DE FÁTIMA SILVA
MUNIZ² & VICENTE PAULO CAMPOS³

^{1,3} Universidade Federal de Lavras, UFLA, Departamento de Fitopatologia, C.P.
3037, CEP 37200-000, Lavras-MG. E-mail: rocha.fs@bol.com.br

² Universidade Federal de Alagoas, UFAL, Centro de Ciências Agrárias,
Departamento de Fitotecnia e Fitossanidade, CEP 57100-000, Rio Largo-AL.

Recebido para publicação em 20/02/2005. Aceito em 27/07/2005.

Resumo – Rocha, F.S.; M.F.S. Muniz & V.P. Campos. 2005. Coloração de fitonematóides com corantes usados na indústria alimentícia brasileira.

Objetivou-se, neste trabalho, avaliar a eficiência de corantes artificiais empregados na fabricação de sucos, na coloração de massas de ovos, ovos, juvenis e fêmeas de *Meloidogyne incognita*. Foram testadas as seguintes misturas de corantes artificiais: 1) bordeaux e tartrazina; 2) bordeaux e azul indigotina; 3) azul indigotina e vermelho bordeaux; 4) vermelho 40, azul indigotina, azul brilhante e dióxido de titânio; 5) amarelo crepúsculo; 6) tartrazina e amarelo crepúsculo, nas concentrações de 1, 2, 3 e 4% do produto comercial. Floxina B e fucsina ácida foram utilizadas como padrões de comparação da intensidade da coloração. A concentração de 1% do produto

* Trabalho publicado como comunicação científica na revista Nematologia Brasileira 29(2):293-297, 2005.

comercial apresentou melhor coloração. Apenas os corantes contendo bordeaux e vermelho bordeaux coloriram de vermelho as massas de ovos, na mesma intensidade da floxina B. Estes corantes e também bordeaux e azul indigotina coloriram de vermelho os ovos, juvenis e fêmeas no interior da raiz, na mesma intensidade que a fucsina ácida.

Palavras-chave: coloração de nematóides, nematóides das galhas, corantes de sucos artificiais, floxina B, fucsina ácida.

Summary - Rocha, F.S.; M.F.S. Muniz & V.P. Campos. 2005. Staining of plant-parasitic nematodes with stains used in the brazilian food industry.

The efficacy of dyes used in formulations of artificial powdered juices in staining egg mass, eggs, juveniles and females of *Meloidogyne incognita* was evaluated. The artificial dyes tested were: 1) bordeaux and tartrazine; 2) bordeaux and blue indigotin; 3) blue indigotin and red bordeaux; 4) red 40, blue indigotin, blue brilliant and titanium dioxide; 5) sunset yellow; 6) tartrazine and sunset yellow in the concentrations of 1, 2, 3 and 4% of the commercial product. Phloxine B and acid fuchsin were used as comparison with the artificial dyes for colour intensity. The best concentration of the powdered juices in water was 1%. Only the bordeaux and red bordeaux stained the egg masses red at the same intensity of phloxine B. Both these stains and blue indigotin stained red the eggs, juveniles and females inside the roots in the same intensity as acid fuchsin did.

Key words: staining nematodes, root-knot nematodes, artificial powdered juice, phloxine B, acid fuchsin.

Conteúdo

Vários trabalhos nematológicos têm sido desenvolvidos usando-se o processo de coloração de raízes (Gourd et al., 1993; Herman et al., 1991; Rocha & Campos, 2003; Salgado et al., 2003). Os métodos desenvolvidos até então empregam produtos químicos que trazem risco à saúde humana e liberam resíduos com possíveis danos ao meio ambiente (Byrd et al., 1983; Fenner, 1962; Holbrook et al., 1983; McBeth et al., 1941) principalmente aqueles que exigem uso de fenol. Byrd et al. (1983) desenvolveram modificações nesses métodos, porém, eliminaram apenas o uso do lactofenol, mas não da fucsina ácida, a qual pode causar irritação da pele, dos olhos, do trato respiratório, além

de poder causar cegueira e afetar o sistema nervoso central, fígado e rins (Jorgensen Laboratories, Inc. Loveland, CO. Acid Fast Stain Set, Kinyoun Carbol Fuchsin, Material Safety Data, 2004). O uso de floxina B em larga escala gera grandes volumes de resíduos nos laboratórios de Nematologia de Plantas, aumentando a preocupação dos pesquisadores em substituir tais corantes por outros de igual eficácia, porém, sem riscos à saúde humana e ao meio ambiente. Thies et al. (2002) desenvolveram um método seguro para coloração de massas de ovos e de nematóides na raiz, substituindo a fucsina ácida e floxina B por um corante alimentício (McCormick Schilling red food color®). Embora o método de coloração que usa corante alimentício seja eficiente, existem dificuldades na obtenção desse produto no comércio. Desta forma, objetivou-se avaliar a eficiência de corantes artificiais utilizados no preparo de sucos alimentícios na coloração de massas de ovos, ovos, juvenis e fêmeas de *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood no interior da raiz.

Mudas de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Kada), cultivadas em bandejas de isopor contendo substrato Plantmax®, foram inoculadas com 2.000 ovos de *M. incognita* e mantidas por 35 dias em casa-de-vegetação. Os sistemas radiculares dessas plantas foram lavados cuidadosamente em água parada para a remoção de resíduos do substrato aderido às raízes. Prepararam-se diluições em água de 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 g de cada produto comercial usado no preparo de sucos, obtendo-se concentrações de 1, 2, 3 e 4%, respectivamente. Foram testados os seguintes corantes: 1) bordeaux e tartrazina (Q.refresko® sabor morango); 2) bordeaux e azul indigotina (Q.refresko® sabor uva); 3) azul indigotina e vermelho bordeaux (Ki.Gostoso® sabor groselha); 4) vermelho 40, azul indigotina, azul brilhante e dióxido de titânio (Fresh® sabor uva); 5) amarelo crepúsculo (Q.refresko® sabor laranja); 6) tartrazina e amarelo crepúsculo (Q.refresko® sabor abacaxi). Para coloração das massas de ovos, o sistema radicular do tomateiro foi colocado em béquer de 500 mL com solução

do corante e deixado por 20 minutos. Em seguida, as raízes foram retiradas da solução e colocadas em água, por 15 minutos, para a remoção do excesso do corante. Logo após, foram deixadas sobre papel toalha por 10 minutos, para eliminar o excesso de água, possibilitando, assim, boa visualização das massas de ovos no sistema radicular.

Para o teste de coloração de ovos, estes foram obtidos a partir de raízes de tomateiros infectadas por *M. incognita* por meio da técnica de Hussey & Barker (1973). Em seguida, colocaram-se, aproximadamente, 3 g de caulim por tubo, realizando-se a limpeza dos ovos pela técnica de Coolen & D'Herde (1972). Os ovos retidos na peneira de 0,025 mm de abertura de malha foram recolhidos em béquer de 200 mL, utilizando-se pisseta contendo água destilada. Dessa suspensão, pipetou-se 1 mL que foi adicionado em tubos de vidros de 145 mm de altura por 25 mm de diâmetro, com 20 mL da solução do corante artificial. Além dos já citados, foram estudados os seguintes corantes: amarelo crepúsculo (Q.refresko[®] sabor laranja), tartrazina e amarelo crepúsculo (Q.refresko[®] sabor abacaxi), utilizando-se as mesmas concentrações empregadas no estudo de coloração de massas de ovos. Em seguida, os tubos foram aquecidos em banho-maria, a 100°C, por 20 minutos. Após o resfriamento em temperatura ambiente, a suspensão de ovos de cada tubo foi vertida sobre peneira formada de tela Millipore de 11 µm, para a retirada do corante. Os ovos foram recolhidos em água destilada em outro tubo de vidro. A seguir, a coloração dos ovos foi observada em microscópio de objetiva invertida. A eficácia do corante foi comparada com a fucsina ácida por análise visual.

Sementes de soja (*Glycine max* L. cv. Doko) foram desinfestadas superficialmente com hipoclorito de sódio 1% por 1 minuto e colocadas para germinar em bandejas contendo areia passada em peneira de abertura de malha de 0,85 mm, umedecida e mantidas em sala climatizada a $27 \pm 2^\circ\text{C}$. Após 3 dias da semeadura, as sementes germinadas com radícula de aproximadamente 2 cm

de comprimento foram selecionadas e transferidas para tubos de vidro contendo 30 cm³ de areia fina quartizífera umedecida e previamente autoclavada, a 121°C, por 30 minutos. Vinte e quatro horas após, infestou-se o substrato de cada tubo com 200 juvenis do segundo estágio (J2) de *M. incognita*. A seguir, os tubos foram vedados e colocados em câmara climatizada a 28 ± 2°C, onde 36 tubos permaneceram por 72 horas ou 30 dias. As plantas foram retiradas dos tubos armazenados por 72 horas, jorrando-se água com auxílio de pisseta nas paredes dos tubos. Os sistemas radiculares foram lavados e submetidos ao clareamento dos tecidos com hipoclorito de sódio 1,5% por 6 minutos e enxaguados em água corrente para eliminar todo o resíduo de hipoclorito de sódio. Aqueles sistemas radiculares que permaneceram nos tubos por 30 dias foram transferidos para hipoclorito de sódio, onde ficaram imersos por 20 minutos. Em seguida, foram colocados em tubos, aos quais adicionou-se solução contendo corante artificial de suco comercial ou solução de fucsina ácida diluída preparada segundo técnica de Byrd et al. (1983) adaptada por Campos (2003). Foram estudados os mesmos produtos comerciais empregados no ensaio de coloração de ovos e nas mesmas concentrações.

As raízes imersas em fucsina ácida foram mantidas em banho-maria com água em ebulição por 2 minutos e aquelas imersas nos demais corantes permaneceram durante 5 minutos. O resfriamento foi feito durante a noite em temperatura ambiente. As raízes foram lavadas em água corrente para eliminar o excesso de corante e recobertas com solução de glicerina 50%, deixando-as em repouso por 24 horas. A seguir, as raízes de cada tubo correspondente aos tratamentos foram montadas com lâminas de vidro de 25 cm de comprimento por 8 cm de largura e 0,3 cm de espessura, adicionando-se solução de glicerina pura sobre as mesmas para observação dos nematóides no interior da raiz usando-se microscópio de objetiva invertida. A eficácia da concentração e dos tipos de corante foi comparada de modo visual com fucsina ácida.

Todas as soluções obtidas de corantes artificiais de bordeaux e azul indigotina (Q.refresko[®] uva), bordeaux e tartrazina (Q.refresko[®] morango), azul indigotina e vermelho bordeaux (Ki.Gostoso[®] groselha) coloriram de vermelho massas de ovos e ovos (Figura 1A-D). Ovos submetidos à técnica de coloração em solução composta de corantes artificiais de vermelho 40, azul indigotina, azul brilhante e dióxido de titânio (Fresh[®] uva) foram coloridos de laranja-claro e aqueles submetidos ao amarelo crepúsculo (Q.refresko[®] laranja) ou tartrazina e amarelo crepúsculo (Q.refresko[®] abacaxi) foram coloridos de amarelo. Os corantes artificiais de bordeaux e tartrazina (Q.refresko[®] morango), azul indigotina e vermelho bordeaux (Ki.Gostoso[®] groselha) apresentaram melhor coloração de massas de ovos, em comparação com a intensidade daquelas coloridas com flocina B (Figura 1A-B). Estes corantes, bem como o composto de bordeaux e azul indigotina (Q.refresko[®] uva), proporcionaram melhor coloração de ovos, quando comparados à fucsina ácida (Figura 1C-D). A concentração de 1% do produto comercial apresentou sempre melhor coloração. Uma boa visualização das massas de ovos nas raízes requer alto contraste na coloração das massas e do tecido radicular. Como os corantes que coloriram os ovos de amarelo e laranja-claro não permitiriam tal contraste, não foram testados na coloração das massas de ovos.

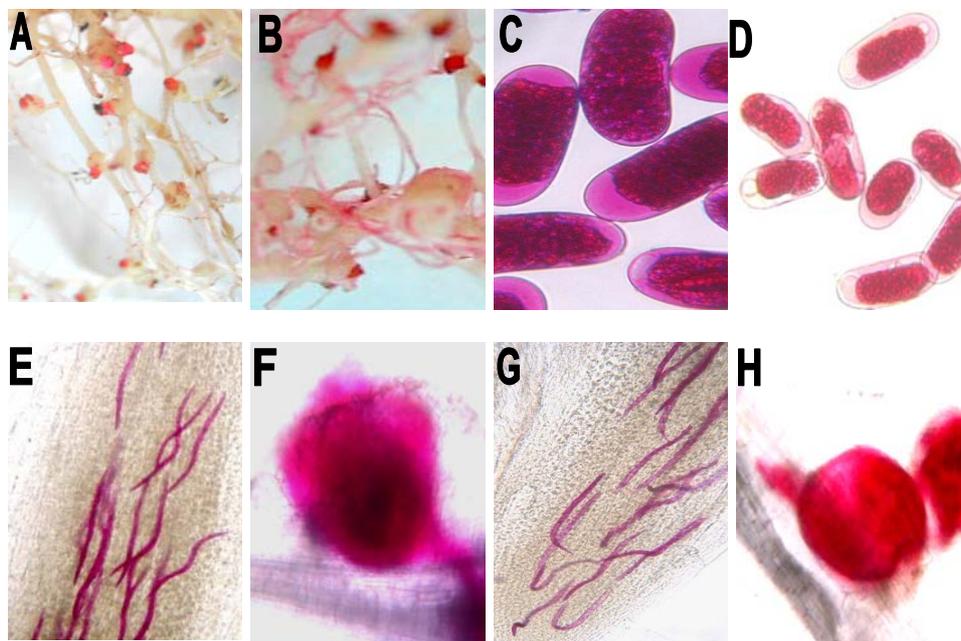


Figura 1. A–D: Coloração de massas de ovos e ovos de *Meloidogyne incognita* em raízes de tomateiro. A-solução de floxina B. B-solução de corante artificial de bordeaux e tartrazina. C-solução de fucsina ácida. D-solução de corante artificial de bordeaux e azul indigotina. E–H: Coloração de juvenis e fêmeas em raízes de soja. E–F: solução de fucsina ácida. G–H: solução de corante artificial de bordeaux e azul indigotina.

Resultado insatisfatório foi observado com os corantes artificiais bordeaux e azul indigotina (Q.refresko[®] uva), que coloriram as massas de ovos de vermelho escuro, além de ter proporcionado coloração do tecido do sistema radicular, proporcionando pouco contraste entre o tecido radicular e as massas de ovos. Porém, a intensidade da coloração do tecido foi reduzida pela imersão do sistema radicular em água por, no mínimo, 2 horas. Neste trabalho, não se avaliou a viabilidade dos ovos após a coloração. No entanto, em testes preliminares, observou-se que a exposição dos J2 de *M. incognita* na solução

composta pelos corantes artificiais bordeaux e tartrazina (Q.refresko[®] morango), sem aquecimento, por 24 horas, causou a morte de todos os nematóides. Já a coloração de massas de ovos com floxina B, usada como testemunha para a comparação da intensidade de cor, não afetou a viabilidade dos ovos de *M. incognita* (Neves et al., 2001). A morte dos nematóides pode ter sido provocada pela presença de ácido fumárico na composição do produto comercial ou diretamente pelos corantes artificiais bordeaux e tartrazina.

As soluções compostas dos corantes artificiais bordeaux e azul indigotina (Q.refresko[®] uva), bordeaux e tartrazina (Q.refresko[®] morango), azul indigotina e vermelho bordeaux (Ki.Gostoso[®] groselha) coloriram de vermelho os J2 e fêmeas no interior das raízes. Raízes de soja infectadas com *M. incognita* e submetidas à técnica de coloração em solução composta de corante artificial vermelho 40, azul indigotina, azul brilhante e dióxido de titânio (Fresh[®] uva) ou amarelo crepúsculo (Q.refresko[®] laranja) coloriram os J2 e as fêmeas de laranja-claro. Já os corantes tartrazina e amarelo crepúsculo (Q.refresko[®] abacaxi) coloriram de amarelo. Os produtos comerciais contendo, em sua composição, corantes que coloriram os J2 e fêmeas de vermelho no interior da raiz permitiram melhor contraste entre o nematóide e o tecido radicular, comparado com aqueles coloridos em solução de fucsina ácida (Figura 1E-H). Dentre os produtos comerciais testados e que apresentaram os melhores resultados na coloração de J2 e fêmeas, destacaram-se aqueles que tiveram o bordeaux na composição colorindo o nematóide de vermelho. Os corantes vermelho 40, azul indigotina, azul brilhante e dióxido de titânio (Fresh[®] uva), amarelo crepúsculo (Q.refresko[®] laranja), tartrazina e amarelo crepúsculo (Q.refresko[®] abacaxi) coloriram os nematóides de laranja-claro e amarelo, propiciando pouco contraste e, por isso, não devem ser recomendados como corantes de nematóides. Entretanto, esses corantes talvez possam ser utilizados em tecidos de difícil clareamento ou naqueles que oxidam rapidamente, possibilitando

contraste entre o tecido escuro e o nematóide de cor amarela ou laranja claro. Em estudo preliminar não publicado, observou-se que corantes alimentícios à base de urucum também coloriram os J2 de *M. incognita* de amarelo. Reis et al. (2003) verificaram que soluções de urucum mostraram baixa eficiência na coloração de massas de ovos, enquanto corante alimentício mostrou-se tão eficiente quanto a floxina B. Thies et al. (2002) desenvolveram um método de coloração em substituição à floxina B e fucsina ácida. O corante para carnes, McCormick Schilling red food color®, colore eficazmente massas de ovos de *M. incognita* e outros estádios de desenvolvimento do nematóide no interior da raiz de pimentão (*Capsicum annuum* L.), em comparação com floxina B e fucsina ácida. Apesar da eficácia do corante testado por Thies et al. (2002) é difícil obtê-lo no mercado. Entretanto, os sucos à base de bordeaux que demonstraram grande eficácia neste trabalho podem ser adquiridos facilmente no mercado brasileiro, a um custo 99,8% menor do que a floxina B e fucsina ácida.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Anderson Resende de Almeida e Ricardo Tadeu Galvão Pereira, estudantes de pós-graduação, do Laboratório de Micologia/UFLA, pelo auxílio na obtenção das fotografias.

Literatura Citada

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

CAMPOS, H. D. **Aspectos do parasitismo e da privação alimentar do nematóide de galhas n. *Meloidogyne javanica*) e do cisto n. *Heterodera glycines*) em soja**. 2003. 203 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

COOLEN, W. A.; D'HERDE, C. J. **A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue culture**. Ghent: State Agriculture Research Centre, 1972. 77 p.

FENNER, L. M. Determination of nematode mortality. **Plant Disease Reporter**, St. Paul, v. 46, p. 383, 1962.

GOURD, T. R.; SCHMITT, D. P.; BARKER, K. R. Penetration rates second-stage juveniles of *Meloidogyne* spp. and *Heterodera glycines* into soybean roots. **Journal of Nematology**, Lakeland, v. 25, n. 1, p. 38-41, Jan. 1993.

HERMAN, M.; HUSSEY, R. S.; BOERMA, H. R. Penetration and development of *Meloidogyne incognita* on roots of resistant soybean genotypes. **Journal of Nematology**, Lakeland, v. 23, n. 2, p. 155-161, Apr. 1991.

HOLBROOK, C. C.; KNAUFT, D. A.; DICKSON, D. W. A technique for screening peanut for resistance to *Meloidogyne arenaria*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 67, n. 9, p. 957-958, Sept. 1983.

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

McBETH, C. W. A.; TAYLOR, A. L.; SMITH, A. L. Note on staining nematodes in root tissues. **Proceedings of the Helminthological Society of Washington**, Washington, v. 8, n. 1, p. 26, 1941.

NEVES, W. N.; SCHWAN, A.V.; MIZOBUTSI, E. H.; FREITAS, L. G. Efeito do corante floxina B sobre a viabilidade dos ovos de *M. incognita*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, 23., 2001, Marília-SP. p. 135.

REIS, G. F. dos; GAVASSONI, W. L.; BACCHI, L. M. A. Opções de baixo custo na coloração de massas de ovos de *Meloidogyne*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, p.257, ago. 2003. Suplemento.

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**, Brasília, v. 27, n. 2, p. 185-192, dez. 2003.

SALGADO, S. M. L.; CAMPOS, H. D.; PAIVA, B. R. T. L.; RESENDE, M. L. V.; CAMPOS, V. P. Penetração de *Meloidogyne exigua* em cultivares de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, p.293, ago. 2003. Suplemento.

THIES, J. A.; MERRILE, S. B.; CORLEY, E. L. Red food coloring stain: New, safer procedures for staining nematodes in roots and egg masses on root surfaces. **Journal of Nematology**, Lakeland, v. 34, n. 2, p. 179-181, Apr. 2002.

ARTIGO 2

Aspectos da Reserva Energética Corporal de Juvenis do Segundo Estádio de *Meloidogyne exigua* do Cafeeiro*

(Preparado de acordo com as normas da revista "Fitopatologia Brasileira")

Fernando S. Rocha^{1}, Vicente P. Campos¹ & Esdras H. da Silva¹**

¹Universidade Federal de Lavras, Departamento de Fitopatologia, CEP 37200-000, Caixa Postal 3037, Lavras, MG, fax (0xx35) 3829-1283,
e-mail: rochafsplant@yahoo.com.br

Autor para correspondência: Fernando S. Rocha

ROCHA, F.S., CAMPOS, V.P. & SILVA, E.H. Aspectos da reserva energética corporal de juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne exigua* do cafeeiro. Fitopatologia Brasileira.

RESUMO

Objetivou-se estudar a flutuação populacional de juvenis do segundo estágio (J2) de *M. exigua* e o seu percentual de lipídios neutros em uma área naturalmente infestada e avaliar o efeito do período de privação alimentar desses J2 na infectividade em tomateiro. Durante 12 meses, foram coletadas mensalmente amostras de cafeeiros infestados, das quais extraíram-se os J2 de *M. exigua* do solo e avaliaram-se os lipídios neutros pela análise de imagem da área colorida com o corante "Oil Red O". Noutro ensaio, os J2 de *M. exigua* obtidos de câmara de eclosão foram armazenados por 0, 3, 6, 9 e 12 dias em água parada a 28°C e inoculados em mudas de tomateiro. Maior densidade populacional de J2 de *M. exigua* no solo ocorreu de novembro até maio e a menor em agosto, com variação de 14 a 170 J2/cm³ de solo e média de 93 J2/cm³. No mês de agosto, observou-se menor percentagem de lipídio corporal. O maior percentual ocorreu em fevereiro com 65,64% de lipídios neutros por J2. Maior frequência de J2 com lipídio entre 60 e 80% ocorreu a partir de novembro

até fevereiro, enquanto de março a julho e em outubro esteve entre 20 a 40% de lipídio corporal. A percentagem de lipídios neutros dos J2 livres no solo correlacionou-se positivamente com a densidade populacional dos nematóides ($r = 0,6680$; $P = 0,0176$), com a temperatura média do ar ($r = 0,7336$; $P = 0,0066$) e com a precipitação pluviométrica ($r = 0,7359$; $P = 0,0064$). O teor de lipídio no J2 diminuiu significativamente em cada período de estocagem no intervalo de 3 a 12 dias, chegando a 39,45% de perda aos 3 dias de armazenamento. O armazenamento dos J2 de *M. exigua* a partir do terceiro dia proporcionou redução drástica na infectividade e na reprodução em tomateiro, em comparação com a testemunha.

Palavras-chaves adicionais: Teor de lipídios neutros, flutuação populacional, privação alimentar, infectividade, nematóide das galhas.

ABSTRACT

Aspects of the body energy reserve in second stage juveniles of *Meloidogyne exigua* from coffee

The population fluctuation of second stage juveniles (J2) of *M. exigua* and their neutral lipid contents in naturally area infested and the effect of starvation of J2 on infectivity in tomato were studied. Monthly, during one year, samples were collected from infested coffee plants for extraction of J2 of *M. exigua* and assessment of neutral lipids by image analysis of area staining with "Oil Red O". In another assay, J2 of *M. exigua* were stored by 0, 3, 6, 9 and 12 days in water at 28°C and inoculated in tomato seedlings. Greater population density of *M. exigua* in soil occurred from November to May with variation from 14 to 170 J2/cm³ of soil and average of 93 J2/cm³. However, the greatest content was encountered in August when J2 had lowest percentage of lipid content. In February J2 had 65,64% of neutral lipids. Greatest frequency of J2 having lipids between 60 to 80% occurred from November to February, while from March to October J2 had 20 to 40% lipid content. The percentage of the neutral lipids of free J2 in the soil correlated positively with the population density of the nematodes ($r = 0,6680$; $P = 0,0176$), with the average of the air temperature ($r = 0,7336$; $P = 0,0066$) and with the rainfall ($r = 0,7359$; $P = 0,0064$). The lipid content of J2 body decreased significantly in each period of storage from 3 to 12 days, reaching 39,45% decrease at 3 days of storage. The storage of J2 of *M. exigua* from third day on gave drastic reduction in the infectivity and reproduction in tomato, compared with control.

Additional Keywords: Neutral lipid contents, population fluctuation, starvation, infectivity, root-knot nematode.

INTRODUÇÃO

O café é um dos mais importantes produtos agrícolas brasileiros, gerando riquezas e divisas para o país, sendo o Estado de Minas Gerais responsável por 50% da produção brasileira. Por se tratar de uma cultura perene muitas doenças concorrem para reduzir a produção cafeeira, o que eleva o custo de produção, devido à aplicação de agrotóxicos. Em todo o mundo existem 15 espécies de *Meloidogyne* relatadas como parasitas ou associadas aos cafeeiros (Araya & Caswell-Chen, 1995; Campos, 1997; Campos et al., 1990; Campos & Villain, 2005), sendo de maior importância para a cafeicultura brasileira às espécies *M. incognita*, *M. paranaensis*, *M. coffeicola* e *M. exigua* (Campos & Villain, 2005). Dentre elas, *M. exigua* Goeldi, 1887, é a mais disseminada nos cafezais brasileiros (Campos et al., 1985) e se constitui num dos principais patógenos do cafeeiro nas Américas Central e do Sul (Campos et al., 1990), podendo causar perdas de 45 a 50% na produção (Arruda & Reis, 1962; Barbosa et al., 2004).

