



GISELLE BATISTA PINTO

**RESERVAS LIPÍDICAS CORPORAIS EM *Pratylenchus*
brachyurus E *Meloidogyne incognita***

**LAVRAS – MG
2017**

GISELLE BATISTA PINTO

**RESERVAS LIPÍDICAS CORPORAIS EM *Pratylenchus*
brachyurus E *Meloidogyne incognita***

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

Prof. Dr. Jorge Teodoro de Souza
Orientador

**LAVRAS – MG
2017**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Pinto, Giselle Batista.

Reservas lipídicas corporais em *Pratylenchus brachyurus* e
Meloidogyne incognita / Giselle Batista Pinto. - 2017.

40 p. : il.

Orientador(a): Jorge Teodoro de Souza.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2017.

Bibliografia.

1. *Pratylenchus brachyurus*. 2. *Meloidogyne incognita*. 3. Teor
lipídico corporal. I. Souza, Jorge Teodoro de. . II. Título.

GISELLE BATISTA PINTO

**RESERVAS LIPÍDICAS CORPORAIS EM *Pratylenchus*
brachyurus E *Meloidogyne incognita***

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

APROVADA em 31 de maio de 2017.

Dr. Vicente Paulo Campos UFLA

Dr. Fernando da Silva Rocha UFMG

Dr. Jorge Teodoro de Souza
Orientador

**LAVRAS – MG
2017**

A Deus, a minha mãe e a minha família, por serem essenciais na minha vida!

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus por estar sempre me guiando, dando força e sabedoria ao decorrer da minha vida.

A minha mãe Cionete Batista de Sousa, a quem dedico minha vida e todas as minhas conquistas e por ter sido a melhor mãe que Deus poderia ter escolhido para mim.

Ao meu pai Maurício Pinto Ramos pelo amor incondicional e apoio.

Ao meu irmão Flávio José Rodrigues de Souza pelo companheirismo, apoio e carinho.

Ao meu namorado Marcelo Ricardo Ferreira Amaral pelo grande companheirismo, apoio, ajuda e dedicação a mim durante este trabalho.

À família do meu namorado, pelo enorme apoio e carinho oferecido a mim no decorrer deste trabalho.

Ao casal Maria Teresa e Rodrigo pelo apoio contínuo em todas as etapas da minha vida, inclusive nesta.

A minha querida prima Luciene Avelino pelo enorme apoio, ajuda e carinho oferecidos a mim em diversos momentos da minha vida, inclusive neste.

À amiga Larissa Maia, com a qual fui presenteada no mestrado e que foi essencial neste período da minha vida devido ao companheirismo, ajuda e amizade.

Ao meu orientador Jorge Teodoro Souza, pela orientação, carinho e apoio.

Ao professor Vicente Paulo Campos, pelo grande apoio e passagem de conhecimentos em nematologia.

Aos colegas do laboratório de Nematologia Agrícola desta instituição pelo apoio e companheirismo.

A todos colegas do programa de pós – graduação em fitopatologia pela amizade e companheirismo.

A todos os professores do programa de pós – graduação em fitopatologia pela passagem de conhecimentos.

A todas minhas colegas de apartamento ao decorrer deste período de estudos, pelo companheirismo, companhia e confiança.

A todos os membros da banca pela contribuição nesta pesquisa.

À Universidade Federal de Lavras, especialmente ao Departamento de Fitopatologia, pelo acolhimento e passagem de conhecimentos.

À FAPEMIG, pela concessão da bolsa de mestrado.

Aos colegas de trabalho da Syngenta, pelo companheirismo, amizade e apoio.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a concretização deste trabalho.

MUITO OBRIGADA A TODOS!

“A inteligência é o farol que nos guia, mas é a vontade que nos faz caminhar”.

(Autor Desconhecido)

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Marthin Luther King)

RESUMO

Fitonematoides são causadores de danos às culturas e conseqüentemente provocam quedas na produção e prejuízos econômicos ao produtor. Existem diversas espécies de fitonematoides distribuídas em inúmeros gêneros, porém neste trabalho focamos em duas espécies de dois importantes gêneros: *Meloidogyne incognita* e *Pratylenchus brachyurus*. As espécies estudadas neste trabalho são altamente relevantes, devido à ampla gama de hospedeiros e a ampla distribuição geográfica em regiões de importância agrícola. Por serem espécies tão importantes, a necessidade de entender os seus processos de desenvolvimento e sobrevivência passa a ser interessante para a busca de novas ferramentas no manejo. A energia corporal é um fator essencial no desenvolvimento dos fitonematoides, pois está relacionada com a sua sobrevivência, reprodução e penetração. A energia corporal de um fitonematoide pode vir de carboidratos (trealose e glicogênio) e lipídios (triglicerídios e lipídios neutros). Entre essas fontes, a que é considerada a mais importante são os lipídios neutros. Devido a grande importância de *P. brachyurus* e *M. incognita* e a importância do fator energia corporal, tivemos como objetivo com este trabalho estudar o comportamento do teor lipídico corporal de forma indireta, através do uso de um corante que possui afinidade a lipídios e um programa de quantificação de imagens, durante o armazenamento em água e também estudar a relação entre a área de lipídio corporal colorida com a capacidade de penetração em raízes de milho, pelo fitonematoide *P. brachyurus*.

Palavras – chave: *Pratylenchus brachyurus*. *Meloidogyne incognita*. Teor lipídico corporal. Penetração.

ABSTRACT

Phytonematodes cause damage to crops and economic losses in agriculture worldwide. There are several species of phytonematodes in innumerable genera that are important for agricultural production, but in this work we focused on two species of two important genera: *Meloidogyne incognita* and *Pratylenchus brachyurus*. The species studied in this work are highly relevant due to the wide range of hosts and the wide geographic distribution in regions of agricultural importance. Understanding the processes involved in the development and survival of these nematodes is needed to search for new management strategies. Body energy is an essential factor in the development of nematodes because it is related to their survival, penetration and reproduction. The body energy in nematodes may come from carbohydrates (trehalose and glycogen) and lipids (triglycerides and neutral lipids). Among these sources, neutral lipids are considered the most important. The objective of this study was to investigate the body lipid content through the use of a dye that has affinity to lipids. The relationship between the colored body lipid area and the infectivity in maize roots was studied for the species *P. brachyurus*.

Key words: *Pratylenchus brachyurus*. *Meloidogyneincognita*. Body lipid content. Penetration.

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE – REVISÃO DE LITERATURA

1.	INTRODUÇÃO.....	1
2.	REFERENCIAL TEÓRICO.....	2
2.1.	O gênero <i>Pratylenchus</i> Filipjev, 1936.....	2
2.2.	A espécie <i>Pratylenchus brachyurus</i> (Godfrey, 1929) Filipjev & S. Stekhoven, 1941.....	3
2.3.	O gênero <i>Meloidogyne</i> , espécie <i>Meloidogyne incognita</i>	5
2.4.	Reserva lipídica de fitonematoides.....	6
	REFERÊNCIAS.....	9

SEGUNDA PARTE – ARTIGO

RESERVA LIPÍDICA DE *Pratylenchus brachyurus* E *Meloidogyne incognita* E RELAÇÃO DA RESERVA LIPÍDICA NA PENETRAÇÃO DE *Pratylenchus brachyurus* EM MILHO.....

	RESUMO.....	14
	ABSTRACT.....	15
1.	INTRODUÇÃO.....	16
2.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
2.1.	Obtenção dos inóculos.....	17
2.2.	Dinâmica da perda de lipídios de <i>Pratylenchus brachyurus</i> e <i>Meloidogyne incognita</i>	18
2.3.	Penetração de <i>Pratylenchus brachyurus</i> relacionada com a sua reserva lipídica.....	18
3.	RESULTADOS.....	20
3.1.	Estudo da dinâmica da perda de lipídios de <i>Pratylenchus brachyurus</i> e <i>Meloidogyne incognita</i>	20
3.2.	Estudo da penetração de <i>Pratylenchus brachyurus</i> relacionada com a sua reserva lipídica.....	23
4.	DISCUSSÃO.....	25
5.	REFERÊNCIAS.....	27

PRIMEIRA PARTE – REVISÃO DE LITERATURA

1. INTRODUÇÃO

Os fitonematoídeos causam expressivas perdas econômicas na agricultura mundial. No Brasil segundo Machado (2015), anualmente o agronegócio brasileiro tem tido prejuízos de R\$ 35 bilhões de reais devido ao parasitismo por fitonematoídeos. Os gêneros *Meloidogyne* e *Pratylenchus* estão entre os nematoídeos parasitas de plantas de maior impacto econômico. Perdas ocasionadas pelos nematoídeos das lesões radiculares ocorrem no mundo todo e essas perdas variam de 10 a 80% (TENENTE et al., 2002; FERRAZ; BROWN, 2016). As perdas ocasionadas pelos nematoídeos das galhas, também variam e podem atingir 100% de perda. Em lavouras de cenoura perdas que atingem 100% podem ocorrer, devido à presença principalmente das espécies *M. incognita* e *M. javanica*, causando deformações e formações de galhas nas raízes, o que reduz a produtividade e prejudica a classificação comercial do produto (HUANG, 1983; HUANG; PORTO, 1988; CHARCHAR; VIEIRA; FACION, 2000).

Os nematoídeos do gênero *Meloidogyne* são os formadores de galhas e os do gênero *Pratylenchus* os causadores de lesões radiculares. Ambos possuem alta gama de hospedeiros, incluindo a maioria das culturas agrônômicas de importância para o nosso país e causam muitos prejuízos. Os nematoídeos desses gêneros causam nas plantas parasitadas: deformação no sistema radicular (*Meloidogyne* spp.), lesões enegrecidas nas raízes (*Pratylenchus* sp.), redução do sistema radicular, redução da absorção de nutrientes e água pela planta, clorose e redução da parte aérea, e em consequência a esses fatores, redução na produção das plantas parasitadas. *Meloidogyne incognita* e *P. brachyurus* são as espécies mais importantes destes gêneros, ambas por estarem altamente disseminadas e por possuírem uma ampla gama de hospedeiros.

