

= NEMATOLOGIA BRASILEIRA =  
Volume 32 Fascículo 4 - Dezembro de 2008

ARTIGOS

(\*) com texto em inglês

**Uso de Sementes de Mamão e Solarização do Solo no Controle de *Meloidogyne javanica* e *Meloidogyne incognita*** - Wânia S. Neves, Leandro G. Freitas, Marcelo M. Coutinho, Rosângela Dallemole-Giaretta & Silamar Ferraz ..... 253-259

**Patogenicidade de *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida: Steinernematidae) ao Cupim de Montículo *Cornitermes cumulans* (Isoptera: Termitidae)** - Juliana M.O. Rosa, Sílvia R.S. Wilcken, Carlos F. Wilcken & Luís G. Leite ..... 260-269

**Influência da Nutrição Mineral na Distribuição Espacial do Nematóide de Cisto da Soja** - Jadir B. Pinheiro, Edson A. Pozza, Adélia A. Alexandre Pozza, Alécio S. Moreira, Marcelo de C. Alves & Vicente P. Campos ..... 270-278

**Reação de Espécies de Plantas Daninhas a *Meloidogyne paranaensis*** - Ana Paula do A. Mônaco, Rui G. Carneiro, Walter M. Kranz, José Carlos Gomes, Alexandra Scherer, Kelly C. Nakamura, Marcela P. Moritz, Débora C. Santiago ..... 279-284

**(\*) Reação de cultivares de banana (*Musa* spp.) a *Meloidogyne incognita* raças 1 e 4** - Renata C.V. Tenente, Marcos B. FôNSECA, Antonia I.M. Sousa-Vilardi, Sebastião O. Silva, Sebastião P. Silva Neto, Ernany G. Silva, Osmar A. Carrijo & Mario Araya ..... 285-293

**Migração de *Meloidogyne incognita* para as Raízes de Soja *In Vitro*** - Fernando S. Rocha, Vicente P. Campos, Esdras H. Silva, Silvânia P.S. Rocha, Maria C. Carli & Lilian S. A. S. Costa ..... 294-302

**(\*) Variabilidade patogênica e genética de populações de *Radopholus similis* em bananeiras (*Musa acuminata* AAA and AA) baseada em marcadores RAPD** - Dilson C. Costa, Fabio G. Faleiro, Juvenil E. Cares & Antonio C. Gomes ..... 303-316

## Comunicações

**Influência da Dose de Juvenis Infectantes e da Massa de Larvas de *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) na Produção *in Vivo* de *Heterorhabditis baujardi* LPP7 (Rhabditida: Heterorhabditidae) - Paulo V.C. Dias, Claudia Dolinski & Juan P. Molina A. .... 317-321**

**(\*) Temperaturas mínima e ótima para penetração de *Meloidogyne chitwoodi* raças 1 e 2 e *M. hapla* em raízes de batata ‘Russet Burbank’ - João M. Charchar\* & Gerald S. Santo ..... 322-326**

**Efeito da Concentração de Clamidósporos de *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* no Controle de *Meloidogyne javanica* - Rosangela Dallemole-Giaretta, Leandro G. Freitas, Silamar Ferraz, Wânia S. Neves, Everaldo A. Lopes & Marcelo M. Coutinho ..... 327-332**

**(\*) Número de gerações e infecção de tubérculos por *Meloidogyne chitwoodi* raça 1 e *M. hapla* em batata ‘Russet Burbank’ em microparcelas de campo - João M. Charchar1\* & Gerald S. Santo ..... 333-337**

# = NEMATOLOGIA BRASILEIRA =

## Volume 32 (4) - December 2008

### ARTICLES

With text in Portuguese, except (\*) with text in English

**The use of papaya seeds and solarization for the control of *Meloidogyne javanica* and *Meloidogyne incognita*** - Wânia S. Neves, Leandro G. Freitas, Marcelo M. Coutinho, Rosângela Dallemole-Giaretta & Silamar Ferraz ..... 253-259

**Pathogenicity of *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida: Steinernematidae) to the mound termite *Cornitermes cumulans* (Isoptera: Termitidae)** - Juliana M.O. Rosa, Sílvia R.S. Wilcken, Carlos F. Wilcken & Luís G. Leite ..... 260-269

**Influence of mineral nutrition in the spatial distribution of the Soybean Cyst Nematode** - Jadir B. Pinheiro, Edson A. Pozza, Adélia A. Alexandre Pozza, Alcécio S. Moreira, Marcelo de C. Alves & Vicente P. Campos ..... 270-278

**Host reaction of weed species to *Meloidogyne paranaensis*** - Ana Paula do A. Mônaco, Rui G. Carneiro, Walter M. Kranz, José Carlos Gomes, Alexandra Scherer, Kelly C. Nakamura, Marcela P. Moritz, Débora C. Santiago ..... 279-284