O juvenil do segundo estágio (J2) precisa manter aproximadamente entre 50 e 60% de sua energia corporal, basicamente sob a forma lipídica, para ter condições de penetrar e infectar o hospedeiro (Christophers et al., 1997; Reversat, 1981). No entanto, no solo os J2 passam por condições variáveis de temperatura e umidade e o retardamento na penetração leva ao uso desta energia, principalmente em alta temperatura, reduzindo sua patogenicidade (Bergeson, 1959; Reversat, 1980; Van Gundy et al., 1967). A privação alimentar de J2 de *M. incognita* e *M. javanica* por 4 dias, a 28°C, proporciona perdas de 56,12% de lipídio neutro, refletindo em redução na penetração e infectividade (Campos,

* Parte da Tese de Doutorado do primeiro autor apresentada à Universidade Federal de Lavras. (2007).

** Bolsista do CNPq

2003; Freire et al, 2007). Vários pesquisadores têm demonstrado que a redução na infectividade dos J2 está associada ao aumento da temperatura, perda das reservas corporais, mobilidade e tempo de privação alimentar (Campos, 2003; Freire et al, 2007; Robinson et al., 1987; Van Gundy et al., 1967).

A flutuação populacional de *M. exigua*, em cafeeiros no sul de Minas Gerais, ocorre em função das estações climáticas (Huang et al., 1984). Na estação seca sua densidade populacional reduz-se e eleva-se moderadamente no início da estação chuvosa (Campos et al., 1984; Huang et al., 1984; Maximiniano et al., 2001), coincidindo com o desenvolvimento do sistema radicular do cafeeiro (Huxley et al., 1974; San Juan et al., 1998). Dependendo de uma complexa relação planta-nematóide-ambiente, a ocorrência de maior população no solo torna-se dependente das condições regionais favoráveis ao desenvolvimento e reprodução do nematóide. Almeida et al. (1987) constataram maior densidade populacional de *M. exigua* nos meses de abril a julho na rizosfera de cafeeiro. Huang et al. (1984) observaram maior população de *M. exigua* em cafeeiros localizados no Sul de Minas Gerais no mês de setembro, com o incremento da temperatura e precipitação pluviométrica. O conhecimento da dinâmica populacional de *M. exigua* no campo correlacionada com sua infectividade e as condições climáticas nos fornece informações importantes na tomada de decisões sobre medidas de controle.

O teor lipídico corporal do J2 no campo poderá ser útil na avaliação da capacidade de parasitismo desse inóculo. No entanto, a correlação entre a flutuação populacional e o teor lipídico do J2 de *Meloidogyne* sob condições de campo aliado ao sucesso no parasitismo do J2 de *M. exigua* após privação alimentar são aspectos ainda carentes de pesquisa. Desta forma, objetivou-se, neste trabalho, estudar a flutuação populacional de J2 de *M. exigua* e o seu percentual de lipídios neutros em uma área naturalmente infestada, além de

avaliar o efeito do período de privação alimentar desses J2 na infectividade em tomateiro.

MATERIAL E MÉTODOS

Flutuação populacional e do percentual de lipídios neutros de *Meloidogyne exigua* em cafeeiros infestados no campo

Para o ensaio relativo à flutuação populacional de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne exigua* e de seu percentual de lipídio no solo, utilizou-se uma área de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) cv. Mundo Novo, com 15 anos de idade, cultivados em espaçamento de 3,0 x 1,0, sem irrigação e naturalmente infestada por *M. exigua*, no período de março de 2005 a fevereiro de 2006, no município de Varginha, Minas Gerais. Para certificar-se dessa infestação natural, 20 amostras de raízes foram coletadas nessa área. No laboratório, retiraram-se fêmeas das raízes dos cafeeiros e procedeu-se ao estudo da configuração perineal e do fenótipo de α -esterase, conforme Taylor & Sasser (1978) e Barker et al. (1985), concluindo-se que *M. exigua* era o único agente causal das galhas observadas. Retirou-se também outra amostra composta de 500 g de solo para análise química e granulométrica. O resultado granulométrico e analítico foi: argila = 43%; areia = 50%; silte = 7%, matéria orgânica = 3,7% e pH em água = 7,5, sendo caracterizado como solo de textura argilosa.

Nesta área, estabeleceram-se 6 blocos ao acaso contendo, cada bloco, 12 plantas de café, constituindo-se cada planta uma parcela. Mensalmente, e entre os dias 15 e 20 de cada mês, foram coletadas 2 amostras de 500 g de solo ao redor da rizosfera do cafeeiro em cada parcela, as quais foram homogeneizadas para compor uma amostra composta de 500 g de solo. De cada amostra composta, extraíram-se os nematóides em 2 subamostras de 100 cm³ pela técnica de centrifugação e flotação em solução de sacarose (Jenkins, 1964). Em cada

subamostra, os J2 de *M. exigua* foram examinados e contados sob microscópio de objetivas invertidas, estimando-se o número de J2 na rizosfera dos cafeeiros em cada parcela. Em seguida, as suspensões de cada subamostra relativa a cada parcela foram colocadas em tubo de vidro, centrifugadas a 2.000 rpm por 3 minutos e os J2 obtidos em, aproximadamente, 0,5 mL. Em cada J2 foi determinada a concentração de lipídios neutros por meio do método de análise de imagem da área colorida de vermelha com o corante “Oil Red O” (Campos, 2003; Christophers et al., 1997; Storey, 1983). Para isso, adicionaram-se 3 mL da solução corante “Oil Red O”, seguido de aquecimento em banho-maria a 60°C, por 20 minutos.

Após o resfriamento em temperatura ambiente, os J2 de *M. exigua*, já com lipídio neutro colorido de vermelho foram concentrados, novamente, em 0,5 mL da solução corante. A seguir, misturaram-se 3 mL de glicerina a 50% e mantiveram-se os J2 coloridos armazenados em temperatura ambiente. Montaram-se, então, lâminas contendo 20 J2 de *M. exigua* de cada uma das 12 parcelas referentes aos meses do ano. A partir das fotografias dos J2, utilizou-se o programa “Image Tool for Windows”, versão 3.0, para estimar a área de coloração vermelha correspondente à de lipídios e a área total do corpo do J2. Dessa forma, a partir da área de coloração vermelha, obteve-se o percentual de lipídios neutros em relação à área total do corpo dos J2 de *M. exigua*.

Os dados referentes à temperatura média diária do ar e de precipitação pluviométrica foram obtidos na estação climatológica do município. Utilizou-se o programa estatístico SAS System for Windows para o cálculo de normalidade e das correlações. As análises de variância foram realizadas pelo programa estatístico Sisvar e as variáveis significativas, pelo teste F, foram submetidas à análise de regressão para ajuste do melhor modelo.

Correlação entre o teor corporal lipídico do juvenil do segundo estágio de *Meloidogyne exigua* e a infectividade e reprodução

Obtenção de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne exigua*:

Raízes de cafeeiros infestadas com *M. exigua*, obtidas no setor de cafeicultura do Departamento de Agricultura, da Universidade Federal de Lavras, foram lavadas, cortadas em pedaços e trituradas em liquidificador por 60 segundos em solução de hipoclorito de sódio a 0,5 % para obtenção dos ovos, seguindo-se a técnica de Hussey & Barker (1973), modificada por Boneti & Ferraz (1981). Em seguida, realizou-se a limpeza dos ovos seguindo a técnica de Coolen & D'Herde (1972). Para a obtenção dos J2 de *M. exigua*, os ovos foram colocados em câmara de eclosão, à temperatura de 28°C.

Obtenção de mudas de tomateiro: Sementes de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cv. Nemadoro foram semeadas em bandejas contendo substrato Plantmax[®] e mantidas em casa-de-vegetação. Mudas de tamanho ideal para o transplântio e montagem dos ensaios foram obtidas 35 dias após a semeadura.

Instalação e avaliação do ensaio: Os J2 de *M. exigua* utilizados foram recolhidos no terceiro dia e quantificados em microscópio de objetivas invertidas. A suspensão foi calibrada em 1000 J2/mL e, neles, fez-se a determinação de lipídios neutros pelo método de análise de imagens. Em seguida, armazenou-se a suspensão de J2 por 3, 6, 9 e 12 dias em água parada em estufa incubadora (B.O.D.) a 28°C. Em cada período de armazenamento, colheu-se uma amostra de 2 mL da suspensão e, nos J2, fez-se a coloração de lipídios neutros com o corante "Oil Red O", estimando-se o percentual médio de lipídios neutros do corpo pela análise de imagem. Após cada período de armazenamento, os J2 foram inoculados em tomateiros. Para isso, 2.700 J2 foram inoculados em mudas de tomateiro, crescidos em copos plásticos de 300 mL de volume contendo substrato na proporção 1:1:1 (solo: areia: esterco). Na

testemunha, foram inoculados J2 recentemente obtidos. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com oito repetições. Para a inoculação, esses J2 foram dispersos em 4 mL de água e colocados em 2 furos de ± 3 cm de profundidade ao redor das mudas. A seguir, os copos foram colocados em sala climatizada à temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 14 h de luz.

Sessenta dias após a inoculação dos J2, cortou-se a parte aérea e retirou-se, cuidadosamente, o sistema radicular do solo em água parada num balde de 10 litros. A seguir, as massas de ovos dos nematóides nos sistemas radiculares foram coloridas de vermelho, em solução contendo corante artificial empregado na fabricação de sucos, conforme técnica de Rocha et al. (2005). Após a coloração, as raízes foram deixadas sobre papel toalha por 10 minutos, possibilitando, assim, a avaliação do peso da matéria fresca das raízes, seguida da contagem do número de massas de ovos e 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. exigua* por sistema radicular. Em seguida, estimou-se o número de galhas, massas de ovos e de ovos/ g de raiz.

Os dados relativos ao número de galhas, massas de ovos e ovos/g de raiz foram transformados em $\sqrt{x + 0.5}$ e, em seguida, submetidos à análise de variância e teste de Scott & Knott (1974), a 1% de probabilidade, para a comparação das médias. As análises de regressão, correlação e teste de médias foram realizadas pelos mesmos programas estatísticos mencionados no ensaio anterior.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Flutuação populacional e do percentual de lipídios neutros de *Meloidogyne exigua* em cafeeiros infestados no campo

Maiores níveis populacionais de J2 de *M. exigua* no campo foram encontrados no solo a partir de novembro até maio. A partir de então, a população declinou no solo, chegando ao nível mais baixo em agosto (Figura 1A), com variação de 14 a 170 J2/cm³ de solo e média de 93 J2/cm³. Observou-se que este declínio acompanhou a redução da temperatura do ar e da precipitação pluviométrica (Figura 1C). Os meses de ocorrência populacional mais baixa no solo foram junho, julho, agosto, setembro e outubro, correspondendo ao período de baixa temperatura e/ou pluviométrica, quando um ou dois desses fatores foram limitantes para a eclosão. O aumento de J2 no solo foi progressivo a partir de outubro até abril, também acompanhando o aumento da pluviosidade e/ou temperatura (Figuras 1A e C).

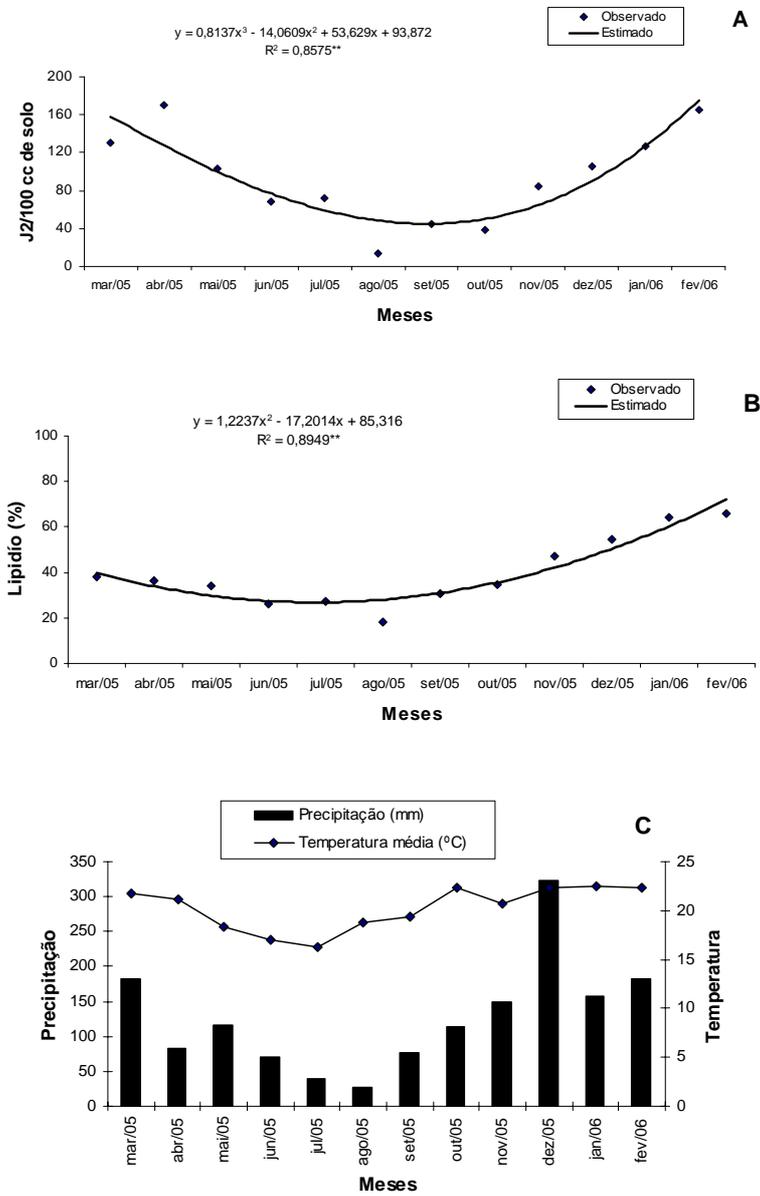


FIG. 1 - Flutuação populacional de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne exigua* em cafezal e variação média da temperatura e precipitação pluviométrica, no período de março de 2005 a fevereiro de 2006. A) Densidade populacional de J2 extraídos do solo. B) Percentagem média de lipídios neutros em J2 extraídos do solo. C) Temperatura média do ar e da precipitação pluviométrica.

O teor de lipídio neutro corporal nos J2 de *M. exigua* no campo variou mensalmente, semelhantemente à flutuação populacional, declinando a partir de março e chegando também ao nível mais baixo em agosto com 18,37% (Figura 1B). O aumento mensal do lipídio corporal ocorreu a partir de setembro chegando ao nível mais elevado em fevereiro com 65,64% (Figura 1B).

A percentagem de lipídios neutros dos J2 livres no solo correlacionou-se positivamente com a densidade populacional dos nematóides ($r = 0,6680$; $P = 0,0176$), com a temperatura média do ar ($r = 0,7336$; $P = 0,0066$) e com a precipitação pluviométrica ($r = 0,7359$; $P = 0,0064$) (Figuras 2 e 3). Observa-se que a maior frequência de J2 no período de março a julho e em outubro ocorre na classe lipídica de 20-40% (Tabela 1). De agosto a setembro maior frequência foi na classe de 0-20% de lipídio. Entretanto, de novembro a dezembro e de janeiro a fevereiro a ocorrência de maior frequência de J2 ocorreu nas classes lipídicas de 40-60% e 60-80%, respectivamente. E as maiores frequências de J2 na classe lipídica $> 80\%$ ocorreram em janeiro e fevereiro (Tabela 1). Dessa forma, nos períodos de maior população de J2 no solo, isto é, de novembro até maio, a frequência de J2 nas classes lipídicas mais elevadas ocorreu apenas de novembro a fevereiro. Todavia, considerando o nível referencial bom para infectividade em torno de 50% do lipídio avaliado, isto é, para estes dados de campo em torno de 47,3 a 54,63%, abaixo do qual o nematóide perde a capacidade parasitária, segundo Christophers et al. (1997), a boa infectividade da população de J2 no solo só ocorreria a partir de novembro até fevereiro (Figura 1B), período no qual ocorreu maior frequência na população de J2 com teor de lipídio corporal entre 60 e 80% (Tabela 1). Dessa forma, nos demais meses do ano, os J2 teriam suas capacidades parasitárias reduzidas.

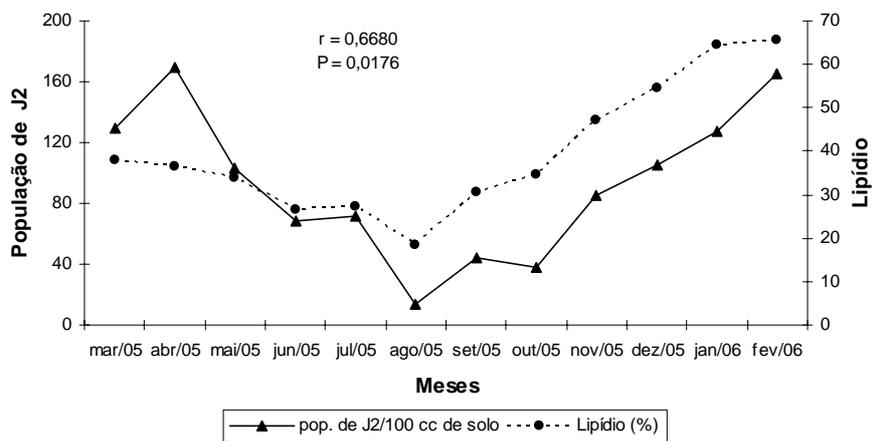


FIG. 2 - Correlação entre a percentagem de lipídio corporal dos juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne exigua* em cafeeiro infestado e a população do nematóide no solo.

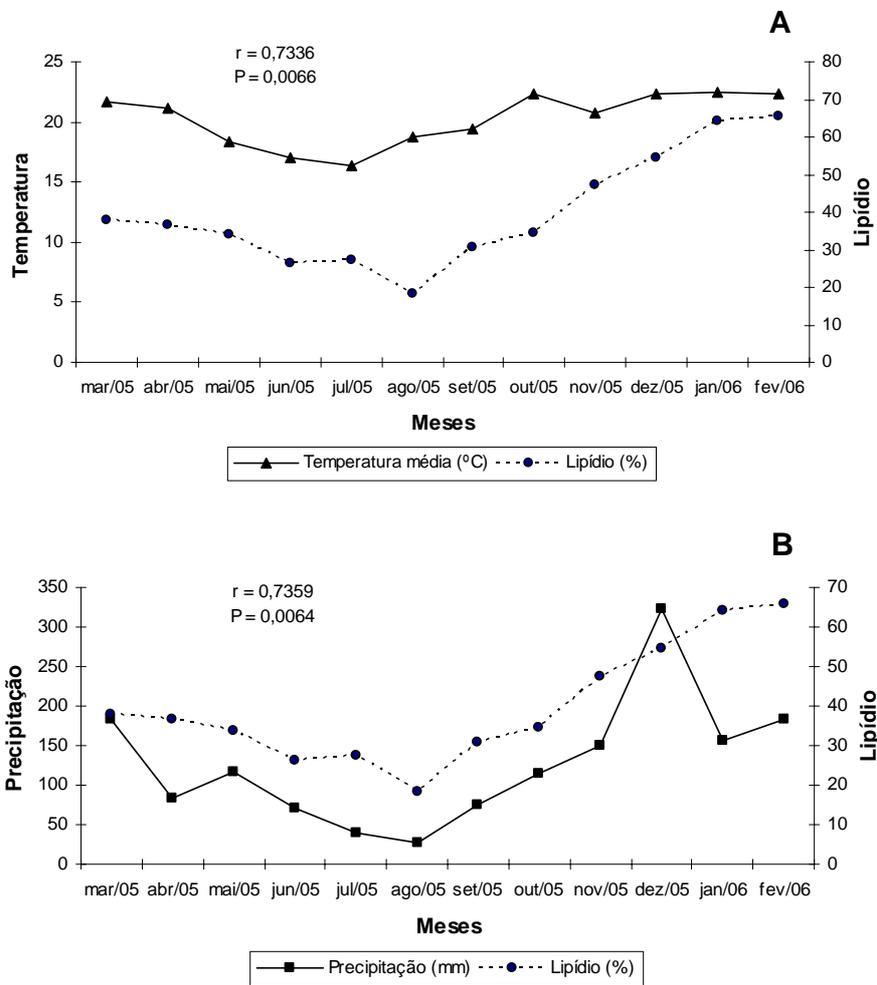


FIG. 3 - Correlação entre a percentagem de lipídio corporal dos juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne exigua* em cafeeiro infestado e a temperatura média do ar (A) e a precipitação pluviométrica (B).

TABELA 1 - Distribuição de freqüências relativas percentuais do teor de lipídio corporal de juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne exigua* no campo, durante 12 meses.

Meses	Classes de teor de lipídio*				
	0-20	20-40	40-60	60-80	> 80
Março/05	5	50	38	7	0
Abril/05	5	60	27	8	0
Maió/05	28	38	20	12	2
Junho/05	30	58	12	0	0
Julho/05	32	45	23	0	0
Agosto/05	61	17	20	2	0
Setembro/05	33	28	32	5	2
Outubro/05	25	33	27	15	0
Novembro/05	5	28	47	18	2
Dezembro/05	2	13	52	30	3
Janeiro/06	3	0	32	50	15
Fevereiro/06	2	5	18	58	17

*Os valores percentuais mensais são referentes a 120 observações.

Os meses de baixo nível populacional de J2 no solo (junho a outubro), coincidem com baixo teor de lipídio e maior freqüência na população dos J2 com lipídio corporal entre 0-20% (Figuras 1A e B, Tabela 1). Nesses meses ocorreu, geralmente, a inibição de emissão de raízes novas pela planta (Rena & Maestri, 1986), resultando na falta de locais de penetração para os J2 no solo. Dessa forma, os J2 do solo perderiam, com o tempo, as suas reservas energéticas em forma de lipídios, pois não seria repostas pela impossibilidade de parasitismo. Entretanto, nos meses de março, abril e maio o teor de lipídios nos J2 variou de 33,85 a 37,79%, sendo considerado baixo, apesar de alto nível populacional de J2 no solo (Figuras 1A e B). Ao que tudo indica, nesses meses, ocorrendo elevada competição por sítios de penetração por parte da população de J2 que não parasitou as raízes, sendo então levada à privação alimentar, resultando no uso das suas reservas energéticas lipídicas. Porém, quando ocorreu abundância

de raízes novas com o início do vigor vegetativo do cafeeiro, isto é, de novembro a fevereiro, os J2 recentemente eclodidos encontraram sempre locais de penetração não permanecendo no solo por longo período. San Juan et al. (1998) estudaram a variação anual da concentração de raízes em cafeeiros nos solos argilosos do Sul de Minas Gerais e observaram maior densidade radicular nos meses de janeiro a março, sendo a maior concentração das raízes funcionais situadas sob a copa e no período seco em maior profundidade e mais próximas ao tronco (Huxley et al., 1974). Segundo Beckley (1935) a emissão de raízes novas no cafeeiro ocorre durante a estação chuvosa bem como nos períodos úmidos subsequentes. Nos meses de estação seca, a planta entra em repouso não emitindo raízes novas (Rena & Maestri, 1986), o que impossibilita a infecção. Por outro lado, a temperatura baixa não permite a penetração, migração e eclosão de J2 (Campos et al., 2006; Goodell & Ferris, 1989; Hambleton et al., 1972; Prot & Van Gundy, 1981). Gourd et al. (1993) e Campos et al. (2006) estudando o efeito da temperatura na penetração de *M. incognita* e *M. javanica*, observaram boa capacidade de penetração dos J2 em raiz de soja nas temperaturas entre 25 e 31°C. Prot & Van Gundy (1981) verificaram que as temperaturas de 20 e 22°C proporcionaram melhor migração dos J2 de *M. incognita* em direção às raízes de tomateiro. Segundo Bird (1972) e Campos (2003) as condições ótimas para embriogênese e eclosão de *M. javanica* estão entre 25 e 28°C. Entretanto, a partir de novembro até março os fatores limitantes a ontogenia, migração e penetração não ocorreram mais além de reiniciar a atividade vegetativa do cafeeiro, resultando assim na ocorrência de muitas raízes novas e alta população de J2 com elevado teor de lipídio corporal.

Correlação entre o teor corporal lipídico do juvenil do segundo estágio de *Meloidogyne exigua* e a infectividade e reprodução

O teor de lipídio neutro no J2 de *M. exigua* declinou com o aumento do período de estocagem (Figura 4), variando de 9,19 a 81,30%. A estocagem de J2 em água também reduziu ($P \leq 0,01$) a reprodução de *M. exigua* em tomateiro, expressa em ovos/g de raiz (Tabela 2), correlacionando-se positivamente ($r = 0,8661$; $P = 0,05$) com o valor do lipídio corporal em cada período de estocagem (Figura 5). A estocagem dos J2 por 3 dias, a 28 °C, proporcionou perda de 39,45% do nível lipídico original (Figura 4). Nesse período de estocagem, maior frequência dos J2 ocorreu na classe de 40-60% de lipídio (Tabela 3), resultando, assim, na redução ($P \leq 0,01$) da infectividade e reprodução desses J2 em tomateiro (Tabela 2), expressas pelo número de galhas, massas de ovos e ovos/g de raiz, comparados com a testemunha, cuja maior frequência dos J2 ocorreu na classe lipídica $> 80\%$ (Tabela 3). Contudo, aos 6 dias de estocagem maior frequência de J2 ocorreu na classe lipídica de 20-40%. Já aos 9 e 12 dias, a maior frequência foi na classe 0-20%.

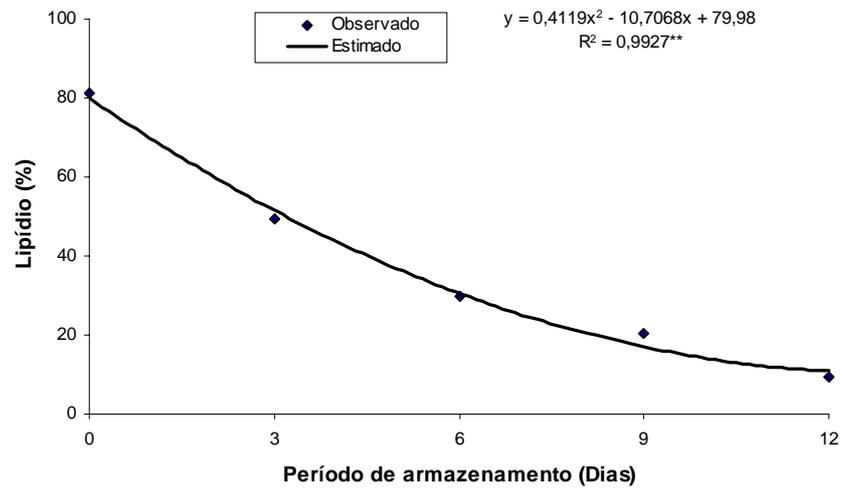


FIG. 4 - Percentagem de lipídio corporal dos juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne exigua* armazenados em água parada, a 28°C, por diferentes períodos de tempo.