A produção agrícola no Brasil é baseada no uso intensivo das áreas cultivadas com a finalidade principal de obter o maior aproveitamento da terra e isso vem sendo associado ao uso de cultivares suscetíveis à nematoídeos, além disso a sucessão na maioria das vezes é feita com cultivares que são hospedeiras desses nematoídeos. Assim, *M. incognita* e *P. brachyurus* vêm se mantendo e aumentando suas populações no campo e conseqüentemente causando o aumento das perdas. Diante desta situação a busca de novas técnicas para o manejo destes patógenos é necessário, assim como o desenvolvimento de novas ferramentas que possam auxiliar no desenvolvimento de estudos básicos para compreender diversos aspectos da interação planta-patógeno. Um dos aspectos pouco estudados em nematoídeos é a reserva

lipídica corporal. Já foi mostrado com os trabalhos realizados que esta reserva é importante na reprodução, capacidade infectiva, penetração e sobrevivência dos nematoides estudados. Em condições de armazenamento, ou seja, sob-restrição alimentar ocorrem ao decorrer do tempo redução na quantidade de lipídios neutros e isso leva a redução na reprodução, penetração e reduz a capacidade de sobrevivência desses nematoides. Sendo assim, este fator mostra ser importante no entendimento de diversos aspectos envolvendo nematoides.

Devido à importância do fator perda lipídica, a carência de estudos sobre este tema e sobre penetração para a espécie *P. brachyurus*, e devido a grande disseminação e danos causados às culturas de importância econômica por esta espécie, propusemos com este trabalho investigar a perda lipídica corporal de *P. brachyurus* e *M. incognita* e relacionar a área corporal de *P. brachyurus* colorida por um corante que possui afinidade com lipídios, com a capacidade de penetração em raízes de milho.

O presente trabalho está dividido em duas partes, onde o primeiro capítulo é uma revisão de literatura sobre reserva lipídica em nematoides e o segundo, o relato de um trabalho experimental comparativo sobre a reserva lipídica corporal em *M. incognita* e *P. brachyurus*, assim como o estudo da penetração em milho por *P. brachyurus* associada à perda lipídica.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. O gênero *Pratylenchus* Filipjev, 1936

Os fitonematoides do gênero *Pratylenchus* pertencem ao filo nematoda, classe Chromadorea e família Pratylenchidae (FERRAZ; BROWN, 2016). São conhecidos como nematoides das lesões radiculares (GODFREY, 1929; TIHOHOD, 1993) e constitui o segundo gênero de fitonematoides em importância econômica para o Brasil, sendo que a primeira posição é ocupada pelos nematoides das galhas, gênero *Meloidogyne* Goeldi (LORDELLO, 1981; SASSER; FRECKMAN, 1987; FERRAZ, 1999; TIHOHOD, 2000; GOULART, 2008). Esses nematoides são endoparasitas migradores que provocam a morte de células vegetais por se alimentarem dos conteúdos citoplasmáticos e causarem a destruição mecânica dos tecidos (GOULART, 2008; FERRAZ; BROWN, 2016).

O parasitismo em plantas por estes fitonematoides leva à lesões enegrecidas nas raízes e redução da quantidade de radículas, as quais são muito importantes na absorção de água e

nutrientes (FERRAZ; BROWN, 2016). Perdas devido ao parasitismo por esse grupo ocorrem no mundo todo e variam de 10 a 80% (FERRAZ; BROWN, 2016; TENENTE et al., 2002).

Dentro deste gênero existem cerca de 70 espécies, as quais parasitam diversas espécies vegetais no mundo, sendo que no Brasil existe relato de nove, mas as de maior relevância são: *P. brachyurus*, *P. coffeae*, *P. penetrans*, *P. scribneri*, *P. vulnus*, *P. zaeae* e *P. jaehni* (FERRAZ, 1999; INSERRA et al., 2001; GOULART, 2008; FERRAZ; BROWN, 2016). A identificação das espécies de *Pratylenchus* pode ser feita por meio da análise anatomorfológica e morfométrica ou molecular, porém a primeira é mais usada (GONZAGA; SANTOS; SOARES, 2012; FERRAZ; BROWN, 2016). Dentre as espécies de *Pratylenchus*, *P. brachyurus* é a que merece maior atenção devido a fatores que afetam a sua sobrevivência e parasitismo (FERRAZ; BROWN, 2016). *P. brachyurus* está amplamente distribuído em áreas que favorecem o seu desenvolvimento e reprodução, sendo solos arenosos e temperaturas entre 25 e 30°C consideradas condições ideais (FERRAZ; BROWN, 2016). Além disso, existe indisponibilidade de cultivares resistentes; escassez de espécies de plantas não hospedeiras e que sejam de interesse econômico nos processos de sucessão, e inviabilidade do uso do controle químico, devido as grandes extensões das áreas de produção de grandes culturas (FERRAZ; BROWN, 2016).

O ciclo de vida dos nematoides deste gênero é composto por três fases: ovo, juvenil com quatro estádios de desenvolvimento (J1, J2, J3 e J4) e adulto. Os estádios juvenis J2, J3, J4 e o adulto (fêmea e macho) são infectivos e podem entrar e sair da raiz várias vezes durante sua vida (FERRAZ; BROWN, 2016). A liberação dos ovos pelas fêmeas é feito dentro das raízes infectadas e no solo, sendo o último pouco comum. A quantidade de ovos produzidos por fêmea varia de acordo com a espécie, mas uma média de 70 a 120 ovos por fêmea é comum (FERRAZ; MONTEIRO, 1995; TIHOHOD, 1997; CASTILLO; VOVLAS, 2007; FERRAZ; BROWN, 2016). O tipo de reprodução varia de acordo com a espécie, podendo ser por anfimixia ou por partenogênese e o ciclo de vida dura em média três a seis semanas, variando de acordo com as condições (FERRAZ; BROWN, 2016).

2.2. A espécie *Pratylenchus brachyurus* (Godfrey, 1929) Filipjev & S. Stekhoven, 1941

Pratylenchus brachyurus está em destaque na agricultura brasileira desde a década de quarenta, época na qual causou danos à cultura da batata no estado de São Paulo e está incluída entre as espécies de maior importância para a agricultura tropical (FERRAZ; BROWN, 2016). Sua importância se deve a sua ampla distribuição geográfica, seu alto grau

de polifagia e a sua ação patogênica bastante pronunciada a várias culturas de importância econômica (FERRAZ, 2006).

Os espécimes de *P. brachyurus* medem 0,3 a 0,45 mm nas fases juvenis e 0,5 a 0,7 mm na fase adulta. Possuem reprodução do tipo partenogenética e a presença de machos é rara. A fêmea de *P. brachyurus* coloca de 70 a 80 ovos e possui ciclo de vida de 3 a 4 semanas (FERRAZ, 2006). O tipo de parasitismo de *P. brachyurus* é endoparasita migrador (FERRAZ; BROWN, 2016), assim que os juvenis eclodem já ocorre o início do parasitismo (FERRAZ, 2006). Juvenis e adultos podem entrar e sair das raízes inúmeras vezes, porém segundo Southards (1968), os adultos parecem ser mais eficientes do que os juvenis no estabelecimento de infecções.

Na maioria das vezes a penetração de *P. brachyurus* ocorre atrás da zona de alongamento (GODFREY, 1929), porém no amendoim a penetração pode ocorrer em qualquer lugar ao longo da raiz, além do caule e das vagens, e no fumo após 3 a 6 horas da inoculação já ocorre a penetração por *P. brachyurus* (INAGAKI; POWELL, 1969). *P. brachyurus* é uma espécie que apresenta alta polifagia e o milho é considerado um bom hospedeiro (ENDO, 1959). Além do milho, existem inúmeras plantas que são hospedeiras de *P. brachyurus*: braquiárias, plantas ornamentais, hortaliças, frutíferas, coqueiro, cafeeiro, eucalipto, seringueira, soja, algodão, sorgo, feijão entre outras (EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA, 2017).

Os danos que esta espécie causa nas plantas parasitadas são de ação mecânica, tóxica e espoliativa. A ação mecânica se deve a migração do nematoide no córtex radicular das raízes parasitadas. A ação tóxica está ligada a secreção de substâncias liberadas pelas glândulas esofagianas dentro do citoplasma da célula vegetal e a ação espoliativa está representada pela alimentação do conteúdo citoplasmático das células atacadas (FERRAZ, 2006).

A capacidade de sobrevivência é um fator muito importante para a manutenção de fitonematoides em ambientes com condições adversas ao seu desenvolvimento, e segundo McGowan (1978) *P. brachyurus* pode sobreviver por vários meses sem planta hospedeira, podendo sobreviver durante longos períodos em solos secos e sob a exposição a altas temperaturas. Foi observado em raízes de abacaxi armazenadas em laboratório, que espécimes de *P. brachyurus* foram capazes de sobreviver por 6 meses, já em casa de vegetação sobreviveram por 35 dias em solo muito seco e com temperaturas superiores a 43 °C, sendo que os *P. brachyurus* que estavam em pedaços de raízes sobreviveram por mais tempo (FELDMESSER; REBOIS, 1965). Em trabalho realizado por Neves (2012) foi observado que

após 90 dias de armazenamento de *P. brachyurus* em diferentes substratos com baixo teor de umidade, foi possível encontrar nematoides viáveis. A anidrobiose assume papel importante na sobrevivência de *P. brachyurus* e deve ser considerada no momento de se definir as estratégias de manejo (CASTILLO; VOVLAS, 2007).

Atualmente, populações de *P. brachyurus* vêm tendo sua manutenção e aumento no campo, devido a sua ampla distribuição geográfica em regiões favoráveis ao seu desenvolvimento, indisponibilidade de cultivares com alta resistência à *P. brachyurus*, escassez de plantas más ou não hospedeiras e ao mesmo tempo de interesse econômico e inviabilidade no controle químico, devido às extensas áreas de produção (GOULART, 2008). *P. brachyurus* está altamente disseminado em áreas de importância agrícola, segundo SILVA et al. (2004) *P. brachyurus* é o fitonematoide mais comum nas áreas de algodão no Mato Grosso, com 94% de ocorrência nas áreas avaliadas. Em levantamento feito em Mato Grosso do Sul também foi constatado alta presença de *P. brachyurus*, atingindo 87% de frequência em São Gabriel do Oeste (SILVA, 2004). Em estudo feito em Góias, em todos os municípios avaliados foi encontrado *P. brachyurus* e em 79% das amostras coletadas havia a presença dele (GIELFI; SANTOS; ATHAYDE, 2003). O aluguel de máquinas agrícolas, prática comum em algumas regiões do Brasil, além do trânsito de máquinas entre lavouras de um mesmo proprietário, facilitam a disseminação de *P. brachyurus* (INOMOTO, 2008).