**(\*) Reaction of Different Banana (*Musa* spp.) Cultivars to *Meloidogyne incognita* Races 1 and 4** - Renata C.V. Tenente, Marcos B. FôNSECA, Antonia I.M. Sousa-Vilardi, Sebastião O. Silva, Sebastião P. Silva Neto, Ernany G. Silvas, Osmar A. Carrijo & Mario Araya ..... 285-293

***In Vitro* migration of *Meloidogyne incognita* toward soybean roots** - Fernando S. Rocha, Vicente P. Campos, Esdras H. Silva, Silvânia P.S. Rocha, Maria C. Carli & Lilian S. A. S. Costa ..... 294-302

**(\*) Pathogenicity and Genetic Variability of *Radopholus similis* Populations in Bananas (*Musa acuminata* AAA and AA) based on RAPD Analysis** - Dilson C. Costa, Fabio G. Faleiro, Juvenil E. Cares & Antonio C. Gomes ..... 303-316

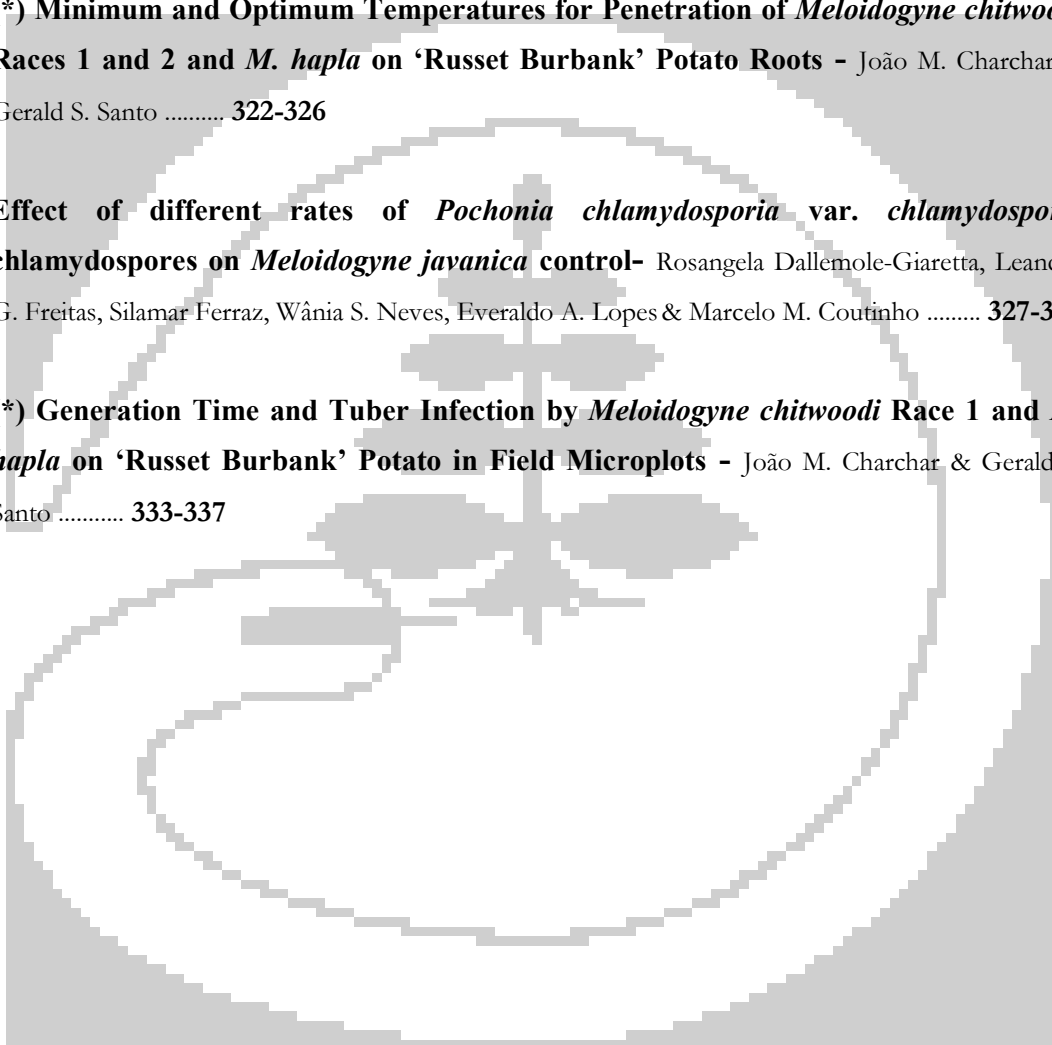
## **Brief Communications**

**Influence of infective juvenile doses and *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae weight in the *in vivo* production of *Heterorhabditis baujardi* LPP7 (Rhabditida: Heterorhabditidae) - Paulo V.C. Dias, Claudia Dolinski & Juan P. Molina A. .... 317-321**

**(\*) Minimum and Optimum Temperatures for Penetration of *Meloidogyne chitwoodi* Races 1 and 2 and *M. hapla* on ‘Russet Burbank’ Potato Roots - João M. Charchar & Gerald S. Santo ..... 322-326**