TABELA 2 - Efeito do período de estocagem de juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne exigua* em água, a 28°C, na infectividade e reprodução em tomateiro cv. Nemadoro.

Tratamentos	Galhas/g de raiz	Massas de ovos/g de raiz	Ovos/g de raiz
0 dia (testemunha)	18 a	10 a	4474 a
3 dias	1 b	0 b	120 b
6 dias	0 b	0 b	23 b
9 dias	0 b	0 b	18 b
12 dias	0 b	0 b	8 b
CV (%)	61,34	80,19	134,16

Médias seguidas por letras distintas, na coluna, diferem entre si, pelo teste de Scott & Knott (1974), a 1% de probabilidade.

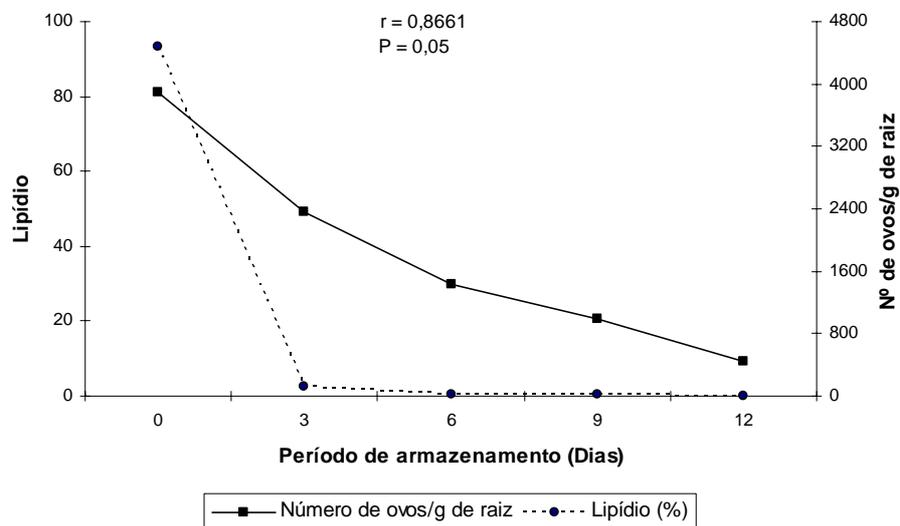


FIG. 5 - Correlação entre a porcentagem de lipídio corporal dos juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne exigua* e a reprodução expressa em ovos/g de raiz, após armazenados em água, a 28°C, por diferentes períodos.

TABELA 3 - Distribuição de freqüências relativas percentuais do teor de lipídio corporal de juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne exigua*, armazenados em água, a 28°C, por diferentes períodos.

Classes	Período de armazenamento (Dias) *				
	0	3	6	9	12
0-20	0	0	20	70	100
20-40	0	25	60	15	0
40-60	0	55	20	15	0
60-80	30	20	0	0	0
> 80	70	0	0	0	0

*Os valores percentuais, em cada período de armazenamento, são referentes a 20 observações.

A perda rápida do teor de lipídio durante o período de estocagem dos J2 de *M. exigua* indica intensa atividade muscular dos J2, o que constitui o principal dreno energético das reservas corporais (Campos, 2003; Reversat,

1981; Robinson et al., 1987). Campos (2003) verificou perda de 38,82% e 56,12% no lipídio corporal de J2 de *M. javanica* a partir do segundo e quarto dia de armazenamento dos J2 em água parada, a 28°C, respectivamente, o que refletiu em redução acentuada na penetração, número de fêmeas e de massas de ovos.

Bergeson (1959) sugeriu que o gasto de 50% da reserva lipídica indica a perda na capacidade parasitária, porém, mantendo a atividade motora. Entretanto, observando-se a reprodutividade de J2 de *M. exigua* expressa em ovos/g de raiz (Tabela 2), constata-se que ainda ocorre infectividade com 9 dias de estocagem em alguns juvenis, o que resulta em 0,4% daquela no tratamento testemunha.

A grande redução na infectividade e reprodução de J2 de *M. exigua* estocados a partir do terceiro dia se deve à maior frequência de perda de lipídio durante o período de armazenamento do J2. De acordo com a perda da reserva lipídica, avaliada pelo método de análise de imagem, essa redução não explica a manutenção, apesar de baixa, da patogenicidade dos J2 armazenados a partir do sexto dia, o que deve ocorrer em poucos espécimes da população ou está relacionada à espécie. Freire et al. (2007) e Campos (2003) avaliando a infectividade de J2 de *M. incognita* e *M. javanica* estocados durante seis e doze dias, respectivamente, também verificaram a redução de galhas, massas de ovos e ovos no sistema radicular. Robinson et al. (1987) observaram redução significativa na motilidade e na infectividade de J2 de *Globodera rostochieinsis* e *G. pallida* após perdas superiores a 65% do lipídio corporal original e que os J2 de *G. rostochieinsis* perdem mais rapidamente suas reservas lipídicas que *G. pallida*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, F. V.; CAMPOS, V. P.; LIMA, R. D'ARC. Flutuação populacional de *M. exigua* na rizosfera do cafeeiro. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v. 6, p. 159-175, 1987.

ARAYA, M.; CASWELL-CHEN, E. P. *Coffea arabica* cvs. Caturra and Catuai Nonhosts to a California isolate of *Meloidogyne javanica*. **Nematropica**, Uuburn, v. 25, n. 2, p. 165-171, 1995.

ARRUDA, H. V.; REIS, A. J. Redução nas duas primeiras colheitas de café, devido ao parasitismo de nematóide. **O Biológico**, São Paulo, v. 28, n. 12, p. 349, dez. 1962.

BARBOSA, D. H. S. G.; VIEIRA, H. D.; SOUZA, R. M.; VIANA, A. P.; SILVA, C. P. Field estimates of coffee yield losses and damage threshold by *Meloidogyne exigua*. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 1, p. 49-54, 2004.

BARKER, K. R.; CARTER, C. C.; SASSER, J. N. (ed.). **An advanced treatise on Meloidogyne**. 1985. v. 2, p. 69.

BECKLEY, V. A. Observations on coffee in Kenya. I. Chlorosis and die-back in coffee. **Empire Journal of Experimental Agriculture**, Oxford, v. 3, p. 203-209, 1935.

BERGESON, G. B. The influence of temperature on the survival of some species of the genus *Meloidogyne*, in the absence of a host. **Nematologica**, Leiden, v. 4, p. 344-354, 1959.

BIRD, A. F. Influence of temperature on embryogenesis in *Meloidogyne javanica*. **Journal of Nematology**, Lakeland, v. 4, n. 3, p. 206-213, 1972.

BONETI, J. I. S.; FERRAZ, S. Modificação do método de Hussey e Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 6, n. 3, p. 553, out. 1981.

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.

CAMPOS, H. D.; CAMPOS, V. P.; POZZA, E. A. Efeito do tempo, substrato e temperatura na penetração de juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne javanica* e *Heterodera glycines* em soja. **Summa Phytopathologica**, São Paulo, v. 32, n. 2, p. 156-160, abr./jun. 2006.

CAMPOS, V. P. Controle de doenças: doenças causadas por nematóides. In: RIBEIRO DO VALE, F. X.; L. ZAMBOLIM (ed.). **Controle de doenças de plantas**. Viçosa: Editora Universitária, 1997. v. 1, p. 141-170.

CAMPOS, V. P.; LIMA, R. D.; ALMEIDA, V. F. Nematóides parasitas do cafeeiro. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 11, n. 126, p. 50-58, jun. 1985.

CAMPOS, V. P.; RESENDE, I. C.; FARIA, M. A. Flutuação populacional de *M. exigua* em cafezais tratados com nematicidas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 11., 1984. Londrina, PR. **Anais...** Londrina, 1984. p. 156-157.

CAMPOS, V. P.; SIVAPALAM, P.; GNANAPRAGASAM, N. C. Nematodes parasites of coffee, cocoa and tea. In: LUC, M.; SIKORA, R. A.; BRIDGE, J (ed.). **Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture**. Wallingford UK: CAB International, 1990. p. 387-429.

CAMPOS, V. P.; VILLAIN, L. Nematode parasites of coffee and cocoa. In: LUC, M.; SIKORA, R. A.; BRIDGE, J. (ed.). **Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture**. 2. ed. CABI International, 2005. p. 529-579.

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, Jan. 1997.

COOLEN, W. A.; D'HERDE, C. J. **A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue culture**. Ghent: State Agriculture Research Centre, 1972. 77 p.

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**, São Paulo, 2007. (No prelo).

GOODELL, P. B.; FERRIS, H. Influence of environmental factors on the hatch and survival of *Meloidogyne incognita*. **Journal of Nematology**, Lakeland, v. 21, n. 3, p. 328-334, July 1989.

GOURD, T. R.; SCHMITT, D. P.; BARKER, K. R. Penetration rates by second-stage of *Meloidogyne* spp. and *Heterodera glycines* into soybean roots. **Journal of Nematology**, Lakeland, v. 25, n. 1, p. 38-41, Mar. 1993.

HAMBLEM, M. L.; SLACK, D. A.; RIGGS, R. D. Temperature effects on penetrations and reproduction of soybean-cyst nematode. **Phytopathology**, St. Paul, v. 62, n. 7, p. 762, July 1972.

HUANG, S. P.; SOUZA, E. P.; CAMPOS, V. P. Seasonal variation of *Meloidogyne exigua* population in a coffea plantation. **Journal of Nematology**, Lakeland, v. 16, n. 1, p. 115-117, 1984.

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

HUXLEY, P. A.; PATEL, R. Z.; KABAARA, A. M.; MITCHELL, H. W. Tracer studies with ³²P on the distribution of functional roots of arabica coffee in Kenya. **Annals of Applied Biology**, London, v. 77, n. 2, p. 159-180, 1974.

JENKINS, W. R. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. **Plant Disease Reporter**, St. Paul, v. 48, n. 9, p. 692, Sept. 1964.

MAXIMINIANO, C.; CAMPOS, V. P.; SOUZA, R. M.; ALMEIDA, A. R. Flutuação populacional de *Meloidogyne exigua* em cafezal naturalmente infestado por *Pasteuria penetrans*. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v. 25, n. 1, p. 63-69, jun. 2001.

PROT, J.; VAN GUNDY, S. D. Influence of photoperiod and temperature on migrations of *Meloidogyne* juveniles. **Journal of Nematology**, Lakeland, v. 13, n. 2, p. 217-220, 1981.

RENA, A. B.; MAESTRI, M. Fisiologia do cafeeiro. In: RENA, A. B.; MALAVOLTA, E.; ROCHA, M.; YAMADA, T. (Ed.). **Cultura do cafeeiro: atores que afetam a produtividade**. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1986. p. 13-85.

REVERSAT, G. Consumption of food reserves by starved second-stage juveniles of *Meloidogyne javanica* under conditions inducing osmobiogenesis. **Nematologica**, Leiden, v. 27, n. 2, p207-214, 1981.

REVERSAT, G. Effect of vitro storage time on the physiology of second stage juveniles of *Heterodera oryzae*. **Revue Nématologie**, Montrouge Cedex, v. 3, n. 2, p. 233-241, 1980.

ROBINSON, M. P.; ATKINSON, H. J.; PERRY, R. N. The influence of soil moisture and storage time on the motility, infectivity and lipid utilization of second stage juveniles of the potato cyst nematodes *Globodera rostochiensis* and *G. pallida*. **Revue Nématologie**, Montrouge Cedex, v. 10, n. 3, p. 343-348, 1987.

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

SAN JUAN, R. C. C.; MATIELLI, A.; ALMEIDA, S. L.; ALMEIDA, S. R.; MATIELLO, J. B. Evolução, durante o ciclo agrícola, do sistema radicular do cafeeiro no Sul de Minas Gerais e na Mogina-SP. In: Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras, 24. , 1998, Poços de Caldas. **Anais. . .** Poços de Caldas, 1998. p. 76.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. Cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, London, v. 30, n. 3, p. 507-512, Sept. 1974.

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

TAYLOR, A. L.; SASSER, J. N. **Biology identification and control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* species)**. Raleigh: North Carolina State University, 1978. 111 p.

VAN GUNDY, S. D.; BIRD, A. F.; WALLACE, H. R. Ageing and starvation in larvae of *Meloidogyne javanica* and *Tylenchulus semipenetrans*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 57, n. 6, p. 559-571, June 1967.

ARTIGO 3

Migração de *Meloidogyne incognita* e Hospedabilidade de Cultivares de Tomateiro a *M. exigua**

(Preparado de acordo com as normas da revista “Fitopatologia Brasileira”)

Fernando S. Rocha^{1}, Vicente P. Campos¹, Esdras H. da Silva¹ & Maria Clara Carli¹**

¹Universidade Federal de Lavras, Departamento de Fitopatologia, CEP 37200-000, Caixa Postal 3037, Lavras, MG, fax (0xx35) 3829-1283, e-mail: rochafsplant@yahoo.com.br

Autor para correspondência: Fernando S. Rocha

ROCHA, F.S., CAMPOS, V.P., SILVA, E.H. & CARLI, M.C. Migração de *Meloidogyne incognita* e hospedabilidade de cultivares de tomateiro a *M. exigua*. Fitopatologia Brasileira.

RESUMO

Neste trabalho, objetivou-se estudar a migração de juvenis do segundo estágio (J2) de *M. incognita* a diferentes distâncias do sistema radicular de tomateiros e o efeito da privação alimentar de *M. exigua* na infectividade e reprodução em cultivares de tomateiros Nemadoro e Kada. Os J2 de *M. incognita* foram colocados no inteiro de cilindros de 10 e 20 cm de diâmetro, revestidos nas laterais com tela de 0,36 mm de diâmetro. Externamente, foram semeadas ou transplantadas mudas de tomateiros cv. Kada ao seu redor. Noutro ensaio, J2 de *M. exigua* foram armazenados por 0, 3, 6, 9 e 12 dias em água parada a 28°C e inoculados em mudas de tomateiro das cultivares Nemadoro ou Kada. A infectividade e a reprodução dos J2 colocados a 10 cm de distância de tomateiros transplantados foram reduzidas em 76,74 e 92,31%, comparados com aqueles inoculados na rizosfera. O período de armazenamento reduziu o teor de

lipídios neutros, o número de galhas, massas de ovos e de ovos/g de raiz e também o FR de *M. exigua* nas cultivares de tomateiros Nemadoro e Kada. Observou-se maior infectividade e reprodução na cultivar Kada, comparada à Nemadoro com J2 recentemente eclodidos (testemunha), chegando a uma produção de ovos e de galhas/g de raiz superior a 74,54 e 87,41%, respectivamente. Segundo os FR, as cultivares Kada e Nemadoro foram classificadas como bons hospedeiros para J2 de *M. exigua* recentemente eclodidos e ruins quando os J2 foram estocados.

Palavras-chaves adicionais: Privação alimentar, lipídios neutros, migração, infectividade, reprodução, tomateiro, nematóide das galhas.

ABSTRACT

Migration of *Meloidogyne incognita* and host status of tomato cultivars to *M. exigua*

In this work to aimed study the migration of second stage juveniles (J2) of *M. incognita* at different distances of root systems tomatoes and the effect of starvation of *M. exigua* on infectividade and reproduction in Nemadoro and Kada cultivars tomato. The J2 of *M. incognita* were placed inside cylinders of 10 and 20 cm of diameter, covered covered with screen of 0,36 mm of diameter. Kada tomato cultivars were sowed or transplanted seedlings outside, around them. In another assay, the J2 of *M. exigua* were stored by 0, 3, 6, 9 and 12 days at 28°C and inoculated in Nemadoro or Kada seedlings. The infectivity and the reproduction of J2 placed at 10 cm of distance of transplanted tomato seedlings was reduced 76,74 and 92,31%, compared to those inoculated in seedlings rhizosphere. The storage period reduced the neutral lipid contents, the number of galls, the number of egg masses and the number of eggs/g of root and also the FR of J2 of *M. exigua* on Nemadoro and Kada tomato cultivars. Greatest infectivity and reproduction was observed in Kada cultivar compared to Nemadoro with recently hatched J2 (control), approaching the production of eggs and galls/g of root superior up to 74,54 and 87,41%, respectively. According to the FR, the cultivars Kada and Nemadoro were graded good hosts when inoculated with recently hatched J2 and bad hosts when inoculated with storaged J2.

Additional Keywords: Starvation, neutral lipids, migration, infectivity, reproduction, tomato, root-knot nematode.

INTRODUÇÃO

A penetração de *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood, 1949, na raiz, depende, entre outros fatores, da movimentação em resposta à atração pelos exsudatos radiculares da planta hospedeira e de suas reservas lipídicas (Bird, 1959; Christophers et al., 1997; Zhao et al., 2000). No entanto, a distância do nematóide da fonte de estímulo pode alterar sua orientação em direção à raiz, devido à perda do estímulo, aumentando, assim, seu período de permanência no solo e diminuindo sua sobrevivência (Bergeson, 1959). Outros fatores, como a textura do solo e o tamanho dos poros, também influenciam a migração do nematóide em direção à raiz da planta hospedeira (Prot & Van Gundy, 1981b; Robbins & Barker, 1974). O solo arenoso possui menor capacidade de retenção de água e maior oscilação de temperatura, podendo interferir também na migração.

Os nematóides de galhas *M. incognita*, *M. javanica* (Treub) Chitwood, 1949 e *M. hapla* Chitwood, 1949, são as espécies mais comuns em áreas cultivadas com tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.), causando sérios danos à cultura (Barker et al., 1976; Charchar et al., 2003; Chitwood, 1951). O controle genético emprega o plantio de cultivares resistentes que possuem o gene Mi, o qual confere resistência ao tomateiro contra as espécies *M. incognita*, *M. javanica* e *M. arenaria* (Smith, 1944), mas não a *M. hapla* (Roberts & Thomason, 1989). A resposta de resistência mediada pelo gene Mi deriva de uma reação de hipersensibilidade (HR), ocorrendo cerca de 12 horas após a inoculação de raízes com J2 de *Meloidogyne* (Dropkin, 1969).

* Parte da Tese de Doutorado do primeiro autor apresentada à Universidade Federal de Lavras. (2007).

** Bolsista do CNPq

O tomateiro do grupo Santa Cruz tem sido utilizada para a multiplicação de outras espécies de *Meloidogyne* em ensaios para seleção de resistência genética e/ou para comprovar a seletividade fisiológica ou a preferência de hospedeiro (Carneiro & Jorge, 2001). A variabilidade genética verificada entre populações de *M. exigua* (Gonçalves & Pereira, 1998; Ribeiro et al., 2005) pode levar a comportamento diferenciado entre cultivares de tomateiro. No entanto, ainda não se conhece bem a reação entre genótipos de tomateiro resistente e suscetível ao parasitismo de *Meloidogyne exigua* e o efeito da qualidade do inóculo no comportamento do tomateiro. Também a distância entre o nematóide e o sistema radicular da planta hospedeira tem sido pouco enfatizada nas pesquisas visando o controle de fitonematóides. Desta forma, objetivou-se, neste trabalho, estudar: a) o efeito da privação alimentar de juvenis do segundo estágio (J2) de *M. exigua* na infectividade e na reprodução em tomateiros das cultivares Nemadoro e Kada e b) a capacidade de migração de J2 de *M. incognita* colocados a diferentes distâncias do sistema radicular de tomateiros.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção de mudas de tomateiro: Sementes de tomateiro cv. Nemadoro e Kada foram semeadas em bandejas contendo substrato Plantmax[®] e mantidas em casa-de-vegetação. Mudas de tamanho ideal para o transplântio e instalação dos ensaios foram obtidas 35 dias após a semeadura.

Obtenção de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita* e *M. exigua*: Raízes de plantas de tomateiros (cv. Kada) cultivados em casa-de-vegetação e infestadas com *M. incognita* e raízes infestadas de cafeeiros com *M. exigua*, obtidas no setor de cafeicultura do Departamento de Agricultura, da Universidade Federal de Lavras, foram lavadas cuidadosamente e cortadas em pedaços de 1 cm. A seguir, foram trituradas em liquidificador por 40s em

solução de hipoclorito de sódio 0,5 %, seguindo-se a técnica de Hussey & Barker (1973), modificada por Boneti & Ferraz (1981). Em seguida, colocaram-se, aproximadamente, 3 g de caulim por tubo, realizando-se a limpeza dos ovos pela técnica de Coolen & D'Herde (1972). Os ovos retidos na peneira de 0,025 mm foram recolhidos em bquer de 500 mL e colocados em câmara de eclosão, formada com tela e papel de espessura fina, para a obtenção dos J2 à temperatura ambiente.

Instalação e avaliação dos ensaios: Para o ensaio de migração de *M. incognita*, no centro de caixas de madeira de 1 m² e 15 cm de altura mantidas em casa-de-vegetação foram colocados cilindros de 10 e 20 cm de diâmetro (Figuras 1A e B), formados por um aro na abertura superior e fundo fechado com madeira, revestido nas laterais com tela de 0,36 mm de diâmetro de poro (Figura 1B), evitando-se assim, o crescimento da raiz em direção ao nematóide. Dessa forma, o centro dos cilindros de 10 e 20 cm de diâmetro até a superfície da tela tinham distância de 5 e 10 cm, respectivamente (Figura 1A). No interior do cilindro, adicionou-se o mesmo substrato usado na caixa, formado de solo e areia, na proporção de 1:1, previamente esterilizado com brometo de metila. Externamente ao cilindro foram semeadas ou transplantadas mudas de tomateiros da cultivar Kada. Foram estabelecidos dois tratamentos: semeadura direta e transplantio. Ao redor dos cilindros de 10 e 20 cm de diâmetro foram feitas 6 e 8 covas, respectivamente, e completadas com 50 cm³ de Plantmax®, onde foram semeados tomateiros cv. Kada, diretamente. Após a emergência foi feito o desbaste, deixando-se apenas uma muda por cova. Noutro tratamento, as mudas foram obtidas em bandejas de isopor utilizando-se o substrato Plantmax® fora das caixas e transplantadas para elas 35 dias após a semeadura, externamente aos cilindros. Na testemunha, foram empregadas mudas formadas em bandejas de isopor e transplantadas para o centro de caixas sem os cilindros. Para o ensaio, foram utilizados J2 de *M. incognita*, recolhidos no terceiro dia,

quantificados em microscópio de objetivas invertidas e calibrada a suspensão para 1.700 J2/ mL. Cerca de 17.000 J2 de *M. incognita* em 10 mL de suspensão foram colocados no centro dos cilindros aos 35 dias após a semeadura ou no momento do transplântio das mudas de tomateiro, com uma pipeta automática, em orifício feito no substrato, com bastão de vidro, na profundidade de ± 3 cm. Na testemunha, os J2 foram colocados ao lado da rizosfera de 2 plantas mantidas no centro da caixa sem os cilindros. Após a adição dos J2, a parte superior dos cilindros foi coberta com papel alumínio para evitar a perda de umidade do solo. Diariamente, retirava-se o papel alumínio para verificar a umidade do solo e realizavam-se as irrigações por pulverização com solução básica de Hoagland & Arnon (1950). A temperatura do solo foi monitorada por sensores colocados dentro das caixas e próximos do cilindro, conectados por cabos, a “datallogers” (Davis).

Utilizou-se o delineamento em blocos ao acaso, com fatorial 3 x 2, sendo estudadas três distâncias de inoculação (0, 5 e 10 cm) e dois tipos de plantio (direto e transplântio), em 4 repetições.

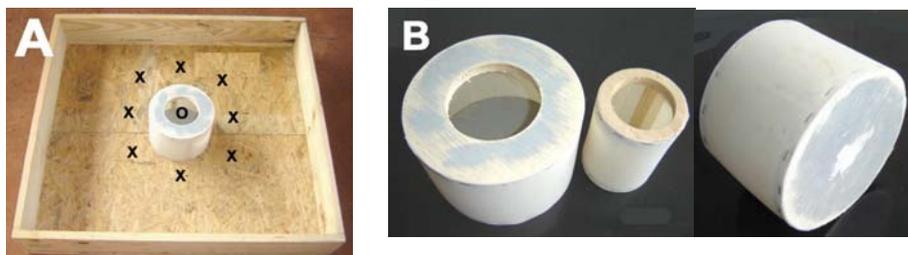


FIG. 1 - Vista da caixa de madeira e dos cilindros. A) Caixa de madeira com cilindro no centro (o = local de adição dos J2 de *M. incognita*; x = locais de semeadura ou transplântio da mudas de tomateiros); B: Cilindros de 10 e 20 cm de diâmetro, formato do aro e fundo de madeira revestido com tela.

Da suspensão de J2 de *M. incognita* empregada no ensaio, retiraram-se 5 mL para determinar a percentagem de mobilidade e a concentração de lipídios neutros no corpo do J2 por meio da análise de imagem da área colorida de

vermelha com o corante “Oil Red O” (Campos, 2003; Christophers et al., 1997; Storey, 1983). A partir das fotografias dos J2, utilizou-se o programa “*Image Tool for Windows*” para estimar a área total do corpo do J2 e aquela de coloração vermelha correspondente à de lipídios. Desta forma, a partir da área de coloração vermelha, obteve-se o percentual de lipídios neutros em relação à área total do corpo dos J2 de *M.incognita*.

Aos 20 dias após a infestação com J2 de *M. incognita*, retiraram-se os cilindros das caixas de cada tratamento, sem causar distúrbio no solo ao redor das mudas de tomateiro. A seguir, o substrato no interior de cada cilindro foi retirado com uma espátula e colocado em saco plástico. No laboratório, as amostras foram processadas para a extração dos J2 conforme técnica de Jenkins (1964). A seguir, adicionou-se, no local dos cilindros, o mesmo substrato das caixas. No laboratório, os J2 de *M. incognita* foram examinados e contados sob microscópio de objetivas invertidas, estimando-se a percentagem de mobilidade dos J2 em cada amostra de solo. Os J2 foram considerados imóveis quando não se movimentavam ou quando apresentavam o corpo com aspecto retilíneo ou retorcido. Em seguida, as suspensões de cada tratamento foram colocadas em tubo de vidro, centrifugadas a 2.000 rpm por 3 minutos, concentrando-as em, aproximadamente, 0,5 mL para determinar a concentração de lipídios neutros no corpo do J2, pela análise de imagens, conforme descrito anteriormente.