Pratylenchus brachyurus esta em destaque atualmente na cultura da soja, conseguindo superar os nematoides das galhas e do cisto a partir do início do século atual, pois as populações aumentaram (FERRAZ; BROWN, 2016). Acredita-se que tenha sido devido à sucessão de culturas com milho, sorgo e outras plantas que também são hospedeiras desta espécie. Assim a sucessão de culturas que é uma prática eficiente na redução dos nematoides do cisto e das galhas, não é para *P. brachyurus* devido à dificuldade de rotacionar espécies com vegetais que tenham um interesse agrônômico e que não sejam hospedeiras dessa espécie (FERRAZ; BROWN, 2016). De acordo com a Revista Plantio Direto (2007), as perdas ocasionadas por *P. brachyurus* em soja variam entre 30 e 50%, em lavouras comerciais na região centro-oeste do país. Segundo Inomoto (2008) *P. brachyurus* possui uma alta prevalência no Brasil e o conhecimento sobre o seu manejo é reduzido, o que se torna preocupante.

2.3. A espécie *Meloidogyne incognita*

O gênero *Meloidogyne* Goeldi possui cerca de 100 espécies descritas (ONKENDI; MOLELEKI, 2013) e mais de 2000 espécies de plantas hospedeiras. Este é o mais importante entre os gêneros de fitonematoides, pois possui ampla distribuição geográfica e gama de hospedeiros e são causadores de diversos danos às culturas, cerca de 70% dos trabalhos brasileiros da área de nematologia são direcionados para este gênero, sendo a espécie *M. incognita* uma das mais comuns (FREITAS; OLIVEIRA; FERRAZ, 2001; KARSEN; MOENS, 2006; PERRY; MOENS; STARR, 2009; FERRAZ; MENDES, 1992).

O ciclo de vida dos nematoides formadores de galhas ocorre em cerca de 4 semanas dependendo das condições ambientais e hospedeiro, sendo que a faixa ideal de temperatura varia de 25 - 30° C e cada fêmea produz em média 400 ovos (FERRAZ; MONTEIRO, 2011). Os fitonematoides do gênero *Meloidogyne* desenvolveram estratégia de parasitismo durante sua evolução, o que os permitiu causar resposta fisiológica nas células das plantas hospedeiras, assim as plantas são induzidas pelo ataque do nematoide, a sofrerem alterações fisiológicas e morfológicas, formando assim as células gigantes que serão responsáveis por nutrir o nematoide através do conteúdo citoplasmático (MOURA, 1997)

A espécie *M. incognita* possui uma ampla distribuição geográfica, esta bem adaptada às condições climáticas do Brasil e possui uma alta gama de hospedeiros e assim é causadora de severos danos às culturas (FREITAS; OLIVEIRA; FERRAZ, 2001). Já foi verificado em lavouras de cenoura, perdas de até 100% ocasionadas por *M. incognita* e *M. javanica* (HUANG, 1983; HUANG; PORTO, 1988; CHARCHAR; VIEIRA; FACION, 2000).

2.4. Reserva lipídica de fitonematoides

Os lipídios neutros corporais desempenham papel importante na sobrevivência de fitonematoides submetidos à restrição alimentar, além disso, a redução das reservas lipídicas está correlacionada com a redução da infectividade, redução da motilidade e atraso no desenvolvimento de juvenis (ROBINSON; ATKINSON; PERRY, 1987a; ROBINSON; ATKINSON; PERRY, 1987b; STOREY, 1983; STOREY, 1984). Em *M. javanica* o tempo sob restrição alimentar é um fator ligado a perda de reserva (REVERSAT, 1981). A perda de lipídios pode levar a incapacidade infectiva e a morte dos nematoides. A perda de 50 - 60% dessa reserva em espécies de *Meloidogyne* leva a incapacidade infectiva (VAN GUNDY; BIRD; WALLACE, 1967).

Os lipídios neutros são encontrados em forma de grânulos no interior do corpo dos nematoides (BIRD; KALOSHIAN, 2003). *M. incognita* acumula reservas obtidas da sua

alimentação durante o seu desenvolvimento no hospedeiro, para depois incorporar lipídios em seus ovos, no caso dos espécimes fêmeas (DROPKIN; ACEDO, 1974). O juvenil de segundo estágio de *M. javanica* ao sair do ovo apresenta 30% do seu peso corporal em lipídio, o que representa por volta de 80% da sua área corporal colorida, quando submetido à coloração com o corante *Oil Red O*, sendo este de suma importância na manutenção do nematoide até que ele encontre uma fonte de alimento (LEE; ATKINSON, 1977; VAN GUNDY, 1985).

Os processos de movimentação até a planta hospedeira e penetração dependem dos exsudados atrativos liberados pelas raízes e também das reservas lipídicas presentes no nematoide (BIRD, 1959; CHRISTOPHERS et al., 1997; ZHAO; SCHMITT; HAWES, 2000; CAMPOS; CAMPOS; POZZA, 2006). Após a penetração de *Meloidogyne* spp. ocorre a movimentação nas raízes até o local do sítio de alimentação e o parasitismo ocorre através da formação das células de alimentação. Essas etapas pré-alimentação podem durar semanas, assim a reserva lipídica que o nematoide possui na sua fase inicial de vida (J2) são de suma importância, pois somente após seu estabelecimento o nematoide se alimentará (BIRD; KALOSHIAN, 2003). Essas quantidades de reservas lipídicas dos nematoides recém-eclodidos de *Meloidogyne* spp. serão determinadas de acordo com as condições ambientais e isso implicará na capacidade do nematoide infectar o seu hospedeiro (CHRISTOPHERS et al., 1997). Segundo Campos; Campos e Pozza (2006) a temperatura ambiente e o teor de lipídio no corpo do J2 de *Meloidogyne* sp. afetam seu parasitismo no hospedeiro. Além disso, a distância do nematoide até o seu hospedeiro, pode afetar a sua sobrevivência e capacidade de infectar a planta, porque a distância dificultará na captação do estímulo e com o isso o nematoide ficará desorientado e conseqüentemente ocorrerá uma perda de lipídios corporais, reduzindo assim suas chances de sobrevivência no solo (CAMPOS; CAMPOS; POZZA, 2006; FREIRE et al., 2007; DAS; WESEMAEL; PERRY, 2011).

Os nematoides utilizam os lipídios mais rapidamente na presença de água do que em ambientes sem água. Dutra et al. (2006) mostraram que através do revolvimento do solo seguido de irrigação em condições de temperatura elevada, é possível reduzir a capacidade infectiva dos nematoides da espécie *M. incognita* presentes no solo em ambientes protegidos, e associou essa redução a uma maior movimentação do nematoide, devido à presença de água, os autores concluíram que a redução dos lipídios corporais reduz a capacidade infectiva dos J2. Da mesma forma, para nematoides do gênero *Pratylenchus*, a irrigação de um campo por um curto período de tempo, durante a estação seca pode ser de grande valor para reduzir a sobrevivência e posterior infectividade de *P. thornei* (STOREY, 1992). Trabalho realizado por Storey (1982) com *Pratylenchus thornei* sugere que os lipídios neutros são largamente

acumulados pelos juvenis, durante o seu desenvolvimento nas raízes da planta hospedeira. *P. thornei* armazenados por 6 semanas à 10°C mostrou que juvenis perderam durante o período de incubação, 89% de seu conteúdo lipídico, enquanto que os machos e fêmeas perderam 48% e 43% respectivamente. Segundo Atkinson (1980) o nível de metabolismo do nematoide, está relacionado com o tamanho do corpo do nematoide, estágio de desenvolvimento. Storey (1982) sugere que juvenis de *P. thornei* possuem uma taxa de acumulação de lipídios de 13% / dia, partindo do seu conteúdo inicial, durante um período típico de desenvolvimento de 30 dias a 20°C. As reservas acumuladas pelos juvenis são mantidas pelos adultos, sem muito acréscimo, o que pode ser explicado pelos gastos com a reprodução.

Existem poucos trabalhos sobre reserva lipídica em nematoides do gênero *Pratylenchus*, tornando seu estudo de suma importância.

REFERÊNCIAS

- ATKINSON, H. J. Respiration in nematodes. In: ZUCKERMAN, B. M. (Ed.). **Nematodes as Biological Models Vol. 2**, New York, Academic Press. pp. 101-142, 1980.
- BIRD, A. F. The attractiveness of roots to the plant-parasitic nematodes *Meloidogyne javanica* and *M. hapla*. **Nematologica**, 4:322- 335, 1959.
- BIRD, D. M.; KALOSHIAN, I. Are roots special? Nematodes have their say. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 62, n. 2. p. 115-123, 2003.
- CAMPOS, H. D.; CAMPOS, V. P.; POZZA, E. A.. Efeito do tempo e da temperatura de incubação de juvenis do segundo estágio (J2) no teor de lipídio corporal e no parasitismo de *Meloidogyne javanica* em soja. **Fitopatologia Brasileira**, 31:387-393, 2006.
- CASTILLO, P.; VOVLAS, N. *Pratylenchus* (Nematoda: *Pratylenchidae*): diagnosis, biology, pathogenicity and management. **Nematology Monographs and Perspectives**, 6. Leiden: Brill, 529 p., 2007.
- CHARCHAR, J. M.; VIEIRA, J. V.; FACION, C. E. Controle de nematóides das galhas em cenoura através de rotação. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 25, Supl., p. 335, 2000. (Resumo).
- 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**, 43(1), 117-120, 1997.
- DAS, S.; WESEMAEL, W. M. L.; PERRY, R. N. Effect of temperature and time on the survival and energy reserves of juveniles of *Meloidogyne* spp. **Agricultural Science Research Journal** 1:102-112, 2011.
- DROPKIN, V. H.; ACEDO, J. An electron microscopic study of glycogen and lipid in female *Meloidogyne incognita* (root-knot nematode). **Journal of Parasitology** 60, 1013-1021, 1974.
- DUTRA, M. R.; CAMPOS, V. P.; ROCHA, F. S.; SILVA, J. R.; POZZA, E. A. Soil and water management in the control of *Meloidogyne incognita* in greenhouse. **Fitopatologia Brasileira**, 31(4), 405-407, 2006.
- EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA. Banco de Dados: Nematoides relatados em plantas no Brasil. MAPA- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2017 Disponível em: <http://pragawall.cenargen.embrapa.br/aiqweb/nemhtml/nembanco01a_p.asp>. Acesso em: 10 jun. 2017.
- ENDO, B. Y. Response of root lesion nematodes, *Pratylenchus brachyurus* and *P. zae* to various plants and soil types. **Phytopathology**, v. 49, p. 417-421, 1959.
- FELDMESSER, J.; REBOIS, R. V. Temperature and moisture effects on *Pratylenchus brachyurus*. **Nematologica**, v. 11, n. 1, p. 37-38, 1965.

FERRAZ, S.; MENDES, M. de L. O nematoide das galhas. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.16, n. 172, p. 43-45, 1992.

FERRAZ, L. C. C. B.; MONTEIRO, A. R. Nematoides. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Ceres, v. 1, p. 168-201, 1995.

FERRAZ, L. C. C. B. Gênero *Pratylenchus* – os nematoides das lesões radiculares. In: **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. Passo Fundo: Gráfica e Editora PE. Berthier, v. 7, p. 157-195, 1999.

FERRAZ, L. C. C. B. O nematóide *Pratylenchus brachyurus* e a soja sob plantio direto. **Revista Plantio Direto**, v. 95, p. 23-27, 2006.

FERRAZ, L. C. C. B.; MONTEIRO, A. R. Nematoides. In: AMORIM, L.; KIMATI, H.; BERGAMIN FILHO, A. (Ed.). **Manual de fitopatologia: Princípios e conceitos**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, p. 168-199, 2011.

FERRAZ, L.C.C.B.; BROWN, D. J. F. **Nematologia de plantas: fundamentos e importância**. (Orgs.). Manaus: NORMA EDITORA, 251 p. II, 2016.

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**, 33:270-274, 2007.

FREITAS, L. G.; OLIVEIRA, R. D. L.; FERRAZ, S. **Introdução à nematologia**. Viçosa: UFV, 84 p. 2001

GIELFI, F. S.; SANTOS, J. M.; ATHAYDE, M. L. F. Reconhecimento das espécies de fitonematóides associadas ao algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) no Estado de Goiás. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE ALGODÃO**. Campina Grande. Goiânia: Embrapa Algodão Fundação GO, 2003.

GODFREY, G. H. A destructive root disease of pineapples and other plants due to *Tylenchus brachyurus* n.sp. **Phytopathology**, Palo Alto, v. 19, n. 6, p. 611-629, 1929.

GONZAGA, V.; SANTOS, J. M.; SOARES, P. L. Martins. **Chave ilustrada para a identificação das seis espécies de *Pratylenchus* mais comuns no Brasil**. 2012.

GOULART, A. M. C. Aspectos Gerais sobre nematoides das lesões radiculares (gênero *Pratylenchus*). Planaltina, DF: **Embrapa Cerrados**. 30 p (Documentos - ISSN 1517- 5111; 219), 2008.

HUANG, C. S. Inoculação artificial de *Meloidogyne javanica* em cenoura (*Daucus carota* L.). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 10, p. 642, 1983.

HUANG, S. P.; PORTO, M. V. F. Efeito do alqueive na população dos nematóides das galhas e na produção de cenoura. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 13, p. 377-388, 1988.

INAGAKI, H; POWELL, N. T. Influence of the root-lesion nematode on black shank symptom development in flue-cured tobacco. **Phytopathology**, Saint Paul, Minnesota, v. 59, p. 1350 – 1353, 1969.

INOMOTO, M. M. Importância e manejo de *Pratylenchus brachyurus*. **Revista Plantio Direto**, Passo Fundo, v. 108, p. 4-9, nov/dez. 2008.

INSERRA, R. N.; DUNCAN, L. W.; TROCCOLI, A.; DUNN, D.; DOS SANTOS, J. M.; KAPLAN, D.; VOVLAS, N. *Pratylenchus jaehni* sp. n. from citrus in Brazil and its relationship with *P. coffeae* and *P. loosi* (Nematoda: *Pratylenchidae*). **Nematology**, v. 3, n. 7, p. 653-665, 2001.

KARSSSEN, G.; MOENS, M. Root-knot nematodes. In: PERRY, R. N.; MOENS, M. (Eds.). **Plant Nematology**. Wallingford: CABI Publishing, p. 59-90, 2006.

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

LORDELLO, L. G. E. **Nematoides das plantas cultivadas**. São Paulo: Nobel, 314p, 1981.

MACHADO, A. Nematóide: a praga que custa R\$ 35 bilhões ao agronegócio brasileiro. **Acontece**, Piracicaba, out. 2015. Disponível em: <[http://www.adealq.org.br/acontece/Nematóide-a-praga-que-custa-R\\$-35-bilh%C3%B5es-ao-agroneg%C3%B3cio-brasileiro-1410](http://www.adealq.org.br/acontece/Nematóide-a-praga-que-custa-R$-35-bilh%C3%B5es-ao-agroneg%C3%B3cio-brasileiro-1410)>. Acesso em: 05 jun, 2017.

McGOWAN, J. B. The lesion nematode, *Pratylenchus brachyurus* infecting citrus. Florida: **Florida Department of Agriculture and Consumer Services**, 1978.

MOURA, R.M. O Gênero *Meloidogyne* a meloidoginose. Parte II. In: LUZ, W.C.; FERNANDES, J.M.; PRESTES, A.M.; PICININI, E.C. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. (Ed.). Passo Fundo: RAPP, v. 5, cap. 8, p. 281-315, 1997.

NEVES, D. L.; RIBEIRO, L. M.; DIAS-ARIEIRA, C. R.; CAMPOS, H. D.; RIBEIRO, G. C. Sobrevivência de *Pratylenchus brachyurus* em diferentes substratos com baixo teor de umidade. **Nematropica**, Bradenton, 42(2), 211-217, 2012.

ONKENDI, E.M.; MOLELEKI L.N. Detection of *Meloidogyne enterolobii* in potatoes in South Africa and phylogenetic analysis based on intergenic region and the mitochondrial DNA sequences. **European Journal of Plant Pathology**, 136: 1 –5, 2013.

PERRY, R. N.; MOENS, M.; STARR, J. L. (Ed.). **Root-knot nematodes**. CABI, 2009.

REVERSAT, G. Consumption of food reserves by starved second stage juveniles of *Meloidogyne javanica* under conditions inducing osmobiogenesis. **Nematologica**, 27:207-214, 1981.

REVISTA PLANTIO DIRETO. Passo Fundo: Aldeia Norte Editora, n. 99. mai/jun, 2007.

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 Nematologie** 10:343-348, 1987a.

ROBINSON, M. P.; ATKINSON, H. J; PERRY, R. N. The influence of temperature on the hatching, activity, and lipid utilization of second-stage juveniles of the potato cyst nematodes *Globodera rostochiensis* and *G. pallida*. **Revue de Nematologie**. 10: 349-354, 1987b.

SASSER, J. N.; FRECKMAN, D. W. A world perspective on nematology: the role of the society. In: VEECH, J. A.; DICKSON, D. W. (eds). **Vistas on Nematology**. Hyattsville: **Society of Nematologists**, p. 7-14, 1987.

SILVA, R. A. D.; SERRANO, M. A.; GOMES, A. C.; BORGES, D. C.; SOUZA, A. A. D.; ASMUS, G. L.; INOMOTO, M. M. Ocorrência de *Pratylenchus brachyurus* e *Meloidogyne incognita* na cultura do algodoeiro no estado do Mato Grosso. **Fitopatologia Brasileira**, 29(3), 337, 2004

SOUTHARDS, C. J. The influence of the stage of development of lesion nematodes on population dynamics and subsequent host response. **Nematologica**, Leiden, v. 14, p. 15 – 16, 1968.

STOREY, R. M. J.; GLAZER, I.; ORION, D. Lipid Utilisation By Starved and Anhydrobiotic Individuals of *Pratylenchus thornei*. **Nematologica**, v. 28, n. 4, p. 373-378, 1982.

STOREY, R. M. J. The initial neutral lipid reserves of juveniles of *Globodera* sp. **Nematologica**. 29:144-150, 1983.

STOREY, R. M. J. The relationship between neutral lipid reserves and infectivity for hatched and dormant juveniles of *Globodera* sp. **Annals of Applied Biology**. 104:511-520, 1984.

TIHOHOD, D. **Nematologia agrícola aplicada**. Jaboticabal: FUNEP, 372 p., 1993

TIHOHOD, D. **Guia prático de identificação de fitonematoides**. Jaboticabal: FCAV: FAPESP, 246 p, 1997.

TIHOHOD, D. **Nematologia agrícola aplicada**. 2.ed. Jaboticabal: FUNEP. 473 p, 2000.

TENENTE, R. C. V.; GONZAGA, V.; MELO, L.A.M.P.; TENENTE, M.S.M. Bibliografia Brasileira de Nematoides. Brasília: **EMBRAPA-CERNAGEN**, p.386 (Documentos, 76), 2002.

VAN GUNDY, S. D.; BIRD, A. F.; WALLACE, H. R. Ageing and starvation in larvae of *Meloidogyne javanica* and *Tylenchulus semipenetrans*. **Phytopathology**, 57:559-571. 1967.

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

ZHAO, X.; SCHMITT, M.; HAWES, C. M. Species-dependent effects of border cell and root tip exudates on nematodes behavior. **Phytopathology**, 90:1239-1245, 2000.