Trinta dias após a inoculação, cortou-se a parte aérea dos tomateiros e as raízes foram separadas do solo e lavadas em água parada. A seguir, as massas de ovos nos sistemas radiculares foram coloridas de vermelho, em solução contendo corante artificial empregado na fabricação de sucos, conforme técnica de Rocha et al. (2005). Após a coloração, as raízes foram deixadas sobre papel toalha por 10 min, possibilitando, assim, a avaliação do peso da matéria fresca das raízes, seguida da contagem do número de massas de ovos e 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 objetivas invertidas, quantificou-se o número de ovos de *M. incognita* por sistema radicular. Em seguida, estimou-se o número de galhas, massas de ovos e de ovos/ g de raiz.

Os dados foram transformados em $\sqrt{x + 0.5}$ e, em seguida, submetidos à análise de variância e teste de Scott & Knott (1974), a 5% de probabilidade, para a comparação das médias. As análises foram realizadas pelo programa Sisvar.

Para o ensaio de hospedabilidade de cultivares de tomateiro a *M. exigua*, J2 desta espécie foram recolhidos no terceiro dia e quantificados em microscópio de objetivas invertidas. A suspensão foi calibrada em 1.000 J2/mL e, neles, fez-se a determinação de lipídios neutros pelo método de análise de imagens. Em seguida, armazenou-se a suspensão de J2 por 3, 6, 9 e 12 dias em água parada, em estufa incubadora (B.O.D.) a 28°C. Em cada período de armazenamento, obtiveram-se 2 mL da suspensão e os lipídios neutros dos J2 foram coloridos com “Oil Red O”, estimando-se o seu percentual médio. Após cada período de armazenamento, 2.700 J2 foram inoculados em mudas de tomateiro, cultivadas em copos plásticos de 300 mL de volume contendo substrato na proporção 1:1:1 (solo: areia: esterco). Na testemunha, foram inoculados J2 recentemente obtidos. Na inoculação, os J2 foram dispersos em 4 mL de água e colocados em 2 furos de ± 3 cm de profundidade ao redor das mudas. A seguir, os copos foram incubados em sala climatizada à temperatura de 27 ± 2 °C e fotoperíodo de 14 h de luz.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com oito repetições.

Sessenta dias após a inoculação dos J2, quantificou-se o número de massas de ovos, galhas e de ovos de *M. exigua* por sistema radicular. O cálculo

do fator de reprodução (FR) foi obtido pela divisão entre as densidades populacionais final e inicial para cada tratamento ($FR= Pf/Pi$), conforme proposto por Seinhorst (1967), segundo o qual plantas com $FR < 1$ são consideradas más hospedeiras, com $FR=1$ boas hospedeiras e $FR=0$ não hospedeiras.

Os dados foram transformados em $\sqrt{x + 0.5}$ e, em seguida, submetidos à análise de variância e teste de Scott & Knott (1974), a 1% de probabilidade, para a comparação das médias. As análises de regressão e teste de médias foram realizadas pelo programa estatístico Sisvar.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeito da inoculação de juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne incognita* em diferentes distâncias de tomateiros na infectividade e reprodução

Não houve significância na interação distância do inóculo e tipo de plantio. Os J2 que permaneceram no substrato dentro do cilindro por 20 dias, à distância de 5 e 10 cm das raízes de tomateiros transplantados ou por semeadura direta, tiveram mobilidades semelhantes (Figura 2). Entretanto, na testemunha, a mobilidade foi até 66,32% maior (Figura 2). O teor de lipídios foi menor ($P \leq 0,05$) nos J2 extraídos dos cilindros em que os tomateiros foram transplantados, comparados com a semeadura direta, mas não foi afetado pela distância do inóculo em relação à raiz (Figura 3). Na testemunha, o teor de lipídio dos J2 no substrato foi até 83,8% maior (Figura 3). A infectividade e a reprodução de *M. incognita* não foram afetadas quando o inóculo foi adicionado a 5 ou 10 cm das raízes. Entretanto, foi significativamente maior na testemunha (Tabela 1).

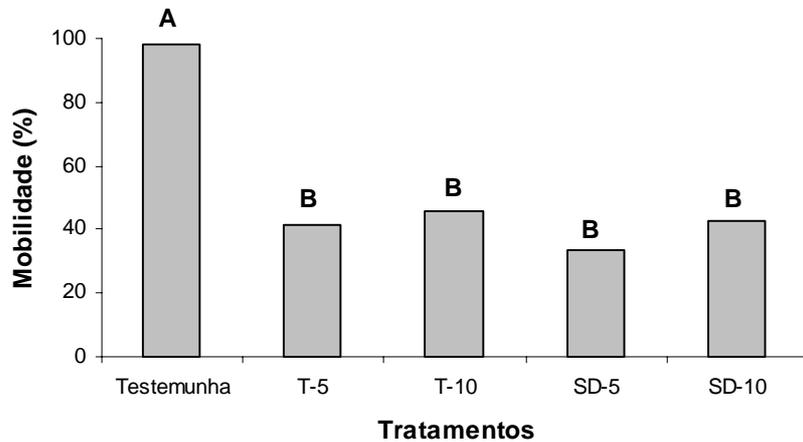


FIG. 2 - Percentagem de mobilidade de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita* extraídos do solo do centro dos cilindros, aos 20 dias após a infestação com J2. Testemunha: mobilidade dos J2 no momento da infestação dos cilindros; T-5: J2 colocados a 5 cm de distância dos tomateiros transplantados; T-10: J2 colocados a 10 cm de distância dos tomateiros transplantados; SD-5: J2 colocados a 5 cm de distância dos tomateiros cultivados por semeadura direta no solo; SD-10: J2 colocados a 10 cm de distância dos tomateiros cultivados por semeadura direta no solo. Barras seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott & Knott (1974), a 5% de probabilidade.

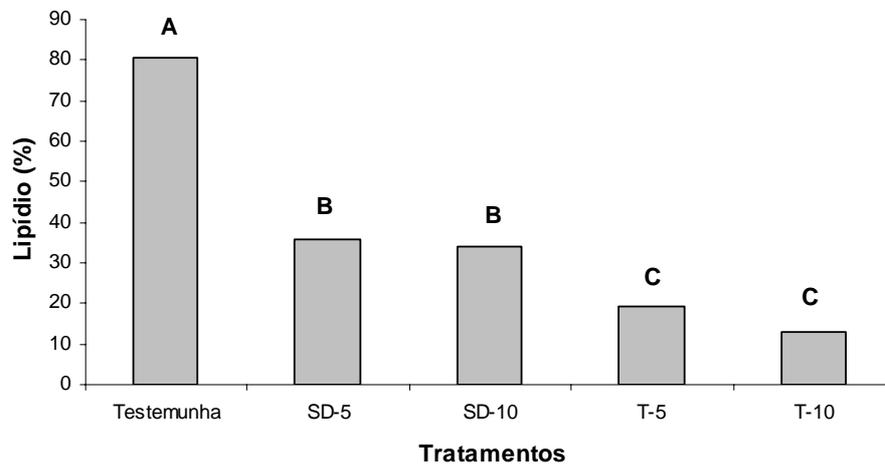


FIG. 3 - Percentagem de lipídios neutros dos juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita* recuperados no solo do centro dos cilindros, aos 20 dias após a infestação dos J2. Testemunha: teor de lipídio dos J2 no momento da infestação dos cilindros; T-5: J2 colocados a 5 cm de distância dos tomateiros transplantados; T-10: J2 colocados a 10 cm de distância dos tomateiros transplantados; SD-5: J2 colocados a 5 cm de distância dos tomateiros cultivados por semeadura direta no solo; SD-10: J2 colocados a 10 cm de distância dos tomateiros cultivados por semeadura direta no solo. Barras seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Scott & Knott (1974), a 5% de probabilidade.

TABELA 1 - Efeito da infestação de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita* no solo, a diferentes distâncias de tomateiros, na infectividade e reprodução.

Tratamentos	Nº galhas/g de raiz	Nº massas/g de raiz	Nº ovos/g de raiz
Testemunha 1	86 a	58 a	7861 a
Testemunha 2	83 a	54 a	7398 a
T-5	23 b	10 b	721 b
T-10	20 b	7 b	604 b
SD-5	15 b	13 b	1493 b
SD-10	14 b	13 b	1363 b
CV(%)	40,14	69,04	51,28

Testemunha 1: J2 inoculados ao lado da rizosfera dos tomateiros transplantados; Testemunha 2: J2 inoculados ao lado da rizosfera dos tomateiros cultivados por semeadura direta; T-5: J2 colocados a 5 cm de distância dos tomateiros transplantados; T-10: J2 colocados a 10 cm de distância dos tomateiros transplantados; SD-5: J2 colocados a 5 cm de distância dos tomateiros cultivados por semeadura direta no solo; SD-10: J2 colocados a 10 cm de distância dos tomateiros cultivados por semeadura direta no solo. Médias seguidas por letras distintas, nas colunas, diferem entre si, pelo teste de Scott & Knott (1974), a 5% de probabilidade.

Na população dos J2 de *M. incognita*, poucos tiveram sucesso em percorrer a distância de 5 e 10 cm em direção ao sistema radicular dos tomateiros, isto é, entre 16,27 e 26,74%, expresso pelo número de galhas/g de raiz (Tabela 1). Como a umidade do solo foi mantida constante e as temperaturas médias diurna e noturna foram favoráveis, isto é, 22,4°C e 20,38°C, outros fatores interferiram na migração dos J2, como o fotoperíodo, a resposta ao estímulo dos exsudatos e a perda da reserva lipídica. Prot & Van Gundy (1981a) verificaram que aproximadamente 33% dos J2 de *M. incognita* migraram verticalmente 20 cm em 7 dias quando colocados sob 12 horas de luz e 12 horas de escuro, enquanto apenas 7% migraram quando a luz foi constante durante 24 horas.

A maior perda de lipídios neutros dos J2 colocados no centro dos cilindros em que os tomateiros foram transplantados, ao que tudo indica, está relacionado a maior atividade de movimentação dos J2 no substrato, o que levou ao gasto rápido, em torno de 83,8%, de suas reservas lipídicas corporais (Figura 3). Essa atividade muscular pode estar relacionada à distribuição física das raízes e/ou à falta de um gradiente na concentração de substâncias exsudadas pela raiz devido ao estresse sofrido durante o transplante, o que possibilitou a falta de orientação dos J2 e atração desordenada por outros agentes atrativos. Dessa forma, a falta de mobilidade e a redução drástica do lipídio corporal não possibilitaram a maioria dos J2 de alcançarem a raiz. Entretanto, os que penetraram na raiz tiveram menor reprodutividade do que nas caixas em que os tomateiros foram semeados diretamente, apesar de não diferirem estatisticamente (Tabela 1). Van Gundy et al. (1967) verificaram que os J2 de *M. javanica* aumentaram sua atividade quando o solo foi cultivado com a planta hospedeira. Robinson et al. (1987) observaram redução significativa na mobilidade e na infectividade de J2 de *Globodera rostochiensis* e *G. pallida* após perdas superiores de 65% do lipídio original.

Prot & Van Gundy (1981b) verificaram que os J2 de *M. incognita* migraram 20 cm até a raiz de tomateiro, quando as frações de argila e silte foram reduzidas para 32,7 e 14%, respectivamente, demonstrando que a maior capacidade de migração está associada a solos arenosos. Koenning et al. (1996) relataram que, em algodoeiros cultivados em solos arenosos, as populações de *M. incognita* raças 3 e 4 tiveram maiores densidades do que em solos argilosos, causando maior dano à cultura.

Efeito da privação alimentar de juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne exigua* na infectividade e reprodução em tomateiros das cultivares Nemadoro e Kada

O armazenamento dos J2 de *Meloidogyne exigua* causou a redução do teor de lipídios neutros ao longo do período de avaliação (Figura 4). A perda lipídica dos J2 proporcionou decréscimo no número de galhas, massas de ovos e de ovos/g de raiz e também no FR, em cultivares de tomateiros Nemadoro e Kada (Tabelas 2 e 3). Reduções significativas no número de ovos e massas de ovos/g de raiz já ocorreram quando os J2 foram inoculados em tomateiro cv. Kada após 3 dias de estocagem em água, comparado com a testemunha (Tabela 2). O número de ovos/g de raiz foi reduzido significativamente quando os J2 foram inoculados por 9 e 12 dias, com o FR chegando a menos de 1 quando os J2 foram armazenados por 12 dias (Tabela 2). Contudo, na cultivar Nemadoro, redução significativa no número de galhas, massas de ovos, ovos/g de raiz e FR ocorreu a partir da estocagem dos J2 por 3 dias, comparados à testemunha (Tabela 3). O FR só foi superior a 1 quando ocorreu inoculação de J2 recentemente eclodidos (Tabela 3). Observou-se produção de ovos e de galhas/g de raiz 74,54 e 87,41% maior na cultivar Kada em relação a Nemadoro, quando analisadas apenas as testemunhas dos dois ensaios (Tabelas 2 e 3).

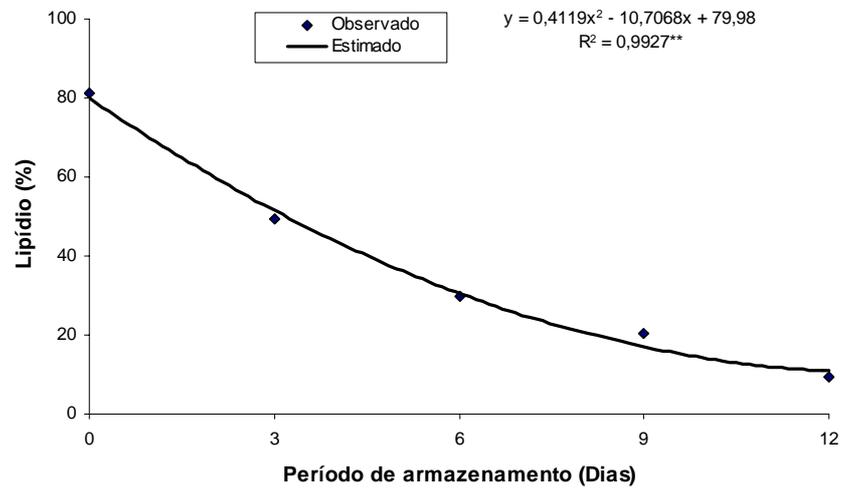


FIG. 4 - Percentagem de lipídio corporal dos juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne exigua* armazenados em água parada, a 28°C, por diferentes períodos e inoculados após cada período de armazenamento, em mudas de tomateiro.

TABELA 2 - Valores médios do número de galhas, massas de ovos e de ovos por grama de raiz e do fator de reprodução (FR), após estocagem de juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne exigua* em água, a 28°C e inoculados em tomateiro cv. Kada.

Tratamentos	Galhas/g de raiz	Massas de ovos/g de raiz	Ovos/g de raiz	FR
0 dia (testemunha)	143 a	137 a	17571 a	39,57 a
3 dias	139 a	53 b	10083 b	24,63 a
6 dias	100 a	28 c	5964 b	20,85 a
9 dias	54 b	9 c	1915 c	6,26 b
12 dias	2 b	0 c	151 d	0,23 b
CV (%)	19,71	23,51	17,27	24,96

Médias seguidas por letras distintas, na coluna, diferem entre si, pelo teste de Scott & Knott (1974), a 1% de probabilidade.

TABELA 3 - Valores médios do número de galhas, massas de ovos e de ovos por grama de raiz e do fator de reprodução (FR), após estocagem de juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne exigua* em água, a 28°C e inoculados em tomateiro cv. Nemadoro.

Tratamentos	Galhas/g de raiz	Massas de ovos/g de raiz	Ovos/g de raiz	FR
0 dia (testemunha)	18 a	10 a	4474 a	8,99 a
3 dias	1 b	0 b	120 b	0,10 b
6 dias	0 b	0 b	23 b	0,03 b
9 dias	0 b	0 b	18 b	0,02 b
12 dias	0 b	0 b	8 b	0,01 b
CV (%)	61,34	80,19	134,16	81,02

Médias seguidas por letras distintas, na coluna, diferem entre si, pelo teste de Scott & Knott (1974), a 1% de probabilidade.

De acordo com os critérios de Seinhorst (1967), observou-se que as duas cultivares, Nemadoro e Kada, mostraram-se boas hospedeiras, pois apresentaram FR maiores do que 1, isto é, 39,57 e 8,99 (Tabelas 2 e 3). No entanto, com o armazenamento em água parada, a 28°C, ocorreu gasto das reservas lipídicas, devido à atividade muscular exercida durante a movimentação (Figura 4). Essa perda das reservas corporais afetou a infectividade e a reprodução, expressas pelo número de galhas, massas de ovos e de ovos/g de raiz. Por conseguinte, o FR foi reduzido afetando o comportamento dos tomateiros quanto à classificação genética de resistência a *M. exigua*, passando de bom hospedeiro para hospedeiro ruim. Apesar de as cultivares terem apresentado classificação semelhante quanto à resistência, pode-se observar que, mesmo ocorrendo redução na reprodução na cultivar Nemadoro, diferentemente de Kada, o FR

ficou abaixo de 1 quando os J2 foram estocados por 3 dias (Tabelas 2 e 3). Essa redução drástica na reprodução, ao que tudo indica, a cultivar Kada possui maior hospedabilidade a *M. exigua* do que a Nemadoro. Oliveira et al. (2005) estudaram a variabilidade fisiológica de 10 populações de *M. exigua*, provenientes de cafezais da Zona da Mata de Minas Gerais, em plantas diferenciadoras para os nematóides das galhas, e verificaram que a reprodução dessas populações em plantas de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* 'Rutgers') e pimentão (*Capsicum annum* 'Early Califórnia Wonder') foi maior que em mudas de cafeeiro (*Coffea arabica* 'Catuaí'), utilizadas como padrão de suscetibilidade, bem como em feijão, soja, cacau, cebola e melancia.

Conforme os resultados obtidos, pode-se inferir que a qualidade do inóculo empregado nos ensaios de seleção de cultivares para avaliação de resistência genética afeta a classificação dos mesmos na separação entre resistente e suscetível.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARKER, K. R.; SHOEMAKER, P. B.; NELSON, I. A. Relationship of initial population densities of *Meloidogyne incognita* and *M. hapla* to yield of tomato. **Journal of Nematology**, Lakeland, v. 8, n. 3, p. 232-239, 1976.

BERGESON, G. B. The influence of temperature on the survival of some species of the genus *Meloidogyne*, in the absence of a host. **Nematologica**, Leiden, v. 4, p. 344-354, 1959.

BIRD, A. F. The attractiveness of roots to the plant parasitic nematodes *Meloidogyne javanica* and *M. hapla*. **Nematologica**, Leiden, v. 4, p. 322-335, 1959.

BONETI, J. I. S.; FERRAZ, S. Modificação do método de Hussey e Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 6, n. 3, p. 553, out. 1981. (Resumo).

CAMPOS, H. D. **Aspectos do parasitismo e da privação alimentar do nematóide de galhas (*Meloidogyne javanica*) e do cisto (*Heterodera glycines*) em soja**. 2003. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

CARNEIRO, R. M. D. G.; JORGE, C. L. Seletividade fisiológica de populações de *Meloidogyne incognita* e *M. paranaensis*, quando multiplicadas durante sucessivas gerações em tomateiros e cafeeiros. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 2., 2001, Vitória, ES. **Anais...** Vitória, ES, 2001. p. 24-27.

CHARCHAR, J. M.; GONZAGA, V.; GIORDANO, L. B.; BOITEUX, L. S.; REIS, N. V. B.; ARAGÃO, F. A. S. Reação de cultivares de tomateiro à infecção por população mista de *Meloidogyne incognita* raça 1 e *M. javanica* em estufa plástica e campo. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 1, p. 49-54, jun. 2003.

CHITWOOD, B. G. Root-knot nematodes. II- Quantitative relation of the root-knot nematode-*Meloidogyne hapla* Chitwood, 1949 with tomatoes, onions and lima beans. **Plant and Soil**, The Hague, v. 3, n. 1, p. 47-50. 1951.

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, Jan. 1997.

COOLEN, W. A.; D'HERDE, C. J. **A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue culture**. Ghent: State Agriculture Research Centre, 1972. 77 p.

DROPKIN, V. H. The necrotic reaction of tomatoes and other hosts resistant to *Meloidogyne*: Reversal by temperature. **Phytopathology**, St. Paul, v. 59, n. 11, p. 1632-1637, Nov. 1969.

GONÇALVES, W.; PEREIRA, A. A. Resistência do cafeeiro a nematóides IV- Reação de cafeeiros derivados do Híbrido de Timor a *Meloidogyne exigua*. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 1, p. 39-49, jan. 1998.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. **The water culture method of growing plants without soil**. Berkeley: University of California, 1950.

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

JENKINS, W. R. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. **Plant Disease Reporter**, St. Paul, v. 48, p. 692, 1964. (Abstract).

KOENNING, S. R.; WALTERS, S. A.; BARKER, K. R. Impact of soil texture on the reproductive and damage potentials of *Rotylenchulus reniformis* and *Meloidogyne incognita* on cotton. **Journal of Nematology**, Lakeland, v. 28, n. 4, p. 527-536, Dec. 1996.

OLIVEIRA, D. S.; OLIVEIRA, R. D. L.; SILVA, R. V. Caracterização fisiológica de populações de *Meloidogyne exigua* associadas a cafeeiros na Zona da Mata de Minas Gerais. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 2, p. 279-283, dez. 2005.

PROT, J. C.; VAN GUNDY, S. D. Effect of soil texture and the clay component on migration of *Meloidogyne incognita* second-stage juveniles. **Journal of Nematology**, Lakeland, v. 13, n. 2, p. 213-217, 1981a.

PROT, J. C.; VAN GUNDY, S. D. Influence of photoperiod and temperature on migration of *Meloidogyne* juveniles. **Journal of Nematology**, Lakeland, v. 13, p. 217-220, 1981b.

RIBEIRO, R. C. F.; PEREIRA, A. A.; OLIVEIRA, C. H.; LIMA, R. D. Resistência de progênies de híbridos interespecíficos de *Coffea arabica* e *Coffea canephora* a *Meloidogyne exigua*. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 1, p. 11-16, jan. 2005.

ROBBINS, R. T.; BARKER, K. R. The effects of soil type, particle size, temperature, and moisture on reproduction of *Belonolaimus longicaudatus*. **Journal of Nematology**, Lakeland, v. 6, n. 1, p. 1-6, Jan. 1974.

ROBERTS, P. A.; THOMASON, I. J. A review of variability in four *Meloidogyne* spp. measured by reproduction on several hosts including *Lycopersicon*. **Agricultural Zoology Reviews**, v. 3, p. 225-252, 1989.

ROBINSON, M. P.; ATKINSON, H. J.; PERRY, R. N. The influence of soil moisture and storage time on the motility, infectivity and lipid utilization of second stage juveniles of the potato cyst nematodes *Globodera rostochiensis* and *G. pallida*. **Revue de Nématologie**, Montrouge Cedex, v. 10, p. 343-348, 1987.

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

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. Cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, London, v. 30, n. 3, p. 507-512, Sept. 1974.

SEINHORST, J. W. The relationship between population increase and population density in plant parasitic nematodes. I. Definitions of the terms host, host status and resistance. 4. The influence of external conditions on the regulation of population density. **Nematologica**, Leiden, v. 13, p. 429-450, 1967.

SMITH, P. G. Embryo culture of a tomato species hybrid. **Proceeding of the American Society Horticulture Science**, Madison, v. 44, p. 413-416, 1944.

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

VAN GUNDY, S. D.; BIRD, A. F.; WALLACE, H. R. Aging and starvation in juvenile of *Meloidogyne javanica* and *Tylenchulus semipenetrans*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 57, n. 6, p. 559-571, June 1967.

ZHAO, X.; SCHMITT, M.; HAWES, C. M. Species-dependent effects of border cell and root tip exudates on nematodes behavior. **Phytopathology**, St. Paul, v. 90, n. 11, p. 1239-1245, Nov. 2000.

ARTIGO 4

Período de Armazenamento e Distância do Inóculo em Relação ao Sistema Radicular da Soja na Migração Vertical de *Meloidogyne incognita*¹

(Preparado de acordo com as normas da revista “Nematologia Brasileira”)

FERNANDO DA SILVA ROCHA^{1,2}, VICENTE PAULO CAMPOS²,
ESDRAS HENRIQUE DA SILVA², MARIA CLARA CARLI² &
LILIAN SIMARA ABREU SOARES COSTA²

¹ Parte da Tese de Doutorado do primeiro autor, apresentada à Universidade Federal de Lavras/UFLA para a obtenção do título de Doutor.

² Universidade Federal de Lavras, UFLA, Departamento de Fitopatologia, C.P. 3037, CEP 37200-000, Lavras-MG. E-mail: rochafsplant@yahoo.com.br

Resumo – Rocha, F.S., V.P. Campos, E.H. Silva, M. C. Carli & L. S. A. S. Costa. 2007. Período de armazenamento e distância do inóculo em relação ao sistema radicular da soja na migração vertical de *Meloidogyne incognita*.

Estudou-se o efeito da distância do sistema radicular e do período de armazenamento na perda do lipídio corporal e na migração vertical de juvenis do segundo estágio (J2) de *M. incognita*. Os J2 de *M. incognita* foram colocados em tubos de vidro contendo areia umedecida e separados do sistema radicular da soja por tela de 0,36 mm de diâmetro de poro a 0, 2, 4 e 6 cm de distância. Na testemunha, os J2 foram colocados na superfície da areia após o plantio da soja, sem tela excludora. Os tubos foram vedados e armazenados em sala climatizada a $27 \pm 2^\circ\text{C}$ por 5, 10, 15 e 20 dias. Em cada período de armazenamento, avaliaram-se o número de juvenis no interior da raiz, de J2 no substrato e o teor de lipídios neutros dos J2 recuperados da areia. Noutro ensaio, os tubos com

areia umedecida receberam a mesma quantidade de inóculo e, sobre ele, adicionou-se areia, definindo-se as mesmas distâncias, porém, sem tela excludora de raiz e plântula de soja. Após o armazenamento dos tubos por 5, 10, 15 e 20 dias, colocou-se tela excludora e, sobre ela, areia para o plantio da soja, armazenando-os novamente por 5 dias. Na testemunha, os J2 foram armazenados em água e colocados nos tubos de forma similar ao ensaio anterior. As percentagens de J2 que migraram verticalmente a 2, 4 e 6 cm de distância, após 5 dias, foram 63, 42 e 18%, respectivamente, expressa pelo número total de *M. incognita* no interior da raiz. O número de J2 que permaneceu no substrato sem penetrar na raiz de soja foi maior nas distâncias de 4 e 6 cm e não diferiram entre si a partir do 10º dia de avaliação. O período de permanência do J2 no substrato afetou significativamente a perda das reservas energéticas e declinou ao longo do período de avaliação. Aos 5 dias de armazenamento em areia a perda de lipídio corporal do J2 foi de 43-24%. Aos 10 dias de estocagem dos J2 em areia e água ocorreu perda de 81 a 90,5% no teor de lipídios neutros em relação ao nível original, proporcionando redução entre 88,63 a 98,86% na penetração dos J2, chegando a quase nula a partir desse período de armazenamento. Com a redução na penetração ocorreu aumento no número de J2 presentes na areia a partir do 5º dia de armazenamento, permanecendo constante a partir de 10 dias de estocagem.