SEGUNDA PARTE - ARTIGO

ARTIGO – RESERVA LIPÍDICA DE *Pratylenchus brachyurus* E *Meloidogyne incognita* E SUA RELAÇÃO COM A INFECTIVIDADE DE *Pratylenchus brachyurus* EM MILHO

Artigo redigido conforme a norma para publicação periódica científica NBR 6022

RESUMO

O teor de lipídio corporal em algumas espécies, como em espécies do gênero *Meloidogyne*, está associado à sobrevivência, reprodução e capacidade infectiva. O nosso objetivo com a execução deste trabalho foi estudar a reserva lipídica corporal em *P. brachyurus* e *M. incognita* usando corante com afinidade a lipídios e relacionar a penetração de *P. brachyurus* em raízes de milho com suas reservas de lipídios. Populações de juvenis do segundo estágio (J2) de *P. brachyurus* e *M. incognita*, foram mantidas em BOD à 25 e 28° C, respectivamente, em água parada, portanto sob restrição alimentar, por um período de 30 dias. Diariamente durante 30 dias, amostras destas populações foram coletadas e submetidas à coloração de lipídios com solução do corante *Oil Red O*, posteriormente imagens dos nematoides foram obtidas e quantificadas as porcentagens de área corporal colorida pelo corante, através do programa Quant. Para relacionar a penetração com a porcentagem de área colorida por *Oil Red O*, J2 de *P. brachyurus* foram mantidos em água parada a 25° C, durante 28 dias e amostras dos dias 0, 7, 14, 21 e 28 foram coletadas, submetidas à análise de área corporal colorida por *Oil Red Oil*, motilidade e mortalidade e posteriormente inoculadas em tubos com areia autoclavada contendo plantas de milho com dez dias de idade. Foi observado que os J2 de *P. brachyurus* demoram mais tempo para perder lipídio corporal quando comparados com os J2 de *M. incognita*. Por outro lado, os J2 de *M. incognita* eclodem com aproximadamente 80% da área corporal colorida pelo corante, enquanto que os *P. brachyurus* com cerca de 30%. A motilidade dos J2 de *P. brachyurus* reduziu drasticamente nos primeiros dias após a eclosão dos ovos. À medida em que aumentou a perda de lipídios, ocorreu uma redução na infectividade dos nematoides.

Palavras – chave: *Pratylenchus brachyurus*. *Meloidogyne incognita*. Teor lipídico corporal. Infectividade.

ABSTRACT

The body lipid content in species of the genus *Meloidogyne* is associated with survival, reproduction and infectivity. Our objective in this work was to study the body lipid reserves in *P. brachyurus* and *M. incognita* using a dye with affinity to lipids and to study the infectivity of *P. brachyurus* in maize roots. Second stage (J2) juveniles of *P. brachyurus* and *M. incognita* were maintained in BOD at 25 and 28 °C, respectively, in water, thus under food restriction, for a period of 30 days. Daily, for 30 days, samples of these populations were collected and submitted to lipid staining with the Oil Red O dye solution. Images of the colored nematodes were used to determine the percentages of colored body area with the software Quant. To correlate the penetration with the percentage of colored area, J2 of *P. brachyurus* were kept in water at 25 °C for 28 days and samples collected at 0, 7, 14, 21 and 28 days of incubation had their colored body area determined together with motility and mortality and later inoculated in tubes with autoclaved sand containing ten day old maize plants. J2 of *P. brachyurus* took longer to lose body lipids when compared to J2 of *M. incognita*. J2 of *M. incognita* hatch with approximately 80% of the body area colored by the dye, whereas *P. brachyurus* hatch with approximately 30%. Motility of *P. brachyurus* J2 decreased dramatically in the first few days after egg hatching. The infectivity decreased as the body lipids reduced.

Key – words: *Pratylenchus brachyurus*. *Meloidogyne incognita*. Body lipid content. Infectivity.

1. INTRODUÇÃO

Os fitonematoides estão entre os principais causadores de prejuízos na produção agrícola do Brasil, anualmente o agronegócio brasileiro tem tido prejuízos de R\$ 35 bilhões de reais devido ao parasitismo de fitonematoides (MACHADO, 2015). Os principais gêneros de fitonematoides em importância econômica para o Brasil são *Meloidogyne* e *Pratylenchus*, ocupando a primeira e segunda posição, respectivamente (LORDELLO, 1981; SASSER; FRECKMAN, 1987; FERRAZ, 1999; TIHOHOD, 2000; GOULART, 2008).

As perdas ocasionadas pelos nematoides das galhas podem atingir 100% de perda. Em lavouras de cenoura perdas que atingem 100% podem ocorrer, devido à presença principalmente das espécies *M. incognita* e *M. javanica*, causando deformações e formações de galhas nas raízes, o que reduz a produtividade e prejudica a classificação comercial do produto (HUANG, 1983; HUANG; PORTO, 1988; CHARCHAR; VIEIRA; FACION, 2000). Perdas ocasionadas pelos nematoides das lesões radiculares ocorrem no mundo todo e variam de 10 a 80% (TENENTE et al., 2002; FERRAZ; BROWN, 2016). Dentro destes dois gêneros, as espécies de maior relevância são *Meloidogyne incognita* e *Pratylenchus brachyurus*, devido à adaptação as características climáticas, ampla gama de hospedeiras e distribuição geográfica, juntas elas causam nas plantas parasitadas: deformação no sistema radicular (*Meloidogyne* spp.), lesões enegrecidas nas raízes (*Pratylenchus* sp.), redução do sistema radicular, redução da absorção de nutrientes e água pela planta, clorose e redução da parte aérea, e redução na produção das plantas parasitadas (FERRAZ; BROWN, 2016). Devido a essas características eles são patógenos de difícil controle e a criação de novas ferramentas e técnicas para o manejo destes nematoides é de suma importância.

O teor de lipídio neutro corporal em fitonematoides é essencial para o desenvolvimento, reprodução, infectividade e sobrevivência, como já foi mostrado em diversos trabalhos (VAN GUNDY; BIRD; WALLACE, 1967; STOREY, 1983; STOREY, 1984; ROBINSON; ATKINSON; PERRY, 1987a; ROBINSON; ATKINSON; PERRY, 1987b). Ao sair do ovo os juvenis de segundo estágio de *M. javanica* apresentam 30% do seu peso corporal em lipídios neutros, os quais são acumulados no período embrionário e é essencial à sobrevivência do nematoide até que ele encontre o seu hospedeiro e estabeleça a relação de parasitismo (LEE; ATKINSON, 1977; VAN GUNDY, 1985). O período entre a eclosão e o estabelecimento do parasitismo é crucial, podendo a perda de lipídios levar a morte dos nematoides (VAN GUNDY; BIRD; WALLACE, 1967). A porcentagem de energia corporal mostra ser um fator limitante ao desenvolvimento normal dos fitonematoides,

podendo ser essa uma ferramenta importante na obtenção e aprimoramento de técnicas de manejo destes nematoides.

Trabalhos sobre energia corporal para os nematoides do gênero *Meloidogyne* já existem, porém para *Pratylenchus* spp. ainda são poucos. Sendo assim, nosso objetivo foi entender como ocorre a perda lipídica sob restrição alimentar em *Pratylenchus brachyurus* e *Meloidogyne incognita*, assim como associar o percentual de lipídios à capacidade de penetração de *Pratylenchus brachyurus*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Obtenção dos inóculos

As amostras contendo nematoides do gênero *Pratylenchus* utilizadas nos experimentos foram obtidas através de coletas em campo de raízes de milho e de sorgo, no distrito do Amanhece, município de Araguari (18°33'31,0"S; 48°12'43,0"). No laboratório os nematoides foram extraídos, utilizando-se a técnica de Coolen e D'Herde (1972). A amostra contendo *P. brachyurus* foi utilizada para obtenção de populações puras através da metodologia de multiplicação *in vitro* em cilindros de cenoura (GONZAGA; SANTOS; COSTA, 2006). Os nematoides do gênero *Pratylenchus* foram identificados ao nível de espécie através do uso da chave de identificação ilustrada de Gonzaga e Soares (2012), para esta identificação foi utilizado uma amostra da população multiplicada *in vitro* e outra da população obtida no campo.

Raízes de tomateiro, cultivar Santa Clara, mantidas em casa de vegetação e infestadas por *M. incognita*, foram utilizadas para obtenção dos juvenis. Para isto, através da técnica de Hussey e Barker (1973) modificada por Boneti e Ferraz (1981) foi feito a extração dos ovos das raízes. Os ovos foram colocados em câmara de eclosão e obtidos juvenis do segundo estágio (J2) para uso nos experimentos.

Espécimes de *P. brachyurus* foram axenizados utilizando a metodologia de Mountain (1955) modificado por Gonzaga e Santos (2010), no lugar do uso do sulfato de estreptomicina foi utilizada uma solução de ampicilina 0,1%. Após a axenização, os nematoides foram transferidos para cilindros de cenoura previamente desinfestados com hipoclorito de sódio 0,05% por 30 min (40 nematoides/cilindro) (CHITAMBAR; RASKI, 1985). Os cilindros de cenoura contendo os nematoides foram alocados em recipientes de vidro de 60 mL, previamente lacrados com papel alumínio e autoclavados à 120 °C, 1 atm de pressão por 20

min. Em seguida o material foi incubado a 25 ± 1 °C no escuro por 90 dias (GONZAGA; SANTOS, 2010). A seguir os ovos e nematoides foram extraídos dos cilindros de cenoura pela técnica de Coolen e D'Herde (1972). Os ovos foram separados dos juvenis e adultos utilizando-se peneira de 400 sobre a de 500 mesh. Câmaras para eclosão dos ovos foram montadas e mantidas em temperatura de 25 ± 1 °C e no escuro. Os nematoides eclodidos nas primeiras 24 h foram descartados e utilizados aqueles eclodidos posteriormente. Na obtenção da suspensão aquosa dos juvenis, fez-se a contagem deles em câmara de Peters e a concentração foi ajustada para 400 J2 de *P. brachyurus*/mL.

2.2. Dinâmica da perda de lipídios de *Pratylenchus brachyurus* e *Meloidogyne incognita*

Foram utilizadas três suspensões de nematoides nestes ensaios: 1) suspensão de J2 de *P. brachyurus* - para obtenção desta suspensão ovos foram extraídos dos cilindros de cenoura (COOLEN; D'HERDE, 1972), depois por meio da montagem da câmara de eclosão dos ovos, coletou-se juvenis recém-eclodidos, os quais foram mantidos em BOD a 25°C e utilizados no experimento; 2) suspensão de juvenis e adultos de *P. brachyurus* obtida do campo - foi obtida através da extração de raízes de milho coletadas em campo (COOLEN, D'HERDE, 1972), e também foram mantidas em BOD a 25°C; 3) suspensão de J2 de *M. incognita* - obtida por meio da extração de raízes de tomateiro (HUSSEY; BARKER, 1973 modificado por BONETI; FERRAZ, 1981), posteriormente os ovos em câmara de eclosão resultaram em J2 recém-eclodidos mantidos em BOD a 28 °C.

As suspensões de *P. brachyurus* e *M. incognita* foram mantidas separadamente em tubos contendo água parada, em BOD durante 30 dias. Cada espécie foi mantida dentro da faixa de temperatura ideal ao seu desenvolvimento. Diariamente durante 30 dias amostras destas populações foram coletadas e submetidas à coloração com solução de *Oil Red O*, lâminas para observação dos nematoides em microscópio foram montadas, fotografadas e através das imagens geradas quantificou-se a porcentagem de teor de lipídio de cada nematoide amostrado no programa análise de imagens QUANT 1.0.1[®] (VALE; FERNANDES; LIBERATO, 2001).

O programa Sigma Plot[®] v.12 foi utilizado na obtenção dos gráficos e no teste de significância das regressões.

2.3. Infectividade de *Pratylenchus brachyurus* relacionada com a sua reserva lipídica

Para este experimento *in vivo*, o inóculo de *P. brachyurus* foi obtido de suspensão pura de J2 e incubado em água parada, portanto sob restrição alimentar, a uma temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ por 7, 14, 21 e 28 dias. Como controle, J2 recém eclodidos (zero dia) foram usados na inoculação. Amostras de *P. brachyurus* foram obtidas em cada período de incubação. Nelas foi avaliada a área colorida com *Oil Red O*, motilidade e mortalidade. Para a coloração dos lipídios neutros, os nematoides foram concentrados em 0,5 mL de água. A seguir adicionaram-se 3 mL de solução corante “*Oil Red O*” (STOREY, 1983; CHRISTOPHERS ET AL., 1997). A solução corante foi preparada utilizando-se 0,5 g do corante “*Oil Red O*” em 100 mL de álcool absoluto, agitada durante 15 min em agitador magnético, e a seguir filtrada utilizando-se papel de filtro comum. A solução de corante foi armazenada em geladeira à 5°C em frasco sob proteção da luz. Durante todo o preparo as vidrarias foram esterilizadas (CAMPOS; CAMPOS; POZZA, 2006). Após a adição da solução corante nas suspensões de nematoides, essas foram incubadas em banho-maria a 60°C por 20 min, seguida de repouso em temperatura ambiente por aproximadamente 12 h. Para concentrar a suspensão em 0,5 mL, foi retirada parte da solução corante sobrenadante com uma pipeta automática. Posteriormente adicionaram-se 3 mL de solução de glicerina, na proporção de 1 (água) : 1 (glicerina pura) e armazenada em temperatura ambiente. Após esse procedimento, o conteúdo de lipídios neutros ficou colorido de vermelho. Os espécimes foram coletados individualmente e transferidos para lâminas de microscópio de luz, em gotas de solução de glicerina, 1 (água) : 1 (glicerina pura). Os espécimes foram fotografados individualmente. As fotos obtidas foram editadas no programa do *Windows, Paint* e as imagens foram utilizadas para calcular o percentual de lipídios de cada espécimes amostrados por meio do software QUANT 1.0.1 (VALE; FERNANDES; LIBERATO, 2001).

Os espécimes móveis foram contados por meio de observação das amostras de nematoides em microscópio de luz invertido. A seguir foram adicionadas duas gotas 50 - 100 μL) de NaOH em suspensões de nematoides alocados em orifícios em placa de elisa e os espécimes que não se mexiam mesmo após a adição do NaOH foram considerados mortos (CHEN; DICKSON, 2000).

Sementes de milho da cultivar DKB 390 foram desinfestadas superficialmente com solução de hipoclorito de sódio 1%, por um 1 min e mantidas em bandeja coberta com papel filtro por 48 h para secar. Essas sementes foram semeadas em tubos de ensaio de 60 cm^3 contendo areia fina quartizífera esterilizada e mantidos em B.O.D com fotoperíodo de 12 h e temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, dez dias após a semeadura infestou-se a areia de cada tubo com uma suspensão de 1 mL contendo 400 espécimes de *P. brachyurus*. Foi utilizado o delineamento

experimental inteiramente casualizado, com 5 tratamentos (tempos de incubação sob restrição alimentar) e 5 repetições. Os tubos foram mantidos a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ até o final do experimento.

Dez dias após a inoculação das plantas de milho, o sistema radicular foi retirado dos tubos de ensaio jorrando água nas paredes. As raízes obtidas foram lavadas em água corrente, clareadas com hipoclorito de sódio 1,5% por 10 min e novamente lavadas em água corrente para eliminar o resíduo de hipoclorito de sódio. As raízes foram então transferidas para frascos de vidro, onde adicionou-se solução de fucsina ácida até cobrir totalmente as raízes. A solução de fucsina foi preparada utilizando 3,5 g de fucsina ácida + 250 mL de ácido láctico + 750 mL de água destilada (CAMPOS; CAMPOS; POZZA, 2006, adaptado de BYRD; KIRKPATRICK; BARKER, 1983) e diluído 1: 29 (1 mL de solução corante inicial + 29 mL de água destilada). As raízes na solução de fucsina foram incubadas em água fervente por 2 min e posteriormente mantidas em temperatura ambiente durante a noite para resfriar. Em seguida, as raízes foram lavadas em água corrente e imersas em solução de glicerina 1 (água) : 1 (glicerina pura) por no mínimo 2 h. Lâminas foram montadas com as raízes utilizando glicerina pura e essas observadas em microscópio estereoscópico para determinar o número de nematoides que penetraram nas raízes.

3. RESULTADOS

3.1. Estudo da dinâmica da perda de lipídios de *Pratylenchus brachyurus* e *Meloidogyne incognita*

Os J2 de *P. brachyurus*, recém eclodidos apresentaram uma área colorida do corpo variando de 20,52 a 30,35%. A maior porcentagem obtida ao decorrer deste experimento foi de 40,91% e a menor zero. A porcentagem de energia corporal tendeu à redução com o decorrer dos dias de armazenamento e aos 30 dias a média atingiu 5,2 % (Fig. 1A).

Os juvenis e adultos de *P. brachyurus* apresentaram entre 57,05 e 82,27 % da área corporal colorida com o corante *Oil Red O*, logo após extração dos espécimes das raízes de milho, obtidas no campo. A maior porcentagem observada durante o ensaio foi de 89,68% e a menor zero. Os valores de lipídios neste experimento também tenderam a redução ao longo dos dias. Após 30 dias a média de porcentagem lipídica foi de 22,85% (Fig. 1B).

Nos J2 de *M. incognita* recém-eclodidos a porcentagem da área corporal colorida variou entre 63,92 e 74,82%, com uma redução ao longo dos dias. Porém a partir do dia 27°

dia não se encontrou nematoides coloridos pelo corante *Oil Red O*. O maior e menor valor de teor de lipídio encontrado foi 74,83% e zero respectivamente (Fig. 1C).

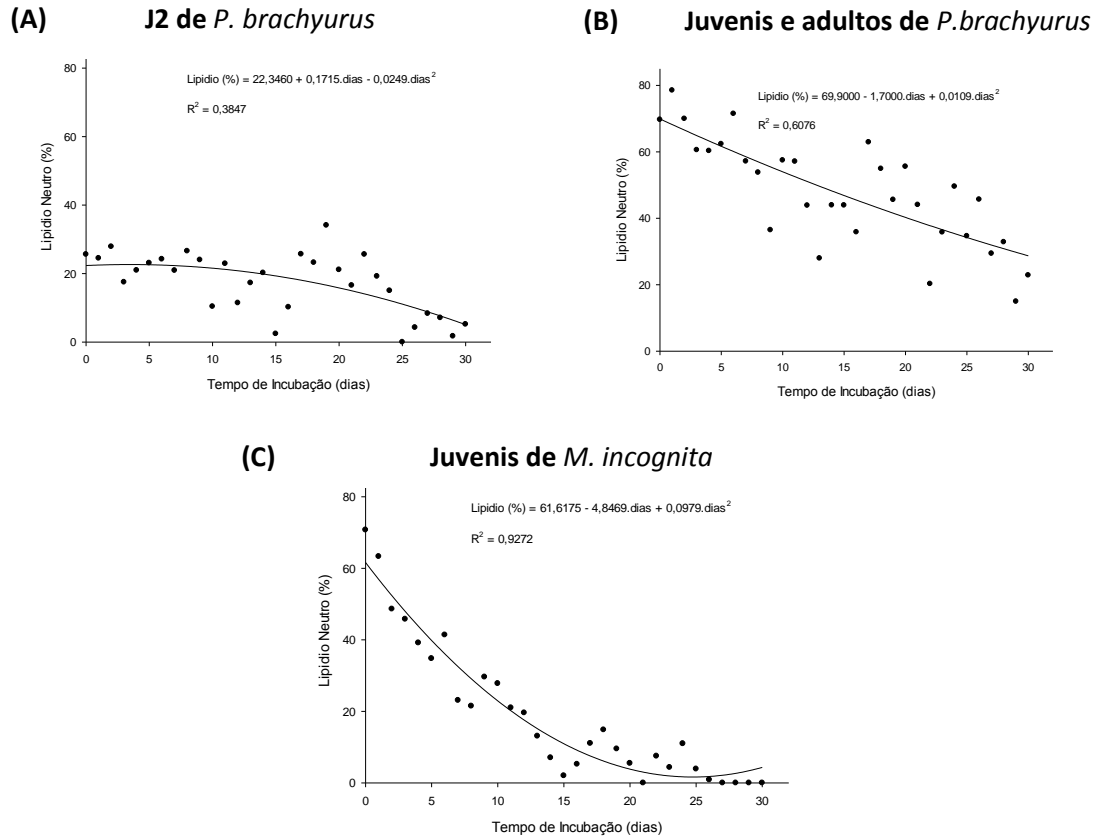


Fig. 1 – Porcentagem da área corporal lipídica dos fitonematoides coloridos por *Oil Red O* avaliados diariamente durante 30 dias, sendo os espécimes submetidos à incubação em água a 25°C (*P. brachyurus* e 28°C (*M. incognita*) e sob restrição alimentar. Para obtenção destes teores foi realizada a coloração dos espécimes com o corante *Oil Red O* e quantificação através da diferença da área do corpo do nematoide pela área colorida por meio do programa Quant.