Palavras-chave: Lipídios neutros, migração, penetração, nematóides das galhas, soja.

Summary - Rocha, F.S., V.P. Campos, E.H. Silva, M. C. Carli & L. S. A. S. Costa. 2007. Storage period and inoculum distance among root system of soybean on vertical migration of *Meloidogyne incognita*.

The effect of distance of root systems and the storage period on loss body lipid and vertical migration of second stage juveniles (J2) of *M. incognita*. The J2 of *M. incognita* were introduced into the glass tubes containing moistened sand and separated from soybean root system by screen of 0,36 mm of pore diameter at 0, 2, 4 and 6 cm of distance. In the control the J2 were placed at the surface of the sand after planting soybean, without separated screen. The tubes were closed and stored in controlled room at $27 \pm 2^\circ\text{C}$ by 5, 10, 15 and 20 days. After each period, the number of J2 inside of the root, and in the substratum besides of neutral lipid contents of J2 extracted from the sand were evaluated. In another assay, the tubes with moistened sand containing the same amount of inoculum at the similar distance, without separated screen and soybean were stored by 5, 10, 15 and 20 days. After storage the screen was introduced and sand was placed upon it for planting soybean. The tubes were

stored again by 5 days. In the control the J2 were stored in water and introduced into sand by similar way as in previous assay. The percentage of J2 that migrated vertically from 2, 4 and 6 cm of distance after 5 days was 63, 42 and 18%, respectively, expressed by the total number of *M. incognita* inside of the root. The number of J2 that remained in the substratum was greatest at the distances of 4 and 6 cm and did not differ among themselves after 10 day of evaluation. The J2 period in the substratum affected the loss of the stored energy which reduced along the evaluation period. At 5 days of storage in sand the losses of body lipids of J2 was 43-24%. At 10 days of J2 storage in sand and water occurred losses of 81 to 90,5% on the neutral lipid contents in relation to the original level, causing reduction from 88,63 to 98,86% at the penetration of J2, approaching almost null after this storage period. With the reduction in the penetration occurred increase on the number of J2 present in the sand after 5th day of storage, remaining constant after 10 days.

Key words: Neutral lipids, migration, penetration, root-knot nematodes, soybean.

Introdução

O processo de movimentação do juvenil do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne* spp. em direção à raiz é resultante da resposta à atração pelo local de penetração na raiz (Endo, 1975; Young, 1992), sendo o gradiente de concentração de compostos químicos exsudados pelas raízes da planta hospedeira o principal fator responsável no direcionamento do nematóide (Griffin & Waite, 1971; Klingler, 1965; Zhao et al., 2000). De fato, as raízes das plantas exsudam substâncias em composição e concentração diferentes (Rovira, 1969). No entanto, a distância do nematóide em relação à fonte de estímulo e a concentração das substâncias emanadas pela raiz podem influenciar a percepção pelo nematóide, causando mudança na taxa de atividade ou na frequência de movimentação (Rodger et al., 2003). Outros fatores, como temperatura, umidade, textura do solo e fotoperíodo, também são importantes para a migração

vertical dos fitonematóides (Prot, 1978; Prot & Van Gundy, 1981a e b, Prot & Van Gundy, 1979).

A penetração de *Meloidogyne* spp. ocorre nas raízes novas especificamente na coifa da raiz (Campos, 2003; Hussey & Williamson, 1998; Wallace, 1973). Daí, a distância que algumas espécies de nematóide movem-se à procura deste local da raiz tem sido relatada por alguns pesquisadores (Lavalley & Rohde, 1962; Prot, 1980; Virglierchio, 1961). No solo, os J2 podem migrar verticalmente em direção ao sistema radicular a uma distância entre 5 a 75 cm (Prot, 1978; Prot & Van Gundy, 1981a e b, Prot & Van Gundy, 1979), porém, em proporções diferentes, variando também com a espécie do nematóide.

Logo após a eclosão, o J2 se torna mais suscetível às condições ambientais (Bergenson, 1959), podendo perder sua infectividade devido ao gasto de suas reservas lipídicas (Christophers et al., 1997; Reversat, 1981). Campos (2003) observou que a perda de 38,82% do teor de lipídio em J2 de *Meloidogyne javanica* representa uma redução na patogenicidade, com reduções de 73,68 e 60,32% no número de fêmeas e massas de ovos, respectivamente, nas raízes parasitadas. A intensa atividade muscular do J2 em resposta ao estímulo da raiz ou o retardamento na penetração leva à queda rápida do teor de lipídio, constituindo no principal dreno da energia acumulada. Entretanto, detalhes deste processo de migração vertical relativo ao gasto das reservas lipídicas ainda não foram investigados. Desta forma, objetivou-se, neste trabalho, estudar o efeito da distância do sistema radicular e do período de armazenamento na perda do lipídio corporal e na migração vertical de juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne incognita*.

Material e Métodos

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 passada em peneira de abertura de malhas 0,850 mm, previamente esterilizada por meio da tríplice autoclavagem a 120°C por 30 min, e umedecida com água. Em seguida, foram colocadas em câmara climatizada com 14 h de luz e 10 h de escuro à temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$, para permitir a germinação. Após 72 h, as plântulas de soja com radícula de 2 cm de comprimento foram selecionadas para a instalação dos ensaios.

Obtenção de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita*: Raízes de tomateiros (*L. esculentum* Mill. cv Kada) cultivados em casa-de-vegetação e infestados com *M. incognita* foram lavadas cuidadosamente e cortadas em pedaços de, aproximadamente, 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), modificada por Boneti & Ferraz (1981). Em seguida, colocaram-se, aproximadamente, 3 g de caulim por tubo, realizando-se a limpeza dos ovos pela técnica de Coolen & D'Herde (1972). Os ovos retidos na peneira de 0,025 mm foram recolhidos em béquer de 500 mL, utilizando-se pisseta contendo água destilada. Para a obtenção dos J2, utilizou-se uma câmara de eclosão formada com tela e papel de espessura fina, colocados num funil de vidro.

Instalação e avaliação dos ensaios: No primeiro ensaio, em tubos de vidro de 24 mm de diâmetro por 145 mm de altura, contendo areia fina quartizífera umedecida a 0,5 cm de profundidade, colocou-se 0,7 mL de suspensão contendo 150 J2 de *M. incognita* recolhidos ao terceiro dia de incubação de ovos em água. A seguir, adicionou-se areia no tubo, elevando-se a altura do substrato para 0, 2, 4 e 6 cm de profundidade em relação à superfície

de infestação dos nematóides. Logo após, a areia foi umedecida com água e sobre a superfície, colocou-se no tubo com uma pinça, uma tela com abertura de 0,36 mm de diâmetro de poro, encaixando-a nas laterais do tubo. Em seguida, sobre a tela colocaram-se 20 cm³ de areia umedecida e transferiu-se para cada tubo uma plântula de soja com, aproximadamente, 2 cm de comprimento de raiz. Para isto, com uma espátula, fez-se uma cova na areia no centro dos tubos, colocando-se a raiz da plântula sobre a superfície da tela. Em seguida, fez-se leve compressão do substrato a partir das laterais. Na testemunha, os J2 foram colocados na superfície da areia após o plantio da soja, sem tela excluidora. Os tubos foram vedados e incubados em sala climatizada a $27 \pm 2^\circ\text{C}$ com fotoperíodo de 14 h de luz por 5, 10, 15 e 20 dias.

Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado, com fatorial 5 x 4, sendo 5 distâncias do inóculo em relação à tela excluidora de raízes e 4 períodos de avaliação, em 6 repetições.

Após cada período, as plântulas de soja foram retiradas dos tubos jorrando-se água nas paredes dos mesmos, sobre conjunto de peneiras de 0,44 mm sobreposta a de 0,025 mm. O material retido na peneira de 0,025 mm foi recolhido com sacarose 1 molar em tubos de centrifuga de 50 mL, seguido de centrifugação a 1.700 rpm por 1 minuto. O sobrenadante foi vertido sobre peneira de 0,025 mm, lavado em água de torneira e recolhido em câmara de contagem. A seguir, quantificou-se o número de J2 de *M. incognita* recuperados do substrato e fez-se a coloração de lipídios neutros com o corante “Oil Red O” (Campos, 2003; Christophers et al., 1997; Storey, 1983). A partir das fotografias dos J2, utilizou-se o programa “Image Tool for Windows”, para estimar a área total do corpo do J2 de coloração vermelha correspondente à de lipídios. Desta forma, a partir da área de coloração vermelha obteve-se o percentual de lipídios neutros em relação à área total do corpo dos J2 de *M. incognita*. Os sistemas radiculares lavados foram submetidos ao processo de clareamento e coloração

dos nematóides no interior da raiz com solução contendo corante artificial empregado na fabricação de sucos, 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, quantificou-se o número de J2 de *M. incognita* nas raízes.

Os dados relativos ao número de J2 no interior da raiz e no substrato foram transformados em $\sqrt{x + 0.5}$ e submetidos à análise de variância. As variáveis significativas pelo teste F foram submetidas à análise de regressão para ajuste do melhor modelo.

No segundo ensaio, os tubos com areia umedecida receberam a mesma quantidade de inóculo de J2 de *M. incognita*, sobre o qual adicionou-se areia quartizífera, definindo-se as distâncias, porém, não foi colocada a tela excludora de raízes. A seguir, os tubos foram vedados com filme de pvc transparente e armazenados em sala climatizada a $27 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 14 horas, por 0, 5, 10, 15 e 20 dias. Após cada período, quantificou-se o teor de lipídios neutros dos J2 extraídos da areia de dois tubos. Em seguida, colocou-se a tela excludora de raízes e, sobre ela, 20 cm^3 de areia umedecida, realizando-se logo após, o plantio da plântula de soja nos tubos, os quais foram armazenados novamente por 5 dias em sala climatizada nas mesmas condições do ensaio anterior. Na testemunha, os J2 foram armazenados em água e colocados na superfície da areia após plantio da soja, sem tela excludora. Após esse tempo, quantificou-se o número de J2 no interior da raiz, de J2 extraídos da areia e o teor de lipídios neutros neles. O delineamento experimental e as análises foram aqueles já descritos no primeiro ensaio.

Resultados e Discussão

Efeito da distância entre o inóculo e o sistema radicular na migração vertical de juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita*

A cada aumento da distância entre o J2 e o sistema radicular da soja ocorreram penetração e desenvolvimento de *M. incognita*, significativamente menores aos 5 dias após a inoculação. As percentagens de J2 que migraram verticalmente a 2, 4 e 6 cm de distância, após 5 dias, foram 63, 42 e 18%, respectivamente, expressa pelo número total de *M. incognita* no interior da raiz (Tabela 1). A partir dos 10 dias de inoculação até o final do ensaio, o número de J2 colocados a 6 cm e desenvolvidos dentro da raiz igualaram-se ($P \leq 0,05$) ao número de J2 colocados a 4 cm, porém, sempre 40-50% inferiores aos colocados a 2 cm ou em contato com a raiz de soja. A diferença entre o número de juvenis e adultos de *M. incognita* encontrados dentro da raiz da soja, quando os J2 foram colocados em contato com a raiz ou a 2 cm de distância, foi apenas significativa aos 5 e 20 dias da inoculação, com diferença de, aproximadamente, 20% (Tabela 1).

O número de J2 que permaneceu no substrato sem penetrar na raiz de soja foi maior nas distâncias de 2, 4 e 6 cm, não diferindo entre si a partir do 15^o dia de avaliação. À medida que se aumentou a distância do inóculo em relação à raiz maior foi o número de J2 que não penetraram na raiz (Tabela 2). A distância da raiz em relação ao J2, a interação entre a distância e o período de avaliação não tiveram efeito significativo sobre a perda lipídica dos J2 presentes no substrato, porém, o período de permanência do J2 no substrato afetou significativamente a perda das reservas energéticas, que declinou ao longo do período de avaliação (Figura 1).

A menor penetração e o aumento dos J2 de *M. incognita* presentes na areia com o distanciamento do sistema radicular da soja (Tabelas 1 e 2), ao que tudo indica, estão relacionados com a quantidade e/ou qualidade das substâncias atrativas e repelentes exsudadas pelas raízes, já que os J2 colocados a diferentes distâncias do sistema radicular continham reserva energética corporal necessária para mobilidade e infectividade, isto é, em média 74% de lipídios neutros. A permanência dos J2 no substrato corroborou para o gasto de suas reservas lipídicas ao longo do período estudado (Figura 1), devido à atividade muscular exercida no processo de movimentação desorientada. Aos 5 e 10 dias após o transplante, a perda lipídica foi de 60,74 e 86,82%, respectivamente, em relação ao nível original, inibindo a migração dos J2 e mantendo constante a penetração a partir do décimo dia de avaliação até o final do ensaio (Tabela 1). Van Gundy et al. (1967) relataram que a mobilidade e a capacidade infectiva de *M. javanica* foram independentes até terem sido perdidos cerca de 50-60% das reservas energéticas. Viglierchio (1961) estudando a atração de *M. hapla* a centeio, colocou telas separando as raízes das seções onde foram colocados os nematóides e verificou atração de *M. hapla* a centeio em solo e repelência em areia, sugerindo que os compostos atrativos dependem do balanço entre o estímulo atrativo e repelente.

O tipo de substrato é outro fator importante na capacidade de migração dos J2. Como as condições de umidade, temperatura e o fotoperíodo foram favoráveis à migração vertical dos J2, provavelmente, o substrato composto de areia fina quartizífera usado neste ensaio pode ter contribuído para a menor migração vertical. De fato, Prot & Van Gundy (1981) verificaram que o percentual de J2 de *M. incognita* hábeis em percorrer 20 cm até a raiz de tomateiro aumentou com a redução das frações de argila e de silte do solo, porém, ocorreu inibição total na migração vertical em substrato contendo 100% de areia silicatada. Os autores sugeriram que a partícula de argila ajuda na

migração dos J2 a longas distâncias, por absorver e reter exsudados radiculares ou produtos bacterianos, os quais formam um gradiente de concentração, habilitando o nematóide a locomover-se até a raiz. Prot (1978) e Prot & Van Gundy (1981) demonstraram a migração vertical de J2 de *Meloidogyne* spp. a distância de 20 a 75 cm da raiz. Embora a maior distância aqui estudada tenha sido de 6 cm, o substrato composto de areia grossa proporcionou menor migração e penetração, demonstrando que as partículas de argilas e a concentração de substâncias exsudadas são importantes no processo de movimentação orientada dos J2.

Tabela 1. Número total de *Meloidogyne incognita* no interior de raízes de soja, após 5, 10, 15 e 20 dias da infestação do substrato, a diferentes distâncias do sistema radicular.

Tratamentos	Período de avaliação (dias)			
	5	10	15	20
Testemunha	88 a	81 a	80 a	72 a
0 cm	73 a	75 a	68 b	66 a
2 cm	55 b	60 a	51 b	52 b
4 cm	37 c	33 b	30 c	32 c
6 cm	16 d	32 b	29 c	28 c
CV(%)	16,03	17,02	20,79	9,64

Testemunha: J2 colocados na superfície da areia após o plantio da soja, sem tela excludora. 0 cm: J2 colocados a 0 cm de profundidade da raiz de soja; 2 cm: J2 colocados a 2 cm de profundidade da raiz de soja; 4 cm: J2 colocados a 4 cm de profundidade da raiz de soja; 6 cm: J2 colocados a 6 cm de profundidade da raiz de soja. Médias seguidas por letras distintas, na coluna, diferem entre si, pelo teste de Scott & Knott (1974), a 5% de probabilidade.

Tabela 2. Número total de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita* recuperados do substrato, aos 5, 10, 15 e 20 dias da infestação, a diferentes distâncias do sistema radicular.

Tratamentos	Período de avaliação (dias)			
	5	10	15	20
Testemunha	10 a	11 a	7 a	8 a
0 cm	15 a	13 a	8 a	9 a
2 cm	18 b	17 a	16 b	20 b
4 cm	20 b	21 b	22 b	23 b
6 cm	26 c	23 b	23 b	26 b
CV(%)	12,78	12,64	15,90	17,06

Testemunha: J2 colocados na superfície da areia após o plantio da soja, sem tela excludora. 0 cm: J2 colocados a 0 cm de profundidade da raiz de soja; 2 cm: J2 colocados a 2 cm de profundidade da raiz de soja; 4 cm: J2 colocados a 4 cm de profundidade da raiz de soja; 6 cm: J2 colocados a 6 cm de profundidade da raiz de soja. Médias seguidas por letras distintas, na coluna, diferem entre si, pelo teste de Scott & Knott (1974), a 5% de probabilidade.

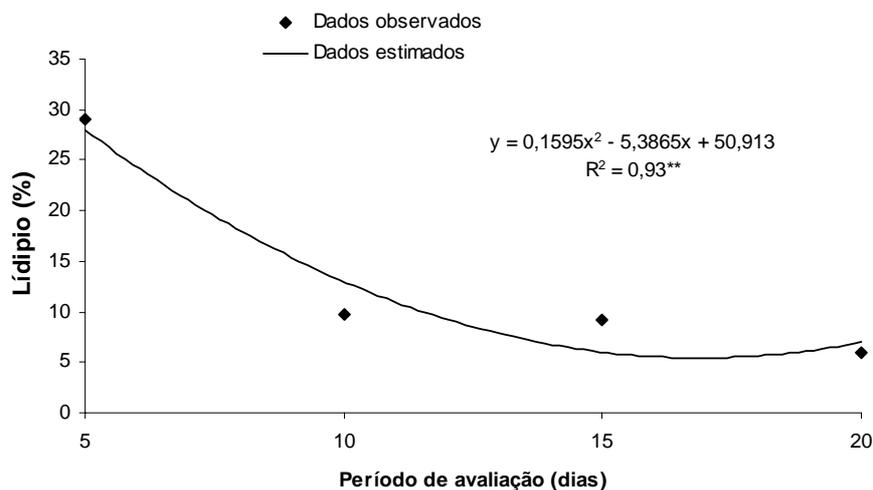


Figura 1. Percentagem de lipídios neutros de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita* recuperados da areia aos 5, 10, 15 e 20 dias, após inoculação dos J2 a diferentes distâncias do sistema radicular da soja.

Efeito do período de armazenamento de juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne incognita* inoculados a diferentes distâncias do sistema radicular

O armazenamento de J2 em água parada e em areia umedecida, a $27 \pm 2^\circ\text{C}$, causou decréscimo no teor de lipídios neutros dos J2 de *M. incognita* ao longo do período de estocagem (Figura 2). O número de J2 dentro da raiz de soja foi menor a cada aumento da distância entre o J2 e a raiz, quando o plantio da soja ocorreu imediatamente após a infestação do substrato com J2 (Tabela 3). Entretanto, a partir dos 5 dias de armazenamento em areia, o efeito da distância de inoculação dos J2 não foi mais observado, com redução de, aproximadamente, 5 vezes no número de J2 encontrado no interior das raízes (Tabela 3). Aos 5 dias, a perda de lipídio corporal do J2 foi de 43-24%. Aos 10

dias de estocagem dos J2 em areia e água, ocorreu perda de 81 a 90,5% no teor de lipídios neutros em relação ao nível original, proporcionando redução entre 88,63 a 98,86% na penetração dos J2, chegando a quase nula a partir desse período de armazenamento (Figura 2). Com a redução na penetração ocorreu aumento no número de J2 presentes na areia a partir do 5º dia de armazenamento, permanecendo constante a partir de 10 dias de estocagem (Tabela 4). A perda do lipídio corporal não foi influenciada pela distância e nem pela interação entre a distância e o período de estocagem, porém, ao longo do período de estocagem ocorreu perda significativa no teor de lipídios neutros dos J2 presentes na areia (Figura 3).

Neste ensaio, como a plântula de soja foi colocada na areia após o armazenamento, o gradiente de substâncias atrativas ao nematóide foi formado quando os J2 continham uma reduzida energia corporal, com baixa capacidade infectiva de grande parte da população, reduzindo, assim, a penetração dos J2 (Tabela 3). Campos (2003) verificou perda de 38,82 e 56,12% no lipídio corporal de J2 de *M. javanica* a partir do segundo e quarto dia de armazenamento dos J2 em água parada, a 28°C, respectivamente. Robinson et al. (1987) observaram redução significativa na mobilidade e na infectividade de J2 de *Globodera rostochieinsis* e *G. pallida*, após perdas superiores de 65% do lipídio original. Van Gundy et al. (1967) verificaram que o armazenamento de J2 de *M. incognita*, a 25°C, por 16 dias, causou perda de 94,67% no teor de lipídios neutros, o que resultou na perda de 72,53 e 62,07% da mobilidade e infectividade, respectivamente. A inibição total na penetração a partir do décimo dia (Tabela 3) indica que a perda lipídica dos J2 constitui fator relevante durante o processo de migração em direção à raiz.

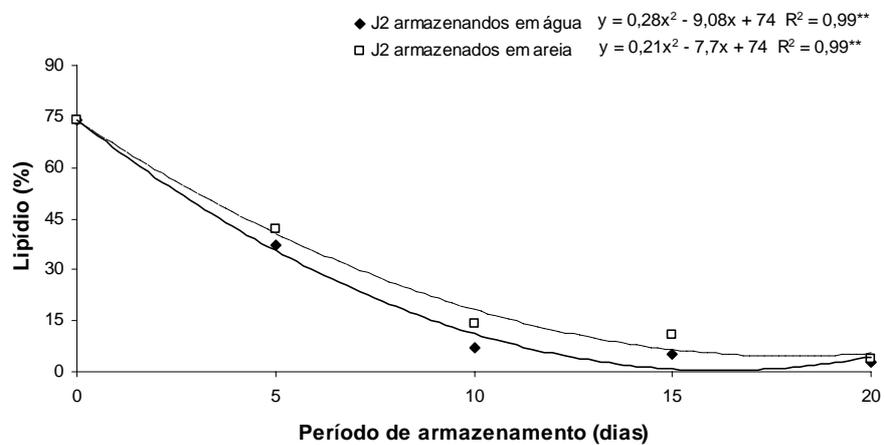


Figura 2. Percentagem de lipídios neutros dos juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita*, após armazenamento em água parada e em areia umedecida, a $27 \pm 2^\circ\text{C}$, por diferentes períodos.

Tabela 3. Número de juvenis de *Meloidogyne incognita* encontrados no interior da raiz de soja aos 5 dias, após o transplântio da soja em substrato inoculado com juvenis do segundo estágio armazenados em areia (0, 2, 4 e 6 cm) ou água (testemunha), por diferentes períodos e distâncias do sistema radicular.

Tratamentos	Período de armazenamento (dias)				
	0	5	10	15	20
Testemunha	88 a	21 a	10 a	0	0
0 cm	73 a	4 b	4 b	0	0
2 cm	55 b	5 b	1 b	0	0
4 cm	37 c	4 b	1 b	0	0
6 cm	16 d	4 b	0 b	0	0
CV(%)	16,03	28,73	25,05	0	0

Testemunha: J2 colocados na superfície da areia após o plantio da soja, sem tela excludora. 0 cm: J2 colocados a 0 cm de profundidade da raiz de soja; 2 cm: J2 colocados a 2 cm de profundidade da raiz de soja; 4 cm: J2 colocados a 4 cm de profundidade da raiz de soja; 6 cm: J2 colocados a 6 cm de profundidade da raiz de soja. Médias seguidas por letras distintas, na coluna, diferem entre si, pelo teste de Scott & Knott (1974), a 5% de probabilidade.

Tabela 4. Número de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita* recuperados no substrato, após 5 dias do plantio da soja.

Tratamentos	Período de armazenamento (dias)				
	0	5	10	15	20
Testemunha	10 aA	24 aB	48 aC	47 aC	47 aC
0 cm	15 aA	46 bB	57 aB	49 aB	59 aB
2 cm	18 bA	58 bC	52 aB	53 aB	50 aB
4 cm	20 bA	56 bD	56 aD	48 aC	43 aB
6 cm	26 cA	60 bB	60 aB	54 aB	56 aB

Testemunha: J2 colocados na superfície da areia após o plantio da soja, sem tela excludora. 0 cm: J2 colocados a 0 cm de profundidade da raiz de soja; 2 cm: J2 colocados a 2 cm de profundidade da raiz de soja; 4 cm: J2 colocados a 4 cm de profundidade da raiz de soja; 6 cm: J2 colocados a 6 cm de profundidade da raiz de soja. Médias seguidas por mesma letra minúscula, na coluna, ou maiúscula, na linha, não diferem entre si, pelo teste de Scott & Knott (1974), a 5% de probabilidade.

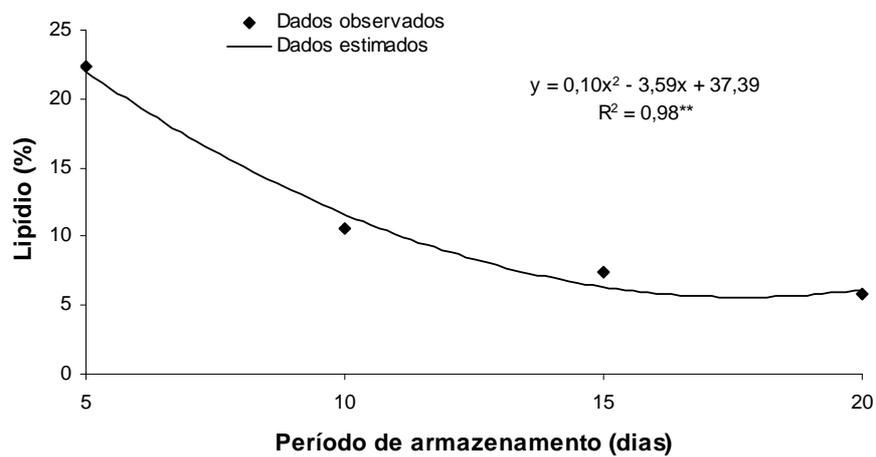


Figura 3. Percentagem de lipídios neutros dos juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita* estocados em areia e água, por 5, 10, 15 e 20 dias antes do plantio da soja e recuperados no substrato após 5 dias do plantio da soja.

Literatura Citada

BERGERSON, G. B. The influence of temperature on the survival of some species of the genus *Meloidogyne*, in the absence of a host. **Nematologica**, Leiden, v. 4, p. 344-354, 1959.

BONETI, J. I. S.; FERRAZ, S. Modificação do método de Hussey e Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira, Brasília**, Brasília, v. 6, n. 3, p. 553, out. 1981.

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.

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, Jan. 1997.

COOLEN, W. A.; D'HERDE, C. J. **A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue**. Ghent: State Agriculture Research Centre, 1972. 77 p.

ENDO, B. Y. Pathogenesis of nematode-infected plants. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 13, p. 213-238, 1975.

GRIFFIN, G. D.; WAITE, W. W. Attraction of *Ditylenchus dipsaci* and *Meloidogyne hapla* by resistant and susceptible alfalfa seedling. **Journal of Nematology**, Lakeland, v. 3, n. 3, p. 215-219, 1971.

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

HUSSEY, R. S.; WILLIAMSON, V. M. Physiological and molecular aspects of nematode parasitism. In: BARKER, K. R.; PEDERSON, G. A.; WINDHAM, G. L. **Plant and nematode interactions**. Hardcover: American Society of Agronomy, 1998. p. 87-108.

- KLINGLER, J. On the orientation of plant nematodes and of some other soil animals. **Nematologica**, Leiden, v. 11, n. 1, p. 4-18, 1965.
- LAVALLEE, W. H.; ROHDE, R. A. Attractiveness of plant roots to *Pratylenchus penetrans* (Cobb). **Nematologica**, Leiden, v. 8, p. 252-260, 1962.
- PROT, J. C. Migration of plant-parasitic nematodes towards plant roots. **Revue de Nématologie**, Montronge Cedex, v. 3, n. 2, p. 305-318, 1980.
- PROT, J. C. Vertical migration of four natural populations of *Meloidogyne*. **Revue de Nématologie**, Montronge Cedex, v. 1, n. 1, p. 109-112, 1978.
- PROT, J. C.; VAN GUNDY, S. D. The effect of clay particles on the migration of *Meloidogyne incognita* toward and into tomato roots. **Journal of Nematology**, Lakeland, v. 11, n. 4, p. 312, Oct. 1979.
- PROT, J. C.; VAN GUNDY, S. D. Effect of soil texture and the clay component on migration of *Meloidogyne incognita* second-stage juveniles. **Journal of Nematology**, Lakeland, v. 13, n. 2, p. 213-217, Apr. 1981a.
- PROT, J. C.; VAN GUNDY, S. D. Influence of photoperiod and temperature on migration of *Meloidogyne* juveniles. **Journal of Nematology**, Lakeland, v. 13, n. 2, p. 218-220, Apr. 1981b.
- ROCHA, F. S.; MUNIZ, M. F. S.; CAMPOS, V. P. Coloração de fitonematóides com corantes usados na indústria alimentícia brasileira. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 2, p. 293-297, dez. 2005.
- RODGER, S.; BENGOUGH, A. G.; GRIFFITHS, B. S.; STUBBS, V.; YOUNG, I. M. Does the presence of detached root border cell of *Zea mays* alter the activity of the pathogenic nematode *Meloidogyne incognita*? **Phytopathology**, ST. Paul, v. 93, n. 9, p. 1111-1114, Sept. 2003.
- ROVIRA, A. D. Plant root exudates. **The Botanical Review**, New York, v. 35, n. 1, p. 35-57, 1969.
- ROBINSON, M. P.; ATKINSON, H. J.; PERRY, R. N. The influence of soil moisture and storage time on the motility, infectivity and lipid utilization of second stage juveniles of the potato cyst nematodes *Globodera rostochiensis* and *G. pallida*. **Revue de Nématologie**, Montrouge Cedex, v. 10, n. 3, p. 343-348, 1987.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. Cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, London, v. 30, n. 3, p. 507-512, Sept. 1974.

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

VAN GUNDY, S. D.; BIRD, A. F.; WALLACE, H. R. Aging and starvation in juvenile of *Meloidogyne javanica* and *Tylenchulus semipenetrans*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 57, n. 6, p. 559-571, June 1967.

VIRGLIERCHIO, D. R. Attraction of parasitic nematodes by plant root emanations. **Phytopathology**, St. Paul, v. 51, n. 2, p. 136-142, Feb. 1961.

WALLACE, H. R. **Nematode ecology and plant disease**. New York: Crane, Russak & Company, 1973. 228 p.

YOUNG, L. D. Epiphytology and life cycle. In: RIGGS, E. D.; WRATHER, J. A. (Ed.). **Biology and management of the soybean cyst nematode**. 1992. p. 27-36.

ZHAO, X.; SCHMITT, M.; HAWES, C. M. Species-dependent effects of border cell and root tip exudates on nematodes behavior. **Phytopathology**, St. Paul, v. 90, n. 11, p. 1239-1245, Nov. 2000.

ARTIGO 5

Período de armazenamento de juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne incognita* infestados por *Pasteuria penetrans* no teor de lipídio corporal, na reprodução e danos causados ao tomateiro*

(Preparado de acordo com as normas da revista "Summa Phytopathologica")

FERNANDO S. ROCHA^{1,2}, VICENTE P. CAMPOS², RICARDO M.
DE SOUZA²

*Parte da Tese de Doutorado do primeiro autor, apresentada à Universidade Federal de Lavras/UFLA, para a obtenção do título de Doutor.

¹Bolsista do CNPq

²Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, CP 3037, CEP. 37200-000, Lavras, MG, Brasil. e-mail: rochafsplant@yahoo.com.br

RESUMO

Rocha, F. S.; Campos, V. P.; Souza, R. M. Período de armazenamento de juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne incognita* infestados por *Pasteuria penetrans* no teor de lipídio corporal, na reprodução e danos causados ao tomateiro. **Summa Phytopathologica.**

Neste trabalho, objetivou-se estudar o efeito do período de armazenamento no teor de lipídios de juvenis do segundo estágio (J2) de *M.*

incognita com endósporos de *P. penetrans* na infectividade e reprodução em tomateiro. Suspensões de *M. incognita* contendo ou não endósporos de *P. penetrans* aderidos à cutícula foram armazenadas por 0, 3, 6, 9 e 12 dias, a 28°C. Após cada período de estocagem, determinou-se a concentração de lipídios neutros no corpo dos J2 por meio da análise de imagem dos J2 coloridos com o corante "Oil Red O". Em seguida, 1.000 J2 foram inoculados em mudas de tomateiros. Após 28 dias, avaliaram-se o número de fêmeas parasitadas, o número de endósporos/fêmea, o número de galhas, massas de ovos e de ovos/g de raiz. A percentagem de lipídio corporal dos J2 de *M. incognita* reduziu com o aumento do período de armazenamento, com maior perda lipídica naqueles J2 estocados sem endósporos aderidos de *P. penetrans*. Aos 3 dias de armazenamento, a perda lipídica dos J2 contendo endósporos aderidos à cutícula e daqueles sem adesão foi de 29,63 e 40%, respectivamente. Neste mesmo período de armazenamento, a taxa de redução na infectividade e na reprodução dos J2 sem endósporos aderidos foi de 38,74 e 73,06%, expressos pelo número de galhas e ovos/g de raiz, enquanto nos J2 estocados com endósporos aderidos ocorreu redução foi de 72,97 e 94,4%. A partir do terceiro dia de armazenamento dos J2 de *M. incognita* contendo endósporos de *P. penetrans* aderidos ocorreu redução no parasitismo e na produção de endósporos por fêmeas, chegando a inibir totalmente o parasitismo de *P. penetrans* aos 9 dias de estocagem dos J2.

Palavras-chaves adicionais: bactéria, controle biológico, lipídios neutros, nematóide de galhas.

ABSTRACT

Rocha, F. S.; Campos, V. P.; Souza, R. M. Storage period of second stage juvenile of *Meloidogyne incognita* infested by *Pasteuria penetrans* on body lipid content, reproduction and damage caused in tomato. **Summa Phytopathologica.**

In this work to aimed study the effect of storage period on lipid content of second stage juveniles (J2) of *M. incognita* with endospores of *P. penetrans* on infectivity and reproduction in tomato. Suspensions of *M. incognita* containing or not endospores of *P. penetrans* adhered to cuticle were stored by 0, 3, 6, 9 and 12 days at 28°C. Soon after, the suspensions were stored by 0, 3, 6, 9 and 12 days to 28°C. After each period, the concentration of neutral lipids in the body of J2 was determined by image analysis of J2 staining with "Oil Red O". After that, 1.000 J2 were inoculated in tomato seedlings. After 28 days, the number of parasitized females, number of the endospores per females, number

of galls, number of egg masses and number of eggs per gram of root were evaluated. The percentage of lipid content of J2 body of *M. incognita* decreased every period of storage. Greatest reduction on J2 lipid content occurred when J2 were stored without adhered endospores of *P. penetrans*. At three days of storage, the lipid loss of J2 with endospores attached to their cuticles and those without, was of 29,63 and 40%, respectively. At the same storage period, the rate reduction in the infectivity and reproduction of *M. incognita* without endospores attached, was 38,74 and 73,06%, expressed by the number galls and number of eggs per gram of root, while in the J2 stored with endospores attached the reduction was 72,97 and 94,4%. From third day on of J2 storage with endospores attached occurred reduction in the parasitism and production of endospores per females, approaching the total inhibition of parasitism by *P. penetrans* in 9 days of J2 storage.

Additional Keywords: bacterium, biological control, neutral lipids, root-knot nematodes.

INTRODUÇÃO

Pasteuria penetrans (Thorne) Sayre & Starr é uma bactéria gram-positiva formadora de endósporos imóveis e parasita obrigatória de diversas espécies de fitonematóides (Chen & Dickson, 1998; Mankau, 1975; Oostendorp et al., 1990; Souza et al., 1996; Spaull, 1984). O seu potencial como agente para o controle biológico tem merecido maior atenção para as espécies do gênero *Meloidogyne* (Jatala, 1986; Souza & Campos, 1997; Stirling, 1984). O ciclo de vida de *P. penetrans* em *Meloidogyne* spp. consiste na adesão, germinação dos endósporos e na infecção ocorrida no interior do nematóide vivo. A adesão ocorre quando o nematóide movimentar-se no solo e entra em contato com o endósporo, representando, portanto, uma etapa importante no início do parasitismo. A natureza química da cutícula do J2 é de grande importância para que ocorra a adesão dos endósporos de *P. penetrans* em *Meloidogyne* spp.

Assim, alterações na cutícula ou mesmo a morte do nematóide pode afetar o processo de adesão. No solo, a adesão pode sofrer a influência de vários fatores bióticos e abióticos (Campos et al., 1998; Davies et al., 1991; Freitas et al., 2000; Mateille et al., 1996b; Maximiniano et al., 2001; Oostendorp et al., 1990; Rocha & Campos, 2000; Stirling, 1991; Stirling, 1981).

A aderência do endósporo ao J2 de *Meloidogyne* spp. constitui o início do ciclo de vida da bactéria, além de propiciar a continuação do ciclo através de gerações do nematóide. Por isso, a eficiência de multiplicação e o controle de *Meloidogyne* por *P. penetrans* está associada a grandes populações de J2 com endósporos aderidos à cutícula e inoculados em plantas hospedeiras (Mankau, 1980; Sharma & Stirling, 1991; Stirling & Wachtel, 1980; Stirling & White, 1982). No entanto, altas quantidades de endósporos aderidos reduzem a mobilidade e a penetração do J2 na raiz (Davies et al., 1991; Gomes et al., 2002; Mateille et al., 1996a) e, por conseguinte, aumentam sua permanência no solo podendo, interromper o ciclo de vida da bactéria.

Após a eclosão, o J2 de *Meloidogyne* spp. possui reservas energéticas corporais, principalmente na forma lipídica, necessárias para locomoção e infectividade (Lee & Atkinson, 1977; Van Gundy et al., 1967). Contudo, no solo, o J2 nem sempre encontra de imediato a raiz nova para o processo de infecção, aguardando a sua formação a partir de raízes mais velhas ou tendo de movimentar-se para encontrá-la. O período que o J2 permanece no solo, com ou sem endósporos aderidos ao seu corpo ainda não foi bem estudado, principalmente com relação à perda da reserva lipídica corporal, infectividade e reprodução no hospedeiro após algum período a espera ou procura do hospedeiro. Desta forma, objetivou-se, neste trabalho, estudar o efeito do período de armazenamento no teor de lipídios de J2 de *Meloidogyne incognita* com endósporos de *P. penetrans* na infectividade e reprodução em tomateiro.

MATERIAL E MÉTODOS

Preparo das soluções tampões de fosfato de sódio: Foram preparadas soluções estoques A e B de Na_2HPO_4 e NaH_2PO_4 0,2 M, respectivamente. A seguir, adicionaram-se 175 mL da solução A, 75 mL da solução B, completando-se o volume final para um litro com água destilada. Ajustes em pHmetro foram feitos para obtenção da solução tampão na concentração de 0,05M e pH 7,0. Esta solução tampão foi usada para promover uma melhor adesão dos endósporos de *P. penetrans* à cutícula do nematóide.

Obtenção de mudas de tomateiro: Sementes de tomateiro, cv. Kada, do grupo Santa Cruz, foram semeadas em bandejas contendo substrato Plantmax e mantidas em casa-de-vegetação. Mudas saudáveis e de tamanho ideal para o transplântio e instalação dos ensaios foram obtidas 40 dias após a semeadura.

Obtenção dos endósporos de *Pasteuria penetrans*: Os endósporos de *P. penetrans*, isolado PP₁₂ originário do município de Ijaci, MG, foram multiplicados em raízes de tomateiros cultivados em vasos ou bandejas mantidos em casa-de-vegetação. As raízes de tomateiro foram separadas do substrato, lavadas em água, cortadas em pedaços de, aproximadamente, 2 centímetros e embebidas por 24 h em solução enzimática composta de 4,0 mL de pectinase-SIGMA (P-9179) e 4,0 g de cellulase-SIGMA (C-1184). A seguir, as raízes foram trituradas em liquidificador por 40 segundos e vertidas em peneira de 0,84 mm sobre peneira de 0,025 mm, coletando-se o material retido nessa última peneira em Erlenmeyer de 2 litros. As fêmeas de *M. incognita* contidas nesse material foram retiradas com o auxílio de um estilete de ponta recurvada e colocadas em tubo de ensaio contendo solução tampão de fosfato de sódio 0,05 M e pH 7,0. Essas fêmeas parasitadas por *P. penetrans* foram esmagadas em 2 ml de água destilada, em triturador de tecidos (Pyrex 7727-15) previamente lavado com leite desnatado e enxaguado com água destilada. Esse procedimento

foi realizado para todos os recipientes em contato com os endósporos. Essa suspensão de *P. penetrans* foi passada por peneira de 0,028 mm para retirada de restos de fêmeas e/ou ovos, obtendo-se uma suspensão límpida de endósporos quantificada através de câmara de Neubauer e armazenada a 8°C em câmara fria. Essa suspensão foi pré-tratada em sonificador durante 20 min, antes do teste de adesão.

Obtenção de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita*: Raízes de tomateiros (*L. esculentum* cv. Kada) cultivados em casa-de-vegetação e infestados com *M. incognita*, foram lavadas cuidadosamente e cortadas em pedaços de, aproximadamente, um centímetro. Os ovos foram obtidos conforme técnica de Hussey & Barker (1973). Ao final, o material retido na peneira de 0,025 mm foi recolhido com o auxílio de jatos de sacarose (0,5 g/mL), em tubos de plástico de 50 mL. Em seguida, adicionou-se, aproximadamente, 3 g de caulim nesses tubos, que foram agitados para colocar em suspensão todo o precipitado e, a seguir, centrifugados por 60 s a 680 g. Transcorrido esse tempo, transferiu-se o sobrenadante numa peneira de 0,025 mm, sem agitar o precipitado. Recolheram-se os ovos retidos na peneira em béquer de 200 ml, utilizando-se pipeta contendo água destilada. Em câmara de fluxo laminar, toda a suspensão foi lavada por quatro vezes em água destilada e esterilizada, utilizando-se peneira desinfestada de 0,025 mm e, então, colocada em béquer de vidro esterilizado. Para a obtenção dos J2, utilizou-se câmara de eclosão formada com tela e papel celulose de lenços duplos de 14,8 x 21,5 cm (Klin[®]), montada em funil de vidro. Foram utilizados no ensaio apenas os J2 obtidos no terceiro dia.

Instalação e avaliação do ensaio: Os J2 de *M. incognita* foram vertidos em peneira de 11 µm e recolhidos através de pipeta contendo soluções tampão de fosfato de sódio 0,05 M e pH 7,0 em frascos Erlenmeyer. A seguir, foram quantificados em microscópio de objetivas invertidas e separados em duas

porções. Em uma delas, adicionaram-se 4 mL de suspensão de endósporos de *P. penetrans* na concentração de $4,2 \times 10^6$ endósporos/mL, completando-se o volume final do frasco para 20 mL com solução tampão. Na outra porção, adicionou-se apenas solução tampão, elevando-se a suspensão ao mesmo volume final da porção anterior. Em seguida, os frascos foram acoplados a uma mangueira plástica ligada à uma bomba de aquário para borbulhamento constante, por 24 horas. Ao final desse tempo, o conteúdo de cada frasco foi passado em peneira de 0,025 mm e lavado em água corrente para a retirada dos endósporos não aderidos à cutícula do J2, sendo recolhidos novamente para os frascos de Erlenmeyer. Para a quantificação dos endósporos aderidos, os J2, em número de 20, escolhidos ao acaso, por frasco, foram observados em microscópio de objetivas invertidas, com aumento de 250X, contando-se o número de endósporos aderidos por J2 e o número de J2 com endósporos aderidos para o cálculo de percentagem de adesão. Desta forma, verificou-se que 96% dos J2 tinham, em média, 10 endósporos aderidos à cutícula. De cada frasco, pipetaram-se 2 mL de suspensão para determinar a concentração de lipídios neutros no corpo do J2 antes do armazenamento por meio de análise de imagem (Campos, 2003; Christophers et al., 1997; Storey, 1983). Para isto, a suspensão contendo os J2 foi concentrada em 0,5 mL e adicionaram-se 3 mL da solução corante “Oil Red O”, seguido de aquecimento em banho-maria, a 60°C, por 20 minutos. Após o resfriamento em temperatura ambiente, os J2 de *M. incognita* foram concentrados novamente em 0,5 mL da solução corante e adicionaram-se 3 mL de glicerina 50%. Em seguida, montaram-se lâminas contendo 20 J2 de *M. incognita* e a partir das fotografias dos J2, utilizou-se o programa “Image Tool for Windows”, para estimar a área total do corpo do J2 e aquela de coloração vermelha correspondente aos lipídios. Desta forma, a partir da área de coloração vermelha, obteve-se o percentual de lipídios neutros em relação à área total do corpo dos J2 de *M. incognita*.

As suspensões foram calibradas em 1.000 J2 com ou sem endósporos/mL e armazenadas em estufa incubadora (B.O.D.), a 28°C, por 3, 6, 9 e 12 dias em água parada. Neste momento, os J2 recentemente eclodidos foram inoculados em tomateiro servido de testemunha. De cada período de armazenamento, obtiveram-se 2 mL da suspensão e, nos J2, fez-se a coloração de lipídios neutros após o armazenamento com o corante “Oil Red O”, já descrito, e estimou-se o percentual médio de lipídios neutros do corpo do J2, obtendo-se, assim, o valor de lipídio no momento da inoculação em cada período de inoculação. A seguir, 1.000 J2 de *M. incognita*, contendo ou não endósporos de *P. penetrans* aderidos, foram inoculados em mudas de tomateiro plantadas em copos plásticos de 300 mL de volume, com substrato formado de solo e areia, na proporção 1:1.

Para a inoculação, os J2 foram dispersos em 4 mL de água e dispersados em 4 furos de ± 3 cm de profundidade ao redor das mudas. Os copos foram incubados em sala climatizada com temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 14 h de luz e mantidos nessas condições durante 28 dias. Ao final desse tempo, cortou-se a parte aérea dos tomateiros e retirou-se o sistema radicular do solo em água parada. Para a quantificação do número de fêmeas parasitadas e do número de endósporos/fêmea, 80 delas, escolhidas ao acaso, foram retiradas com estilete de ponta fina. Quarenta delas foram esmagadas em lâminas de vidro contendo água destilada, sob lamínula, contando-se em microscópio de objetivas invertidas, aumento de 500X, o número de fêmeas parasitadas. Consideraram-se parasitadas todas aquelas com endósporos encontrados no seu interior. As demais 40 fêmeas de cada tratamento foram esmagadas em lâminas escavadas contendo 1 mL de água destilada e, em seguida, essa suspensão foi transferida para uma câmara de Newbauer para a quantificação do número de endósporos/fêmea. A seguir, as massas de ovos dos nematóides nos sistemas radiculares foram coloridas de vermelho em solução contendo corante artificial

empregado na fabricação de sucos, conforme técnica de Rocha et al. (2005). Após a coloração, as raízes foram deixadas sobre papel-toalha por 10 minutos, possibilitando, assim, a avaliação do peso da matéria fresca das raízes, seguida da contagem do número de massas de ovos e 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 objetivas invertidas, quantificou-se o número de ovos de *M. incognita* por sistema radicular.

Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado, com 6 repetições. Os dados obtidos foram transformados em $\sqrt{x + 0.5}$ para análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. As análises de variância foram realizadas pelo programa estatístico Sisvar e as variáveis significativas, pelo teste F, foram submetidas à análise de regressão para ajuste do melhor modelo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teor lipídico dos J2 de *M. incognita* reduziu com o aumento do período de estocagem a 28°C, apresentando maior perda lipídica aqueles J2 sem endósporo de *P. penetrans* aderido à cutícula (Figura 1). A taxa de perda de lipídios neutros dos J2 estocados sem endósporos aderidos foi de 40, 61,25 e 85% em relação ao nível original aos 3, 6 e 9 dias, respectivamente, enquanto naqueles contendo endósporos de *P. penetrans* essa perda foi de 29,63, 49,38 e 79% nos mesmos períodos de estocagem.

A reprodução e a infectividade dos J2 foram reduzidas com o período de armazenamento (Figura 2). O armazenamento dos J2 sem endósporos aderidos por 3 e 6 dias proporcionou redução na infectividade e na reprodução de 38,74 e 73,06%, e de 63,96 e 90,37%, respectivamente, expressas pelo número de galhas

e ovos/g de raiz (Figuras 2A e C). Já os J2 contendo endósporos aderidos e estocados por 3 e 6 dias, essa redução no número de galhas e ovos/g de raiz foi de 72,97 e 94,4% e 86,48 e 97,32%, respectivamente, comparado com aqueles J2 não estocados e sem endósporos aderidos. Os J2 contendo endósporos armazenados no tempo zero, tiveram decréscimo de 89,77% na produção de ovos/g de raiz em comparação com aqueles sem endósporos (Figura 2C). O armazenamento dos J2 de *M. incognita* com endósporos de *P. penetrans* por 3 e 6 dias reduziu o número de fêmeas parasitadas e de endósporos por fêmea, chegando a inibir totalmente o parasitismo a partir de 9 dias de armazenamento dos J2 (Tabela 1).

A maior preservação da reserva lipídica corporal do J2 com endósporo de *P. penetrans*, comparado com aquele sem endósporos (Figura 1), ao que tudo indica, está relacionada ao movimento mais lento dos J2 infestados com endósporos da bactéria. Stirling et al. (1990) e Davies et al. (1991) encontraram movimentação menor dos J2 contendo 7 endósporos de *P. penetrans* em relação àqueles não infestados. Embora ocorra a preservação da reserva lipídica pelos J2 infestados com endósporos, de acordo com os dados aqui apresentados, o armazenamento sempre reduziu mais a infectividade e a reprodução dos J2 parasitados, em relação aos não parasitados, em qualquer período de tempo (Figura 2). Desta forma, o J2 parasitado necessita encontrar rapidamente a raiz e não permanecer no solo por mais de 6 dias. Campos (2003) verificou perda de 38,82 e 56,12% no lipídio corporal de J2 de *M. javanica* a partir do segundo e quarto dia de armazenamento dos J2 em água parada a 28°C, o que refletiu em redução de 44,64% na produção de ovos e 73,68% no número de fêmeas, respectivamente. Van 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.

A redução drástica no número de fêmeas e de endósporos/fêmea com o armazenamento (Tabela 1), sinaliza para outras perdas nos J2 armazenados, além dos lipídios neutros aqui avaliados, os quais são importantes para o ciclo de vida de *P. penetrans*. Observe-se que, em nenhum momento do armazenamento dos J2 infestados (Figura 1), o teor lipídico foi menor do que aquele nos J2 não infestados por *P. penetrans*. Van Gundy et al. (1967) e Lee & Atkinson (1977) encontraram outras fontes de reserva corporal que são reduzidas durante o período de privação alimentar do J2, as quais devem ser importantes para o desenvolvimento pleno do ciclo de *P. penetrans* no hospedeiro. O cultivo “in vitro” de *P. penetrans* talvez possa explicar o papel dessas substâncias no crescimento e reprodução desta bactéria.

Alta quantidade de endósporos aderidos reduz a mobilidade e, por conseguinte, diminui a penetração na raiz com o aumento da distância que o J2 precisa percorrer no solo em direção a planta. Davies et al. (1988) demonstraram a ocorrência de maiores reduções na penetração, isto é, 86%, quando 1.000 J2 de *M. incognita* contendo 15 endósporos aderidos à cutícula foram inoculados em planta de tomateiro. Souza & Campos (1997) verificaram queda no número de fêmeas de *M. incognita* após inoculação dos J2 com 11 endósporos aderidos. Davies et al. (1991) verificaram redução de 71% no número de fêmeas após inoculação de 1.000 J2 de *M. incognita* em raiz de tomateiro, contendo entre 5 e 10 endósporos aderidos à cutícula. Gomes et al. (2002) observaram que a média de 10 endósporos por J2 proporcionou a penetração de 50% dos J2 de *M. javanica* em raízes de tomateiro, aos 10 dias após a inoculação. No entanto, apesar da proporção de endósporos aderidos, isto é, neste ensaio 10 endósporos/J2, e a elevada concentração de juvenis inoculados houve 85,4% de infectividade e apenas 10,23% de reprodução, expressas pelo número de galhas e de ovos/g de raiz (Figuras 2A e C), indicando que boa parte da população de J2 com endósporos aderidos não armazenados penetrou na raiz, porém, a

reprodução do nematóide foi reduzida. Portanto, essa redução estaria relacionada com a eficácia da bactéria em parasitar o nematóide hospedeiro. Como a avaliação ocorreu aos 28 dias após inoculação dos J2, provavelmente, boa parte dos J2 penetrou na raiz ao longo do tempo de condução do ensaio, não ocorrendo a perda esperada de 50%. Já com o aumento do período de armazenamento dos J2 infestados com endósporos, outros fatores, além do gasto das reservas energéticas, podem ter contribuído para a redução da infectividade de *P. penetrans* nos J2 de *M. incognita*. Sayre & Wergin (1977) e Stirling (1984) estimaram que apenas 20 a 30% dos endósporos aderidos à cutícula são capazes de germinar. As razões para esta relativa baixa capacidade germinativa ainda não foram elucidadas, entretanto, Sturhan et al. (1994) observaram grande proporção de endósporos vazios aderidos à cutícula de J2 de *H. goettingiana*, os quais foram incapazes de germinar. Ratnasoma et al. (1991) observaram que o desprendimento de endósporos da cutícula do nematóide é causado pelo contato entre o nematóide ou pela movimentação no solo.