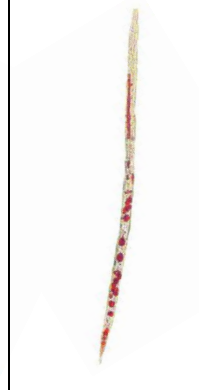




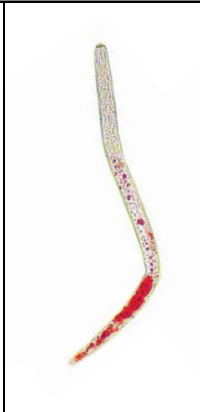
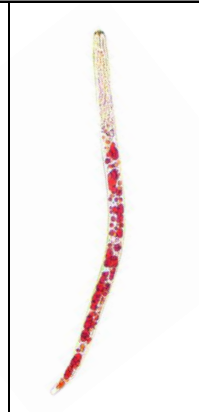

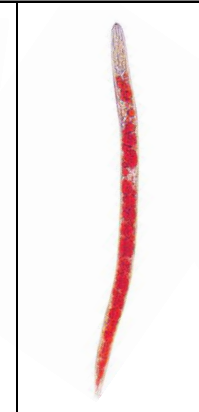
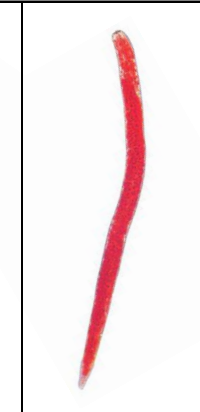





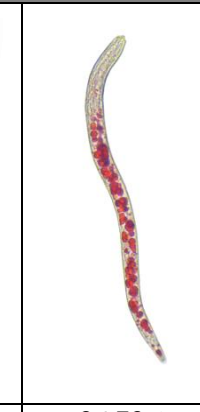
A – Juvenis do segundo estágio de <i>Meloidogyne incognita</i>					
					
0 %	13,63%	22,75%	37,8%	45,93%	63,92%
B – Juvenis e Adultos de <i>Pratylenchus brachyurus</i>					
					
0 %	17,45%	24,57%	39,31%	67,23%	80,61%
C – Juvenis do segundo estágio de <i>Pratylenchus brachyurus</i>					
					
0%	6,69%	17,64%	21,5%	25,66%	36,73%

Fig. 2 - Variações no conteúdo de lipídios neutros corporais em juvenis e adultos de *Pratylenchus brachyurus* e *Meloidogyne incognita*. A porcentagem de lipídios neutros foi determinada através da relação entre área total e área colorida de cada nematoide com o corante *Oil Red O*, para quantificação do valor foi utilizado o programa Quant. À medida que aumentava os dias de incubação diminuía a quantidade de lipídios neutros corporais.

Em relação às áreas coloridas pelo corante “*Oil Red O* (Fig. 2), observou-se que elas ficaram com coloração vermelha e que aumentaram a área e intensidade de coloração, com o aumento das porcentagens de lipídio, em geral as maiores porcentagens de lipídio neutro foram observadas nos primeiros dias de incubação e as menores nos últimos dias. Ocorreu uma variação entre essas duas espécies. Na suspensão contendo juvenis e adultos de *P. brachyurus*, foi observado nematoides com coloração na região anterior do corpo, sendo que isto foi raramente observado na suspensão de *M. incognita*, porém em geral a região com maior concentração de cor nas duas espécies foi a do intestino. Outro fator observado foi que a redução da coloração em *M. incognita* apresentou-se de forma mais localizada, já em *P. brachyurus* isso não foi observado, neste caso observou-se uma redução de forma mais uniforme ao longo da área colorida total.

3.2. Estudo da penetração de *Pratylenchus brachyurus* relacionada com a sua reserva lipídica

A incubação dos nematoides proporcionou ao decorrer do tempo uma redução tanto na porcentagem de área colorida por *Oil Red O*, quanto na infectividade, ou seja, a quantidade de nematoides que penetraram as raízes (Fig. 3A e 3B). Dos nematoides recém-eclodidos (zero dias) e inoculados nas raízes de milho, menos de 25% foram capazes de infectar as raízes (Fig. 3B). A redução na infectividade foi mais acentuada no primeiro tempo de incubação (7 dias), onde ocorreu uma redução de 71,91% em relação à testemunha, sendo os nematoides recém-eclodidos considerados como testemunha. Nos outros intervalos de incubação, a redução na infectividade foi menos acentuada. No maior tempo de incubação (28 dias), apenas 2% dos nematoides inoculados foram capazes de infectar as raízes (Fig. 3B).

A redução da porcentagem de lipídio no decorrer do tempo foi em geral pouco acentuada quando comparada com a quantidade de nematoides infectivos. Os nematoides recém-eclodidos apresentaram em média 27,42% de área colorida com o corante. Aos 14 e 21 dias os valores de área colorida foram muito próximos, mantendo-se assim praticamente constantes. No 28º dia de incubação os nematoides apresentaram uma redução de 68,13% na área colorida com o corante em relação aos nematoides recém-eclodidos.

Todos os nematoides inoculados no primeiro dia de experimento estavam móveis, a variável motilidade reduziu com o tempo de incubação, sendo que no primeiro intervalo de 0 a 7 dias, ocorreu uma queda brusca nesta variável, 62% de redução. Nos próximos intervalos observou-se uma tendência de redução de nematoides móveis, porém de forma menos

acentuada. Aos 28 dias apenas 30% dos nematoides estavam se movimentando (Fig. 3C). Em relação à mortalidade, observamos que a tendência com o tempo foi aumentar, porém os valores se mantiveram baixos, sendo que no último dia de experimento a porcentagem de nematoides mortos foi de 20% (Fig. 3C).

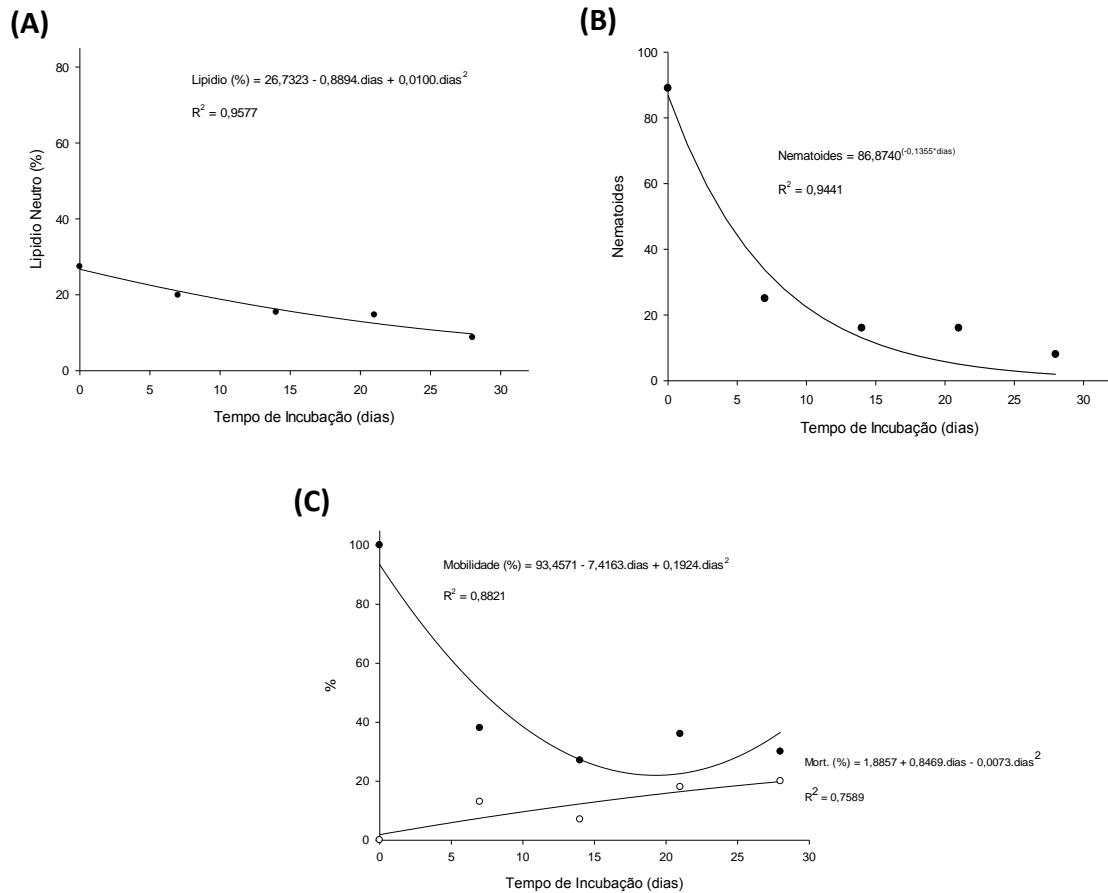


Fig. 3 - (A) Porcentagem de área colorida por *Oil Red O* nos intervalos de 0, 7, 14, 21 e 28 dias de incubação em água a 25°C, sob restrição alimentar de J2 de *P. brachyurus*. A área colorida foi determinada utilizando o programa de análise de imagens Quant, por meio da diferença da área total do nematoide e área colorida com o corante Oil Red O. **(B)** Infectividade de J2 de *P. brachyurus* em raízes de milho nos intervalos de 0, 7, 14, 21 e 28 dias de incubação em água, sob - restrição alimentar a 25° C. Valor determinado através da coloração das raízes, com o corante fucsina ácida, o que possibilitou visualização dos espécimes no interior das raízes por meio do uso de microscópio estereoscópico. **(C)** Mobilidade e mortalidade durante a incubação em água parada, sob restrição alimentar a 25 °C J2 de *P. brachyurus*. A mobilidade foi determinada pela observação dos nematoides móveis e imóveis em microscópio de luz invertido e a mortalidade foi determinada por meio da aplicação de NaOH na suspensão de nematoides.

Observou-se que as áreas coloridas pelo corante “*Oil Red O*” se apresentaram com coloração vermelha e em forma de grânulos, e à medida que a área colorida reduzia, reduziam também as dimensões dos grânulos, dando o aspecto de menor intensidade de cor (Fig. 2). Em alguns casos observamos presença de grânulos na parte anterior e posterior do corpo dos nematoides, porém em geral a região com maior concentração de corante, foi a do intestino. E essa redução de intensidade de cor ocorreu de forma uniforme. Em geral as maiores porcentagens de lipídios neutros foram observadas nos primeiros dias de incubação e as menores nos maiores intervalos de tempo de incubação.

4. DISCUSSÃO

A queda da energia corporal em *P. brachyurus* durante a incubação não foi tão acentuada como a observada em trabalho de Campos; Campos e Pozza (2006) com *M. javanica*, o que pode ser explicado pela baixa motilidade observada em *P. brachyurus*, pois apesar de haver 100% de motilidade no primeiro dia pós-eclosão, essa motilidade caiu drasticamente nos primeiros dias de incubação, o que pode ter reduzido a atividade muscular. Segundo Bergeson (1959) a atividade muscular é o principal dreno desta energia, assim *P. brachyurus* consegue preservar a sua energia por maiores períodos de tempo quando comparado com *M. javanica*.