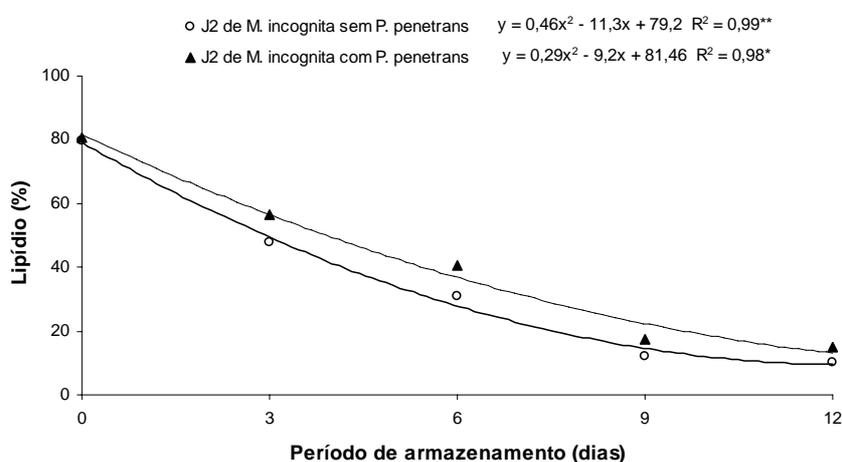


Figura 1. Percentagem de lipídios neutros de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita*, contendo ou não endósporos de *Pasteuria penetrans*, aderido à cutícula e armazenados em água parada, a 28°C, por diferentes períodos.

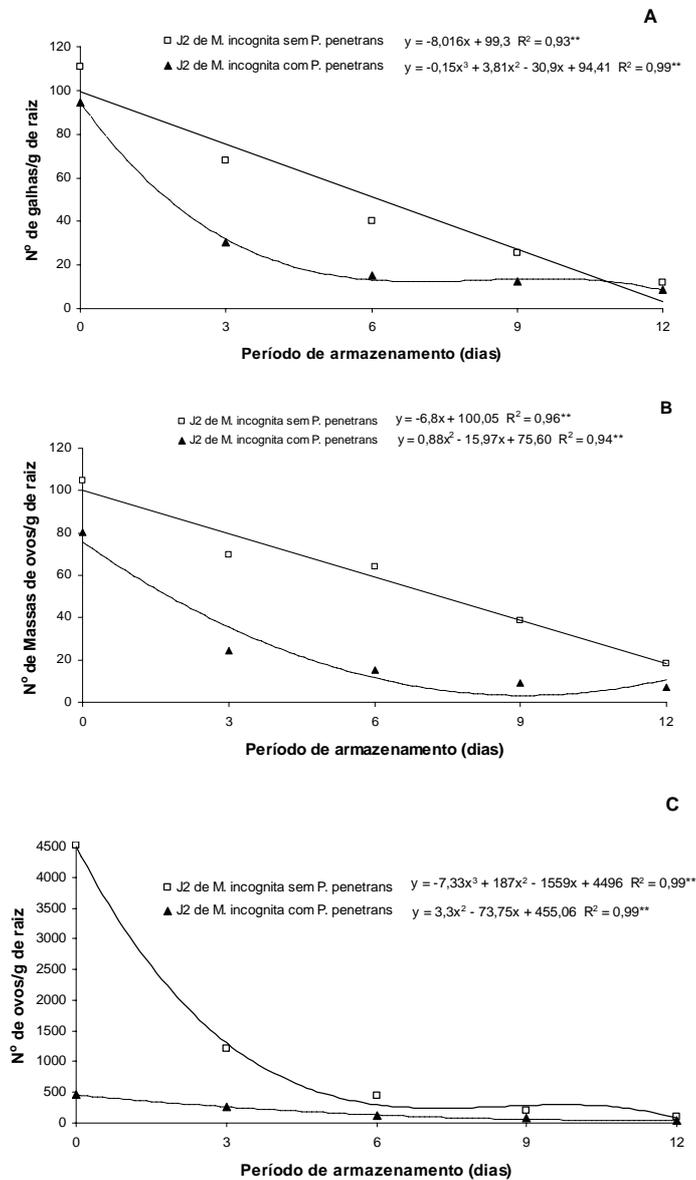


Figura 2. Efeito do período de armazenamento de juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne incognita*, contendo ou não endósporos de *Pasteuria penetrans*, em água parada, a 28°C, na infectividade e na reprodução do nematóide. A) número de galhas/g de raiz, B) número de massas de ovos/g de raiz, C) número de ovos/g de raiz.

Tabela 1. Efeito do período de armazenamento de juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne incognita* com endósporos de *Pasteuria penetrans* aderidos à cutícula no parasitismo e na produção de endósporos por fêmea.

Tratamentos	Fêmeas parasitadas (%)	Nº de endósporos/fêmea
0 dia	80 a	4,68 x 10 ³ a
3 dias	45 b	3,0 x 10 ³ b
6 dias	12 b	1,25 x 10 ² b
9 dias	0 c	0 b
12 dias	0 c	0 b
CV(%)	12,34	40,80

Médias seguidas por letras distintas, na coluna, diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

CAMPOS, V. P.; SOUZA, J. T. de; SOUZA, R. M. de. Controle de fitonematóides por meio de bactérias. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 6, p. 285-327, 1998.

CHEN, Z. X.; DICKSON, D. W. Review of *Pasteuria penetrans*: Biology, Ecology, and Biological Control Potential. **Journal of Nematology**, Lakeland, v. 30, n. 3, p. 313-340, Sept. 1998.

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, Jan. 1997.

DAVIES, K. G.; KERRY, B. R.; FLYNN, C. A. Observation on the pathogenicity of *Pasteuria penetrans*, a parasite of root-knot nematodes. **Annals of Applied Biology**, Warwickshire, v. 112, n. 3, p. 491-501, June 1988.

DAVIES, K. G.; LAIRD, V. E.; KERRY, B. R. The mobility, development and infection of *Meloidogyne incognita* encumbered with spores of the obligate hyperparasite *Pasteuria penetrans*. **Revue de Nématologie**, Montrouge Cedex, v. 14, n. 4, p. 611-618, 1991.

FREITAS, L. G.; DICKSON, D. W.; MITCHELL, D. J.; HEWLETT, T. E. Infectivity and suppression of *Pasteuria penetrans* to *Meloidogyne arenaria* race 1 in tomato following soil fumigation. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 2, p. 157-166, dez. 2000.

GOMES, C. B.; FREITAS, L. G.; FERRAZ, S.; OLIVEIRA, R. D. L.; OSÓRIO, V. A. Efeito do número de endósporos de *Pasteuria penetrans* e do método de promoção da adesão sobre a penetração de *Meloidogyne javanica* e produção da bactéria em tomateiro. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 2, p. 119-130, dez. 2002.

- HUSSEY, R. S.; BARKER, K. R. A comparison of methods for collecting inocula of *Meloidogyne* spp including a new technique. **Plant Disease Repórter**, St. Paul, v. 57, n. 12, p. 1025-1028, Dec. 1973.
- JALATA, P. Biological control of plant-parasitic nematodes. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 24, p. 453-489, 1986.
- LEE, D. L.; ATKINSON, H. J. **Physiology of nematodes**. New York: Columbia University Press, 1977. 215 p.
- MANKAU, R. *Bacillus pentrans* n. comb. Causing a virulent disease of plant parasitic nematodes. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 26, n. 3, p. 333-339, 1975.
- MANKAU, R. Biological control of nematodes pests by natural enemies. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 18, p. 415-440, 1980.
- MATEILLE, T.; DUPONNIS, R.; DABIRÉ, K.; N'DIAYES, S.; DIOP, M. T. Influence of abiotic soil factors and the host plant on the infection of phytoparasitic nematodes of the genus *Meloidogyne* by *Pasteuria pentrans*. **Europeen Journal Soil Biology**, Paris, v. 32, n. 2, p. 81-83, 1996a.
- MATEILLE, T.; DUPONNOIS, R.; DABIRÉ, K.; N'DIAYES, S.; DIOP, M. T. Influence of the soil on the transport of the spores of *Pasteuria pentrans*, parasite of nematodes of the genus *Meloidogyne*. **European Journal of Soil Biology**, Paris, v. 32, n. 2, p. 81-88, 1996b.
- MAXIMINIANO, C.; CAMPOS, V. P.; SOUZA, R. M. de; ALMEIDA, A. R. de. Efeito do pH e filtrados bacterianos na adesão de endósporos de *Pasteuria pentrans*. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v. 25, n. 1, p. 21-26, 2001.
- OOSTENDORP, M.; DICKSON, D. W.; MITCHELL, D. J. Host range and ecology of isolates of *Pasteuria* spp. from the southeastern United States. **Journal of Nematology**, Lakeland, v. 22, n. 4, p. 525-531, Dec. 1990.
- RATNASOMA, H. A.; GOWEN, S. R.; HAGUE, N. G. M. Observations on the detachment of spores of *Pasteuria pentrans* from pre-parasitic second-stage juveniles of *Meloidogyne* spp. **Nematologia Mediterrânea**, Bari, v. 19, n. 2, p. 225-227, 1991.

ROCHA, F. S.; CAMPOS, V. P. Efeito de filtrados fúngicos na adesão de endósporos de *Pasteuria penetrans* e na infectividade e parasitismo de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne incognita*. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 2, p. 239-244, dez. 2000.

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

SAYRE, R. M.; WERGIN, W. P. Bacterial parasite of plant nematode: morphology and ultrastructure. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 129, n. 2, p. 1091-1101, 1977.

SHARMA, R. D.; STIRLING, G. R. *In vivo* mass production systems for *Pasteuria penetrans*. **Nematologica**, Leiden, v. 37, n. 4, p. 483-485, Oct. 1991.

SOUZA, J. T. de; CAMPOS, V. P. Efeito do isolado P1-UFLA de *Pasteuria penetrans* sobre a primeira geração de *Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 2, p. 93-102, dez. 1997.

SOUZA, J. T. de.; SOUZA, R. M.; CAMPOS, V. P. Ocorrência e flutuação populacional de *Pasteuria* spp. em Minas Gerais. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 2, p. 41-51, dez. 1996.

SPAULL, V. W. Observations on *Bacillus penetrans* infecting *Meloidogyne* in sugarcane fields in South Africa. **Revue de Nématologie**, Montrouge Cedex, v. 7, n. 3, p. 277-282, Jan. 1984.

STIRLING, G. R. Biological control of *Meloidogyne javanica* with *Bacillus penetrans*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 74, n. 1, p. 55-60, Jan. 1984.

STIRLING, G. R. **Biological control of plant-parasitic nematodes**: progress, problems and prospects. Melksham: Redwood Press, 1991. 282 p.

STIRLING, G. R. Effect of temperature on infection of *Meloidogyne javanica* by *Bacillus penetrans*. **Nematologica**, Leiden, v. 27, n. 4, p. 458-462, 1981.

STIRLING, G. R.; SHARMA, R. D.; PERRY, J. Attachment of *Pasteuria penetrans* to the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* in soil and its effects on infectivity. **Nematologica**, Leiden, v. 36, n. 2, p. 246-252, Apr. 1990.

STIRLING, G. R.; WACHTEL, M. F. Mass production of *Bacillus penetrans* for the biological control of root-knot nematode *Meloidogyne javanica* in soil and its effect on infectivity. **Nematologica**, Leiden, v. 26, n. 3, p. 308-312, 1980.

STIRLING, G. R.; WHITE, A. M. Distribution of a parasite of root-knot nematodes in South Australia vineyards. **Plant Disease**, St. Paul, v.66, n. 1, p. 52-53, Jan. 1982.

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

STURHAN, D.; WINKELHEIDE, R.; SAYRE, R. M.; WERGIN, W. P. Light and electron microscopical studies of the life cycle and developmental stages of *Pasteuria* isolate parasitizing the pea cyst nematode, *Heterodera goettingiana*. **Fundamental and Applied Nematology**, Paris, v. 17, n. 1, p. 29-42, 1994.

Van GUNDY, S. D.; BIRD, A. F.; WALLACE, H. R. Aging and starvation in juvenile of *Meloidogyne javanica* and *Tylenchulus semipenetrans*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 57, n. 6, p. 559-571, June 1967.

ARTIGO 6

Avaliação do Conteúdo Lipídico de Juvenis do Segundo Estádio de *Meloidogyne exigua* e *M. incognita* e sua infectividade e reprodução¹

(Preparado de acordo com as normas da revista “Nematologia Brasileira”)

FERNANDO DA SILVA ROCHA² & VICENTE PAULO CAMPOS²

¹Parte da Tese de Doutorado do primeiro autor, apresentada à Universidade Federal de Lavras/UFLA para a obtenção do título de Doutor.

²Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, C.P. 3037, CEP 37200-000, Lavras, MG, Brasil.
e-mail: rochafsplant@yahoo.com.br

Resumo - Rocha, F.S. & V.P. Campos, 2007. Avaliação do conteúdo lipídico de juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne exigua* e *M. incognita* e sua infectividade e reprodução.

Estudaram-se as correlações entre processos usados na avaliação do lipídio corporal de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne exigua* e *M. incognita* e sua infectividade e reprodução. Suspensões de *M. incognita* e *M. exigua* foram armazenadas em estufa incubadora a 28°C por 0, 3, 6, 9 e 12 dias. Em cada período de armazenamento, montaram-se lâminas dos J2 de *M. incognita* e *M. exigua* coloridos com o corante “Oil Red O” e daqueles J2 de *M. incognita* mortos pelo calor com adição de água. A seguir, quantificou-se o teor de lipídios neutros dos J2 dessas espécies pela análise de imagem da área colorida de vermelha e estimou-se a área escura no corpo do J2 de *M. incognita*. Em microscópio ótico, mediu-se o comprimento e a largura mediana do corpo dos J2 de *M. exigua* coloridos com o corante para quantificar o seu peso corporal e estimar o seu peso lipídico. Noutro ensaio, a partir das fotografias de *M.*

incognita e *M. exigua* estimou-se o índice lipídico dos J2 pela escala de lipídios neutros relativa a infectividade proposta por Christophers et al. (1997). Em seguida, 1.000 J2 de *M. incognita* ou 2.700 J2 de *M. exigua* estocados em cada período foram inoculados em mudas de tomateiros e mantidas em sala climatizada a $27 \pm 2^\circ\text{C}$ por 28 e 60 dias, respectivamente. Com o período de armazenamento ocorreu decréscimo no teor lipídios neutros, na infectividade e na reprodução dos J2 de *M. incognita* e *M. exigua*. O teor de lipídios neutros correlacionou-se com o índice lipídico dos J2 de *M. exigua* ($r = 0,988$; $P = 0,001$) e de *M. incognita* ($r = 0,985$; $P = 0,002$). Observou-se correlação entre o teor lipídico de *M. exigua* e o peso lipídico ($r = 0,9908$; $P = 0,001$), e a infectividade ($r = 0,8791$; $P = 0,04$) e a reprodução ($r = 0,866$; $P = 0,05$). A concentração de lipídios neutros de *M. incognita* correlacionou-se com a área escura no corpo dos J2 ($r = 0,995$; $P = 0,0003$), com a infectividade ($r = 0,9985$; $P = 0,0001$) e com a reprodução ($r = 0,9569$; $P = 0,01$). O período de 6 dias de estocagem dos J2 de *M. incognita* e *M. exigua* proporciona perdas superiores a 50% do teor de lipídios neutros em relação ao nível original, representando o período limiar de infectividade em tomateiro, enquanto que, para a reprodução, esse período é reduzido para 3 dias de estocagem.

Palavras-chave: Lipídios neutros, infectividade, reprodução, tomateiro, nematóide das galhas.

Summary - Rocha, F.S. & V.P. Campos, 2007. Evaluation of lipid content of second stage juveniles of *Meloidogyne exigua* and *M. incognita* and their infectivity and reproduction.

The correlations among processes used in the evaluation of body lipid of second stage juveniles (J2) of *Meloidogyne exigua* and *M. incognita* and their infectivity and reproduction were studied. Suspensions of *M. incognita* and *M. exigua* were stored at 28°C by 0, 3, 6, 9 and 12 days. From each stored period, stained J2 of *M. incognita* and *M. exigua* by "Oil Red O" technique, besides of those J2 of *M. incognita* heat-killed by hot water, were mounted. The neutral lipid contents and body darked areas of J2 were quantified by image analysis. The length and the half width of the body of stained J2 of *M. exigua* were measured under optical microscope to estimate the body and lipidic weights. In another assay, lipid index was estimated by using photographic of digitized image of J2 of *M. incognita* and *M. exigua* and the scale of neutral lipids proposed by Christophers et al. (1997). One thousand stored J2 of *M. incognita* or 2.700 stored J2 of *M. exigua* stored from each period were inoculated in tomato seedlings and maintained at controlled temperature room at $27 \pm 2^\circ\text{C}$ by 28 and 60 days, respectively. The storage period caused decrease in

the neutral lipid contents, infectivity and reproduction of *M. incognita* and *M. exigua*. The neutral lipid contents correlated with the lipidic index of J2 of *M. exigua* ($r = 0,988$; $P = 0,001$) and *M. incognita* ($r = 0,985$; $P = 0,002$). Correlation between lipidic content of *M. exigua* and the lipidic weight ($r = 0,9908$; $P = 0,001$), infectivity ($r = 0,8791$; $P = 0,04$), reproduction ($r = 0,866$; $P = 0,05$) was observed. The concentration of neutral lipids of *M. incognita* correlated with the dark area from J2 body ($r = 0,995$; $P = 0,0003$), and with the infectivity ($r = 0,9985$; $P = 0,0001$) and the reproduction ($r = 0,9569$; $P = 0,01$). The storage period of 6 days of *M. incognita* J2 and *M. exigua* provided losses up to 50% of the neutral lipid contents in comparison to original level representing the threshold period for infectivity in tomato, whereas for the reproduction this period was reduced to 3 days of storage.

Key words: Neutral lipids, infectivity, reproduction, tomato, root-knot nematode.

INTRODUÇÃO

A sobrevivência e a infectividade de nematóides de vida livre, entomopatogênicos e fitoparasitas dependem da reserva energética corporal, formada durante o desenvolvimento embrionário, e da duração do período de privação alimentar (Lee & Atkinson, 1977; Selvan et al., 1993; Patel et al., 1997; Bergeson, 1959; Van Gundy et al., 1967). A redução do lipídio corporal abaixo de 10% em nematóides entomopatogênicos diminui a mobilidade e a infectividade (Vänninen, 1990-citado por Fitters et al., 1997). Para os nematóides dos cistos, a mobilidade e a infectividade são reduzidas quando ocorre perda superior a 65% do lipídio neutro original (Robinson et al., 1987). Christophers et al. (1997) verificaram que a perda de aproximadamente 50% do teor de lipídio neutros dos J2 de *M. incognita* representa o limiar para a perda da infectividade.

Nos nematóides, os lipídios são armazenados, principalmente, como triglicerídeos e outros lipídios neutros (Lee & Atkinson, 1977). Vários métodos

têm sido desenvolvidos para avaliar os lipídios neutros, incluindo análise direta do lipídio, usando processos físicos e químicos, coloração do nematóide com o “Oil Red O” e avaliação comparativa utilizando escala de índice lipídico (Storey, 1983; Christophers et al., 1997; Fitters et al., 1997; Patel et al., 1997; Campos, 2003), podendo também a densidade da coloração ser quantificada em microdensitômetro (Croll, 1972; Storey, 1983). Por meio de análise química, os triglicerídios podem ser quebrados enzimaticamente em glicerol e ácidos graxos. A quantidade de glicerol resultante pode ser separada e analisada pelos seus constituintes, ácidos graxos, em cromatografia gasosa (Badhwar et al., 1995; Fitters et al., 1997). O peso seco e o peso lipídico têm sido usados como indicadores para estimar a reserva energética de nematóides entomopatogênicos (Grewal, 1995; Qiu & Bedding, 1999).

Durante o período de armazenamento do juvenil do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne* spp. sob condições de privação alimentar, seu corpo se torna visivelmente mais transparente, devido ao decréscimo das reservas energéticas (Fitters et al., 1997). De fato, a maior concentração lipídica ocorre na região do intestino no corpo de J2 de *M. javanica* ocupando 43% da área total (Van Gundy et al., 1967). Westerman & Stapel (1992) utilizaram um método semi-quantitativo em nematóides entomopatogênicos analisando o aspecto da área escura do corpo do J2 infectivo para avaliar a reserva lipídica. Qiu & Bedding (1999) observaram que a área escura no corpo do nematóide correlacionou-se com o peso lipídico. No entanto, a comparação de métodos para estimar os lipídios neutros de J2 de *Meloidogyne* spp. e o período que leva ao limiar de infectividade ainda precisa de investigações. Desta forma, objetivou-se, neste trabalho correlacionar os diversos processos usados em análise lipídica do corpo de nematóides, testando-os em juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne exigua* e *M. incognita*.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção de mudas de tomateiro: Sementes de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.), cv. Kada foram semeadas em bandejas contendo substrato Plantmax[®] e mantidas em casa-de-vegetação. Mudas de tamanho ideal para o transplântio e instalação dos ensaios foram obtidas 35 dias após a semeadura.

Obtenção de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita* e *M. exigua*: Raízes de tomates cv. Kada cultivados em casa-de-vegetação e raízes galhadas de cafeeiro infestadas por *M. incognita* e *M. exigua*, repectivamente, foram lavadas cuidadosamente e cortadas em pedaços de, aproximadamente, 1 cm. A seguir, foram trituradas em liquidificador, por 20 segundos, em solução de hipoclorito de sódio 0,5%, seguindo-se a técnica de Hussey & Barker (1973), modificada por Boneti & Ferraz (1981). Em seguida, colocaram-se, aproximadamente, 3 g de caulim por tubo, realizando-se a limpeza dos ovos pela técnica de Coolen & D'Herde (1972). Os ovos retidos na peneira de 0,025 mm foram recolhidos em béquer de 500 mL, utilizando-se pisseta contendo água destilada. Para a obtenção dos J2, utilizou-se uma câmara de eclosão formada com tela e papel de espessura fina, colocados num funil de vidro.

Instalação e avaliação dos ensaios: No primeiro ensaio, suspensão de J2 de *M. exigua*, recolhida de câmara de eclosão no terceiro dia, foi quantificada em microscópio de objetivas invertidas. A seguir, os J2 foram armazenados em estufa incubadora (B.O.D.), a 28°C, por 0, 3, 6, 9 e 12 dias. Em cada período de armazenamento, obtiveram-se 2 mL da suspensão de J2 e, neles, fez-se a coloração de lipídios neutros com o corante "Oil Red O" (Storey, 1983; Christophers et al., 1997; Campos, 2003). Após a coloração dos J2, montaram-se, então, lâminas contendo 20 J2 de *M. exigua* de cada período de

armazenamento e, a partir das fotografias dos J2, utilizou-se o programa “*Image Tool for Windows*”, versão 3.0, para estimar a área de coloração vermelha correspondente à de lipídios e a área total do corpo do J2. Desta forma, a partir da área de coloração vermelha obteve-se o percentual de lipídios neutros em relação à área total do corpo dos J2 de *M. exigua*. Em seguida, em microscópio ótico, mediu-se o comprimento e a largura dos J2 para avaliar o peso corporal de acordo com a fórmula de Andrassy (1956), modificada por Robinson (1984), onde: W = peso em µg; w = largura em µm; L = comprimento em µm. O peso lipídico foi estimado a partir do peso corporal dos J2 e da percentagem da área lipídica colorida.

$$W = \frac{w^2 \times L}{1.6 \times 10^6}$$

Para correlacionar o teor de lipídios neutros dos J2 de *M. exigua* coloridos com o corante “Oil Red O” com o índice de lipídio, a partir da análise visual das fotografias dos J2, atribuiu-se notas de 6 a 1, conforme escala lipídica proposta por Christophers et al. (1997). Em seguida, obteve-se o valor médio do teor lipídico corporal relativo ao índice lipídico dos J2.

Após cada período de armazenamento, 2.700 J2 foram inoculados em mudas de tomateiro, crescidas em copos plásticos de 300 mL de volume contendo substrato na proporção 1:1:1 (solo: areia: esterco), mantidos em sala climatizada com temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 14 h de luz. Na testemunha, foram inoculados J2 recentemente obtidos. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com oito repetições. Sessenta dias após a inoculação dos J2, cortou-se a parte aérea e retirou-se, cuidadosamente, o sistema radicular do solo em água parada num balde de 10 litros. A seguir, as raízes foram deixadas sobre papel-toalha por 10 minutos, possibilitando, assim,

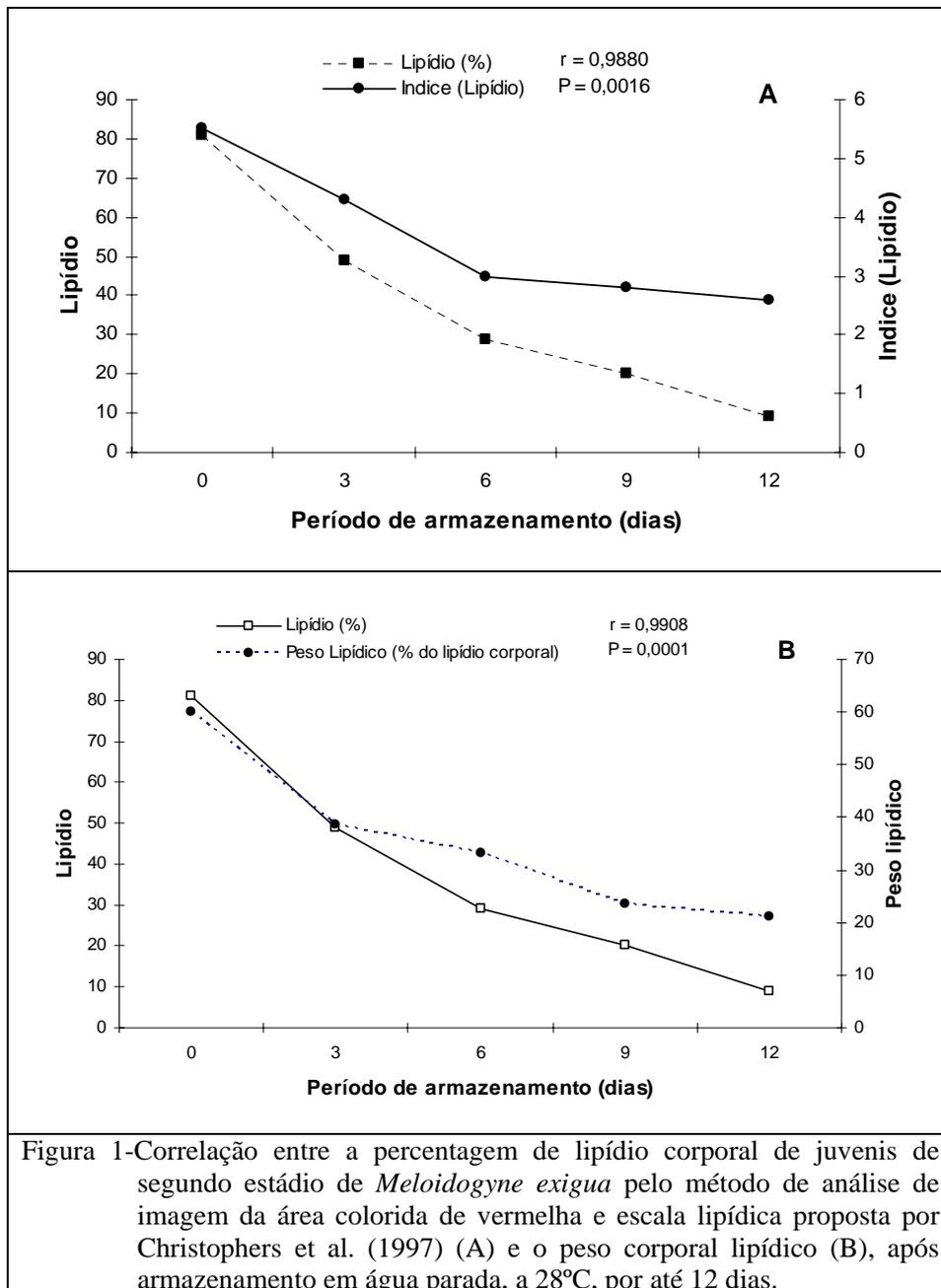
a avaliação do peso da matéria fresca das raízes, seguida da contagem do número de galhas por sistema radicular. Para a quantificação do número de ovos por sistema radicular, as raízes foram cortadas em pedaços de, aproximadamente, 2 cm de comprimento e os ovos obtidos pela técnica de Hussey & Barker (1973). Em microscópio de objetiva invertida quantificou-se o número de ovos de *M. exigua* por sistema radicular. Em seguida, estimou-se o número de galhas e de ovos por grama de raiz.

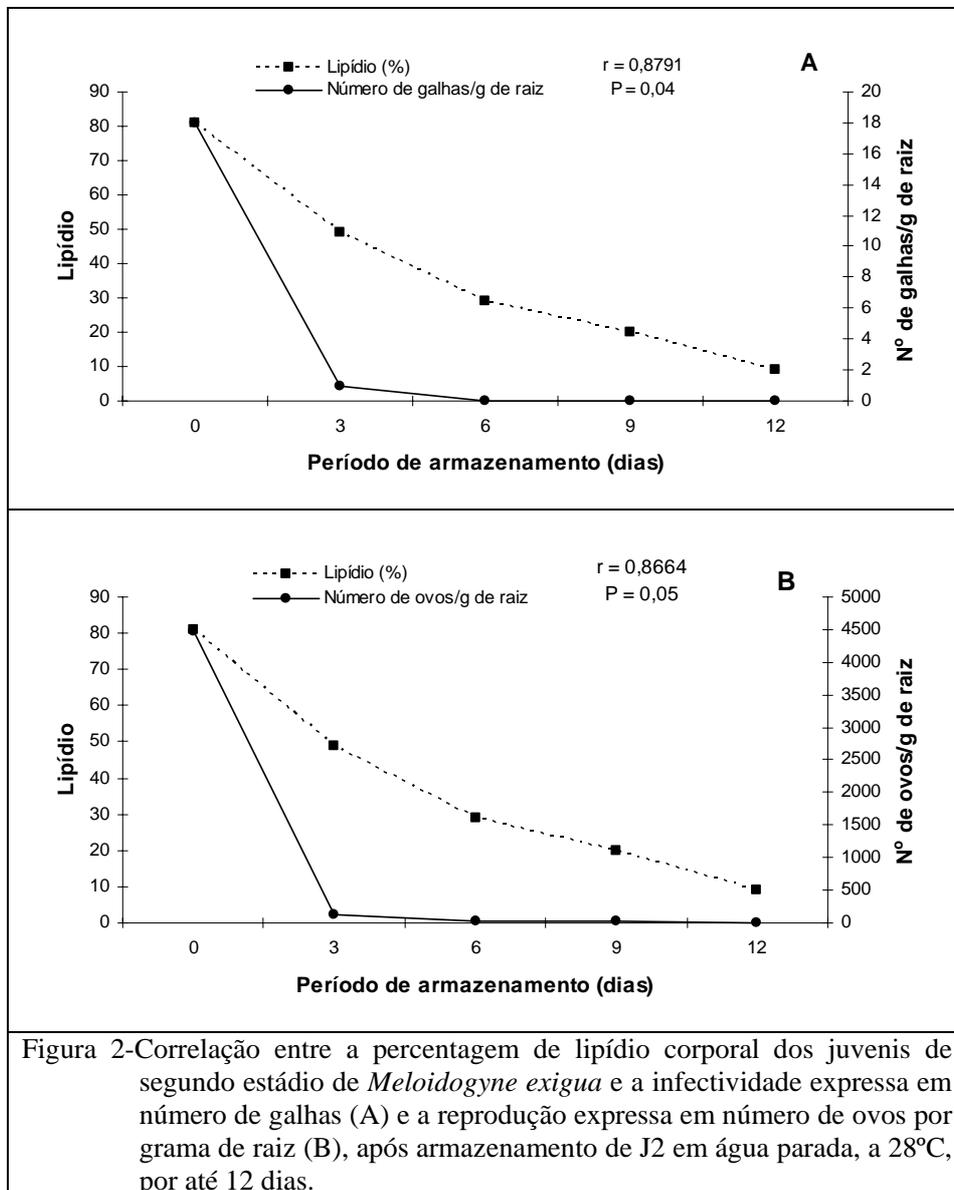
Utilizou-se o programa estatístico SAS System for Windows para o cálculo das correlações.

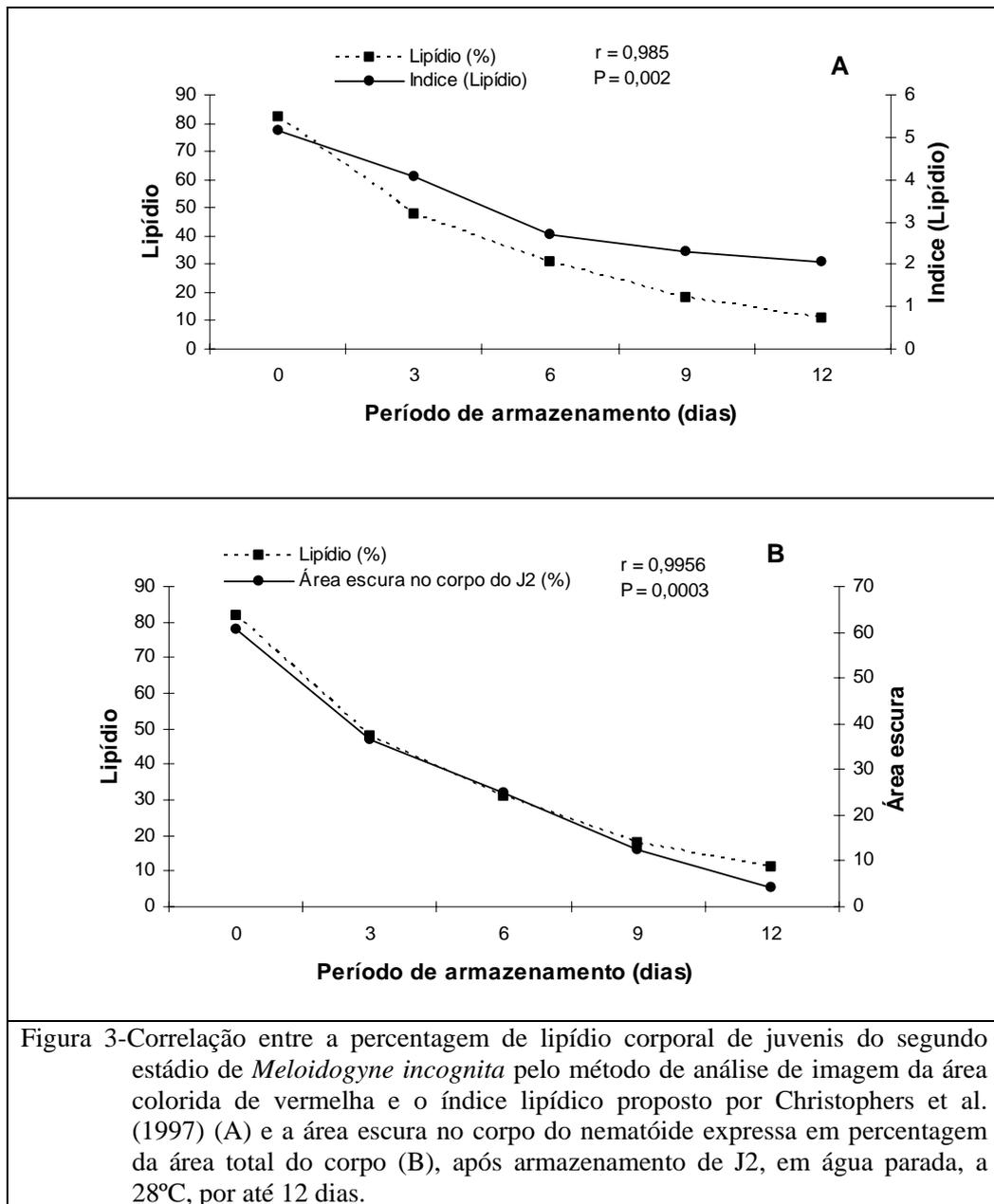
No segundo ensaio, os J2 de *M. incognita* foram armazenados pelo mesmo período e, após cada período de armazenamento, determinou-se a concentração de lipídios neutros no corpo dos J2 através do método de análise de imagem e o índice lipídico relativo à infectividade, de acordo com a escala de Christophers et al. (1997), conforme já descrito anteriormente. Em cada período de armazenamento, obteve-se alíquota de 2 mL de suspensão contendo, aproximadamente, 1.000 J2 para avaliar a área escura do corpo dos juvenis. Para isto, nesta alíquota, adicionou-se o mesmo volume de água a 100°C, causando, assim, a morte dos nematóides. A seguir, montaram-se lâminas e, a partir das fotografias dos J2, estimou-se a área escura no corpo dos juvenis, pela análise de imagem utilizando o programa “*Image Tool for Windows*”. Em seguida, 1.000 J2 de *M. incognita* armazenados em cada período foram inoculados em mudas de tomateiros mantidos em sala climatizada nas mesmas condições do ensaio anterior. Após 28 dias da inoculação, foram feitas as avaliações do número de galhas e de ovos por grama de raiz. O delineamento experimental e a análise de correlação foram semelhantes aos do primeiro ensaio.

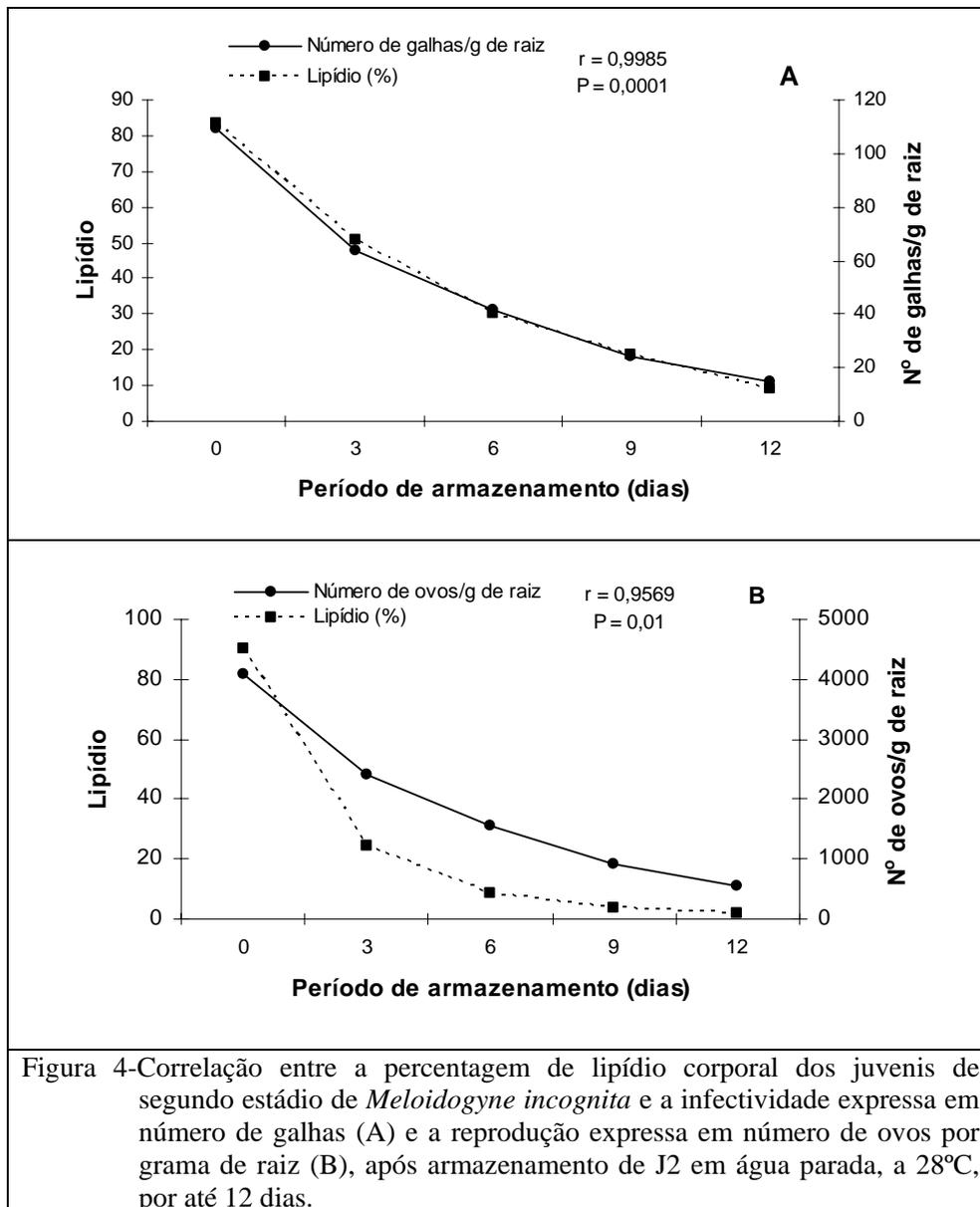
RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teor de lipídios neutros avaliado pela coloração com “Oil Red O” correlacionou-se com o índice lipídico dos J2 de *M. exigua* ($r = 0,988$; $P = 0,001$) e de *M. incognita* ($r = 0,985$; $P = 0,002$) obtido pela escala de Christophers et al. (1997) de 6 a 1 (Figuras 1A e 3A). Observou-se também correlação entre o teor lipídico de *M. exigua* e o peso lipídico ($r = 0,9908$; $P = 0,001$), entre o teor lipídico e a infectividade ($r = 0,8791$; $P = 0,04$) e a reprodução ($r = 0,866$; $P = 0,05$) (Figuras 1B e 2). A concentração de lipídios neutros de *M. incognita* correlacionou-se com a área escura do corpo dos J2 ($r = 0,995$; $P = 0,0003$), com a infectividade ($r = 0,9985$; $P = 0,0001$) e com a reprodução ($r = 0,9569$; $P = 0,01$) (Figuras 3B e 4).









O teor lipídico, avaliado pela análise de imagem da área colorida de vermelha, do corpo do J2 de *M. exigua* diminuiu com o período de

armazenamento correlacionando-se acima de 98% com a escala lipídica proposta por Christophers et al. (1997) e com o peso lipídico, calculado a partir das dimensões do corpo do J2. Esse teor lipídico que decresceu com o armazenamento correlacionou-se também com a queda no número de galhas e de ovos de *M. exigua* (Figuras 2A e B). Em J2 de *M. incognita* o teor lipídico, avaliado pelo método de análise de imagem, também diminuiu com o período de armazenamento e correlacionou-se acima de 98% com o índice calculado pela escala de Christophers et al. (1997) e com a área escura do corpo do J2 (Figuras 3A e B). Esse teor lipídico que decresceu com o armazenamento correlacionou-se também com a queda no número de galhas e de ovos de *M. incognita* (Figuras 4A e B). Visualmente, observa-se a correlação entre a área colorida pelo corante “Oil Red O” e a área escura do corpo do J2 (Figura 5), ambas avaliadas pelo mesmo programa de análise de imagem em cada período de armazenamento do J2. O decréscimo no teor lipídico afetou diferentemente a infectividade e a reprodução dos J2 com o tempo de armazenamento. Aos 6 dias de armazenamento dos J2 de *M. incognita* e *M. exigua*, ocorreu perdas superiores a 50% do teor de lipídios neutros em relação ao nível original, representando o período limiar de queda da infectividade em tomateiro, enquanto que, para a reprodução, esse período é reduzido aos 3 dias de armazenamento.

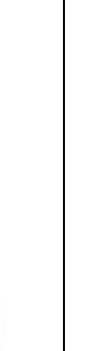
0 dia		3 dias		6 dias	
70,87%	64,46%	43,84%	47%	31,22%	25%
					
Oil Red O	área escura	Oil Red O	área escura	Oil Red O	área escura
9 dias			12 dias		
15,57%	13,07%	9,02%	7,24%		
					
Oil Red O	área escura	Oil Red O	área escura		

Figura 5-Visualização do percentual médio de lipídios neutros de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita* coloridos com o corante “Oil Red O” (lado esquerdo) e a área escura do corpo (lado direito) avaliados pelo mesmo programa de análise de imagem, após armazenamento de J2 em água parada, a 28°C, por até 12 dias.

As correlações entre o teor lipídico obtido pelo método de análise de imagem da área colorida de vermelha e o número de galhas e de ovos (Figuras 2 e 4) indicam que sua redução afeta diretamente a infectividade e a reprodução. Como o teor lipídico avaliado pela análise de imagem da área colorida de vermelha correlacionou-se com as áreas escuras, tais manchas são aglutinações lipídicas (Van Gundy et al., 1967) e podem também ser avaliadas pelo programa “*Image Tool for Windows*” de imagem sem a coloração pelo corante “Oil Red O” (Figura 5). Fitters et al. (1997) também observaram áreas escuras no corpo de juvenis infectivos de *Heterorhabditis* vivos e mortos pelo calor, as quais não diferiram significativamente do teor de lipídio neutros avaliado pelo método de análise de imagem da área colorida com o “Oil Red O”. Qiu & Bedding (1999) verificaram correlação entre a área escura no corpo de *Steinernema carpocapsae* e o peso lipídico. Contudo, os autores não sugerem apenas o uso da área escura para estimar o peso lipídico, pois ocorre variação no tamanho dos nematóides entomopatogênicos recentemente obtidos e durante o consumo das reservas corporais. Assim, para as espécies de *Meloidogyne*, a estimativa do teor de lipídios neutros pela área escura e pelo peso lipídico pode ser usada com segurança para quantificar a reserva energética do J2.

A correlação entre o índice lipídico ou peso lipídico com o teor lipídico avaliado pela análise de imagem da área colorida de vermelha indica que tanto o índice lipídico como o peso lipídico refletem o teor de lipídios do corpo do J2, podendo ser utilizados indiferentemente. Patel et al. (1997) verificaram correlação entre o teor de lipídios neutros colorido com o corante “Oil Red O” e o índice lipídico estimado por meio de escala visual do teor lipídico para as espécies *Steinernema carpocapsae*, *S. riobravis*, *S. feltiae* e *S. glaseri*. Escala de índice lipídico similar foi desenvolvida para *Meloidogyne* spp., a qual tem sido usada com sucesso em condições de laboratórios para avaliar a infectividade (Christophers et al., 1997). A escala de índice visual do teor lipídico possui as

seguintes vantagens em comparação com o microdensitômetro convencional e a análise de imagem: a) apresenta facilidade na estimativa do teor lipídico; b) proporciona uma avaliação rápida e segura na estimativa do lipídio em amostra com grande quantidade de nematóides e c) permite a avaliação individual e fornece informação sobre a distribuição de lipídios neutros na população de J2.

Literatura Citada

ANDRÁSSY, I. Die rauminhalts-und gewichtsbestmmung der fadenwurmer (Nematoden). **Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae**, Budapest, v. 2, n. 1/2, p. 1-15, 1956.

BADHWAR, R.; RAHEJA, R. K.; AHUJU, S.; AHUJU, S. P. Lipid composition of the seed gall nematode, *Anguina tritici*. **Nematologica**, Leiden, v. 41, n. 5, p. 584-591, Oct. 1995.

BERGESON, G. B. The influence of temperature on the survival of some species of the genus *Meloidogyne*, in the absence of a host. **Nematologica**, Leiden, v. 4, p. 344-354, 1959.

BONETI, J. I. S.; FERRAZ, S. Modificação do método de Hussey e Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 6, n. 3, p. 553, out. 1981.

CAMPOS, H. D. **Aspectos do parasitismo e da privação alimentar do nematóide de galhas (*Meloidogyne javanica*) e do cisto (*Heterodera glycines*) em soja**. 203 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Lavras. Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

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, Jan. 1997.

COOLEN, W. A.; D'HERDE, C. J. **A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue**. Ghent: State Agriculture Research Centre, 1972. 77 p.

CROLL, N. A. Energy utilization of infective *Ancylostoma tubaeforme* larvae. **Parasitology**, New York, v. 64, p. 355-365, 1972.

FITTERS, P. F. L.; MEIJER, E. M. J.; WRIGHT, D. J.; GRIFFIN, C. T. Estimation of lipid reserves in unstained living and dead nematodes by image analysis. **Journal of Nematology**, Lakeland, v. 29, n. 2, p. 160-167, Apr. 1997.

GREWAL, P. G. Nematode quality. In: **The second international symposium on entomopathogenic nematodes and their symbiotic bacteria**. Honolulu: University of Hawaii, 1995. p. 38-40.

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

LEE, D. L.; ATKINSON, H. J. **Physiology of nematodes**. New York: Columbia University Press, 1977. 215 p.

PATEL, M. N.; STLINSKI, M.; WRIGHT, D. J. Neutral lipids and the assessment of infectivity in entomopathogenic nematodes: observations on four *Steinernema* species. **Parasitology**, New York, v. 114, n. 5, p. 489-496, May 1997.

QIU, L.; BEDDING, R. A rapid method for the estimation of mean dry weight and lipid content of the infective juveniles of entomopathogenic nematodes using image analysis. **Nematology**, Leiden, v. 1, n. 6, p. 655-660, Oct. 1999.

ROBINSON, A. F. Comparison of five methods for measuring nematode volumes. **Journal of Nematology**, Lakeland, v. 16, n. 3, p. 343-347, 1984.

ROBINSON, M. P.; ATKINSON, H. J.; PERRY, R. N. The influence of soil moisture and storage time on the motility, infectivity and lipid utilization of second stage juveniles of the potato cyst nematodes *Globodera rostochiensis* and *G. pallida*. **Revue de Nématologie**, Montrouge Cedex, v. 10, n. 3, p. 343-348, 1987.

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

SELVANS, S.; GAUGLER, R.; LEWIS, E. E. Biochemical energy reserves of entomopathogenic nematodes. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 79, n. 2, p. 167-172, Apr. 1993.

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

VAN GUNDY, S. D.; BIRD, A. F.; WALLACE, H. R. Aging and starvation in juvenile of *Meloidogyne javanica* and *Tylenchulus semipenetrans*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 57, n. 6, p. 559-571, June 1967.

WESTERMAN, P. R.; STAPEL, M. Linear regression models describing the performance of the insect-parasitic nematodes, *Heterorhabditis* sp. , during storage. **Fundamental and Applied Nematology**, Paris, v. 15, n. 6, p. 525-530, 1992.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Há muitos anos, as pesquisas desenvolvidas com fitonematóides têm sido realizadas empregando-se os processos de coloração de nematóides com os corantes Floxina B e fucsina ácida. Neste trabalho, com o desenvolvimento dos processos de coloração usando corantes artificiais empregados na fabricação de sucos, tornou-se menos perigoso à saúde do manipulador além de reduzir o custo das pesquisas.

A flutuação populacional e o teor lipídico de fitonematóides em condições de campos nos permite compreender melhor a dinâmica populacional do nematóide com os fatores bióticos e abióticos, podendo com o avanço das pesquisas auxiliar na tomada decisão para o controle de sua população. Além disso, os resultados deste estudo representam uma contribuição para o melhor entendimento do papel da reserva energética de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne* spp. e do seu ciclo de vida em plantas hospedeiras, no parasitismo e desenvolvimento de *P. penetrans*, na capacidade de migração, na infectividade e na reprodução. Estudos futuros ainda precisam ser realizados para elucidar o papel do lipídio corporal do J2 no parasitismo e reprodução de *P. penetrans*, na capacidade de movimentação dos J2 de *Meloidogyne* spp. em diferentes tipos de substrato e a perda do lipídio corporal em outras espécies de fitonematóides de importância econômica.

Em condições de laboratório, o conhecimento do teor lipídico por meio da área escura do corpo da população dos J2 pode ser um importante fator na avaliação da qualidade do inóculo para fins de pesquisa. Assim, esperamos ter contribuído com o desenvolvimento científico na pesquisa nematológica e com informações que possam levar a realização de novos trabalhos.