Além disso, alguns autores relatam que a redução das reservas lipídicas, está correlacionada com a redução da motilidade (STOREY, 1983; STOREY, 1984; ROBINSON; ATKINSON; PERRY, 1987a; ROBINSON; ATKINSON; PERRY, 1987b). Freire et al. (2007) observou que a imobilidade dos J2 de *M. incognita* aumentou com o período de armazenamento, com o aumento da temperatura e com o borbulhamento da água e acredita que a diminuição dos movimentos do J2 preservam a sua energia corporal, a qual pode ser empregada no parasitismo.

A redução da quantidade de energia corporal provocou uma queda na infectividade dos nematoides, o que mostra que os lipídios neutros são essenciais na atividade infectiva de *P. brachyurus*. Campos; Campos e Pozza (2006) também observaram uma redução na infectividade dos J2 e segundo esses autores o teor de lipídio neutro é essencial no fornecimento de energia para o processo de infecção do hospedeiro, locomoção e funções vitais do nematoide. De acordo com Freire et al. (2007) espécimes de *M. incognita* mantidos em solo à 28° C também reduzem a sua capacidade infectiva e a umidade também é um fator que influencia nesta capacidade. Após 4 dias de armazenamento em solo à 28°C e com baixa

umidade Freire et al (2007), observou uma redução da infectividade em *M. incognita* de aproximadamente 98%.

As áreas não coloridas pelo corante “*Oil Red O*” possivelmente não possuem lipídio ou a quantidade não é suficiente para ser corada (CAMPOS; CAMPOS; POZZA, 2006). A principal fonte de energia para os nematoides é a lipídica (LEE; ATKINSON, 1977; STOREY, 1983; CHRISTOPHERS et al., 1997), porém o glicogênio e a trealose são outras fontes de energia que podem estar presentes no corpo dos nematoides (LEE; ATKINSON, 1977; QIU; BEDDING, 2000).

Foi observado também que os juvenis de *P. brachyurus* no início do seu ciclo de vida (J2), apresentaram menor porcentagem de área colorida do que os espécimes adultos ou de estágios superiores e obtidos de raízes, isso pode ser explicado pelo trabalho de Storey (1982) com *P. thornei* que sugere que os lipídios neutros são altamente acumulados pelos juvenis, porém durante o seu desenvolvimento nas raízes da planta hospedeira e sugere também que os juvenis de *P. thornei* acumulam lipídios de 13% ao dia, partindo do seu conteúdo inicial, durante um período típico de desenvolvimento de 30 dias a 20°C. Outro fator importante mostrado por Storey (1982) é o fato de que o nível de metabolismo do nematoide está relacionado com o tamanho do seu corpo, ou seja, estágio de desenvolvimento e assim as reservas que são acumuladas pelos juvenis são mantidas pelos adultos, sem acréscimo, o que pode ser explicado pelos gastos com reprodução.

Como os nematoides destes ensaios estavam sob restrição alimentar, eles não tinham como obter energia de fontes externas, assim ocorreu o gasto de energia armazenada em forma de lipídio e outras, porém não ocorreu a reposição, com isso a tendência com o tempo de incubação foi a redução do teor de lipídios neutros. Essa redução do teor de lipídio corporal ao longo dos dias de incubação já foi observada em diversos trabalhos com espécies de *Meloidogyne* (VAN GUNDY; BIRD; WALLACE, 1967; CAMPOS; CAMPOS; POZZA, 2006; ROCHA et al., 2016). Trabalho semelhante realizado por Storey (1982) com *P. thornei*, no qual os nematoides foram armazenados por 6 semanas à 10°C, mostrou que juvenis perderam durante o período de incubação, 89% de seu conteúdo lipídico, enquanto que os machos e fêmeas perderam 48% e 43% respectivamente.

De acordo com os resultados obtidos neste estudo, podemos concluir que o armazenamento dos fitonematoides, sob restrição alimentar e nas temperaturas de 25 e 28°C, *P. brachyurus* e *M. incognita* respectivamente, provocou a redução do conteúdo lipídico corporal com o passar do tempo de incubação. Além disso, a infectividade de *P. brachyurus* foi reduzida com a redução do teor de lipídio corporal. *P. brachyurus* eclode com uma

quantidade de energia corporal menor do que *M. incognita*, porém eles possuem uma capacidade maior de preservação desta energia.

5. REFERÊNCIAS

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

BYRD, D.W.; KIRKPATRICK, T. JR.; BARKER, K.R. An improved technique for clearing and staining plant tissues for detection of nematodes. **Journal of Nematology**, 15:142-143, 1983.

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

CAMPOS, H. D.; CAMPOS, V. P.; POZZA, E. A. Efeito do tempo e da temperatura de incubação de juvenis do segundo estágio (J2) no teor de lipídio corporal e no parasitismo de *Meloidogyne javanica* em soja. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n. 04, p. 387-393, 2006.

CHARCHAR, J. M.; VIEIRA, J. V.; FACION, C. E. Controle de nematóides das galhas em cenoura através de rotação. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 25, Supl., p. 335, 2000. (Resumo).

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

CHITAMBAR, J. J.; RASKI, D. J. Life history of *Pratylenchus vulnus* on carrot disks. **Journal of Nematology**, 17 (4): 617-619, 1985.

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**, 43(1), 117-120, 1997.

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

DA SILVA ROCHA, F.; CAMPOS, V. P.; FERNANDES, M. D. F. G.; MUNIZ, M. D. F. S. Migration and reproduction of *Meloidogyne incognita* in two soil textures. **Nematropica**, 46(2), 162-171, 2016

FERRAZ, L. C. C. B. Gênero *Pratylenchus* – os nematoides das lesões radiculares. In: **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. Passo Fundo: Gráfica e Editora PE. Berthier, v. 7, p. 157-195, 1999.

FERRAZ, L.C.C.B.; BROWN, D. J. F. **Nematologia de plantas: fundamentos e importância**. (Orgs.). Manaus: NORMA EDITORA, 251 p. II, 2016.

FREIRE, E. S.; CAMPOS, V. P.; DUTRA, M. R.; ROCHA, F. D. S.; SILVA, J. R. C. D.; 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**, 33(3), 270-274, 2007

GONZAGA, V.; SANTOS, J. M.; COSTA, M. A. F. Multiplicação de *Pratylenchus* spp. “in vitro” em cilindros de cenoura. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA**, XXIX, Salvador. Resumos, p. 208, 2006.

GONZAGA, V. J. M.; SOARES, P. L. M. **Chave ilustrada para a identificação das seis espécies de *Pratylenchus* mais comuns no Brasil**. 2012.

GONZAGA, V.; SANTOS, J. M. Estudo comparativo de multiplicação in vitro de seis espécies de *Pratylenchus* em cilindros de cenoura. **Nematologia Brasileira**, v. 34, p. 226-230, 2010.

GOULART, A. M. C. Aspectos Gerais sobre nematoides das lesões radiculares (gênero *Pratylenchus*). Planaltina, DF: **Embrapa Cerrados**. 30 p (Documentos - ISSN 1517- 5111; 219), 2008.

HUANG, C. S. Inoculação artificial de *Meloidogyne javanica* em cenoura (*Daucus carota* L.). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 10, p. 642, 1983.

HUANG, S. P.; PORTO, M. V. F. Efeito do alqueive na população dos nematóides das galhas e na produção de cenoura. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 13, p. 377-388, 1988.

HUSSEY, R.S.; BARKER, K. R. A comparison of methods for collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. **Plant Disease Reporter**, 57:1025-1128, 1973.

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

LORDELLO, L. G. E. **Nematoides das plantas cultivadas**. São Paulo: Nobel, 314p, 1981.

MACHADO, A. Nematóide: a praga que custa R\$ 35 bilhões ao agronegócio brasileiro. **Acontece**, Piracicaba, out. 2015. Disponível em: <[http://www.adealq.org.br/acontece/Nematóide-a-praga-que-custa-R\\$-35-bilh%C3%B5es-ao-agroneg%C3%B3cio-brasileiro-1410](http://www.adealq.org.br/acontece/Nematóide-a-praga-que-custa-R$-35-bilh%C3%B5es-ao-agroneg%C3%B3cio-brasileiro-1410)>. Acesso em: 05 jun, 2017.

MOUNTAIN, W.B. A method of culturing plant parasitic nematodes under sterile conditions. **Proceeding of the Helminthological Society of Washington**, 22 (1): 49-52, 1955.

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

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 Nematologie** 10:343-348, 1987a.

ROBINSON, M. P.; ATKINSON, H. J; PERRY, R. N. The influence of temperature on the hatching, activity, and lipid utilization of second-stage juveniles of the potato cyst nematodes *Globodera rostochiensis* and *G. pallida*. **Revue de Nematologie**. 10: 349-354, 1987b.

SASSER, J. N.; FRECKMAN, D. W. A world perspective on nematology: the role of the society. In: VEECH, J. A.; DICKSON, D. W. (eds). **Vistas on Nematology**. Hyattsville: **Society of Nematologists**, p. 7-14, 1987.

STOREY, R. M. J. The initial neutral lipid reserves of juveniles of *Globodera* spp. **Nematologica**, 29:144-150. 1983.

STOREY, R. M. J. The relationship between neutral lipid reserves and infectivity for hatched and dormant juveniles of *Globodera* sp. **Annals of Applied Biology**. 104:511-520, 1984.

TENENTE, R. C. V.; GONZAGA, V.; MELO, L.A.M.P.; TENENTE, M.S.M. Bibliografia Brasileira de Nematoides. Brasília: **EMBRAPA-CERNAGEN**, p.386 (Documentos, 76), 2002.

TIHOHOD, D. **Nematologia agrícola aplicada**. 2.ed. Jaboticabal: FUNEP. 473 p, 2000.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS. Biblioteca Universitária. **Manual de normalização e estrutura de trabalhos acadêmicos: TCCs, monografias, dissertações e teses**. 2. ed. rev., atual. e ampl. Lavras, 2016. Disponível em: <<http://repositorio.ufla.br/jspui/handle/1/11017>>. Acesso em: 08 de abril de 2017.

VALE, F. X. R. E; FERNANDES, F.; LIBERATO, J. R. "**Quantificação de doenças-Quant: versão 1.0. 1.**" Viçosa: UFV, 2001. Software.

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, 1967.

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