**Effect of different rates of *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* chlamydospores on *Meloidogyne javanica* control- Rosangela Dallemole-Giaretta, Leandro G. Freitas, Silamar Ferraz, Wânia S. Neves, Everaldo A. Lopes & Marcelo M. Coutinho ..... 327-332**

**(\*) Generation Time and Tuber Infection by *Meloidogyne chitwoodi* Race 1 and *M. hapla* on ‘Russet Burbank’ Potato in Field Microplots - João M. Charchar & Gerald S. Santo ..... 333-337**



## Uso de Sementes de Mamão e Solarização do Solo no Controle de *Meloidogyne javanica* e *Meloidogyne incognita*\*

Wânia S. Neves<sup>1\*\*</sup>, Leandro G. Freitas<sup>1</sup>, Marcelo M. Coutinho<sup>1</sup>, Rosângela Dallemole-Giaretta<sup>1</sup> & Silamar Ferraz<sup>1</sup>

\*Parte da Tese da primeira autora, para obtenção do título de Doutor pela Universidade Federal de Viçosa (MG), com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

<sup>1</sup>Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, 36571-000 Viçosa (MG) Brasil.

\*\*Autora para correspondência: waciasantosneves@yahoo.com.br

Recebido para publicação em 28 / 06 / 2007. Aceito em 14 / 06 / 2008

Editado por Guilherme Asmus

**Resumo** – Neves, W.S., L.G. Freitas, M.M. Coutinho, R. Dallemole-Giaretta & S. Ferraz. 2008. Uso de sementes de mamão e solarização do solo no controle de *Meloidogyne javanica* e *Meloidogyne incognita*.

A incorporação ao solo de sementes de mamão, com ou sem solarização, foi avaliada como método de controle de *M. javanica* e *M. incognita* em casa-de-vegetação. Mudanças de tomate com 20 dias de idade foram transplantadas para vasos contendo mistura de solo e areia na proporção 1:1 (v:v). Dois dias após o transplante, o solo foi infestado com 5.000 ovos de um dos nematóides. Decorridos 60 dias para a multiplicação do nematóide, as plantas foram retiradas e o solo proveniente de todos os vasos foi misturado em betoneira para homogeneizar a distribuição dos nematóides. O pó de mamão foi preparado triturando-se sementes secas de mamão em multiprocessador. A cada litro de solo foram incorporadas 100 g de pó de sementes de mamão e a mistura foi redistribuída em vasos que foram envoltos com polietileno transparente por 30 dias. Após 24 horas da retirada do plástico, plantou-se uma muda de tomate por vaso. Os tratamentos constaram de incorporação de material vegetal com ou sem cobertura com plástico. No tratamento testemunha foi feito pousio do solo durante 30 dias. Após 60 dias foram avaliados o peso das raízes, o peso da parte aérea e a altura das plantas, o número de galhas e de ovos do sistema radicular. A incorporação das sementes de mamão ao solo resultou em até 100 % de controle dos nematóides em relação ao número de galhas e de ovos por sistema radicular para as duas espécies de nematóides. A altura e o peso da parte aérea das plantas, bem como das raízes, foram superiores nos tratamentos em que foi incorporada ao solo a semente de mamão, independente da cobertura com o plástico.

**Palavras-chaves:** *Meloidogyne javanica*, *Meloidogyne incognita*, biofumigação, sementes, mamão.

**Summary** – Neves, W.S., L.G. Freitas, M.M. Coutinho, R. Dallemole-Giaretta & S. Ferraz. 2008. The use of papaya-seed and solarization for the control of *Meloidogyne javanica* and *Meloidogyne incognita*.

The incorporation of papaya-seed into the soil, with or without solarization, was evaluated, in a greenhouse experiment, as a method for controlling *M. javanica* and *M. incognita*. Twenty-day-old tomato seedlings were transplanted to pots containing a mixture of soil and sand at the proportion of 1:1 (v:v). After two days, the soil was infested with 5,000 eggs of one of the nematodes. After allowing 60 days for the nematode rearing, the whole plants were pulled out from the pots, and the substrates were mixed in a concrete mixer machine to homogenize the nematode distribution. The papaya seed powder was made by grinding dry seeds of papaya in a food processor. The papaya seed (100 g) was added into 1 liter of soil, the mixture was replaced into the pots that were subsequently covered with transparent polyethylene for 30 days to trap any volatiles produced. One tomato seedling was transplanted per pot 24 hours after plastic removal. Fallow was done in the control treatment. The numbers of galls and eggs per root system and the weight and height of the shoot were evaluated 60 days

after the transplanting. The incorporation of the papaya-seed resulted in 100 % control, measured as the number of galls and eggs per root system for both nematode species. The height and weight of the aerial parts of the plants as well as root weight were higher in the treatments where the papaya-seed was incorporated, independently of the plastic cover.

**Key words** – *Meloidogyne javanica*, *Meloidogyne incognita*, biofumigation, seeds, papaya.

## Introdução

A crescente importância dos fitonematóides na agricultura e seu difícil manejo, principalmente devido à toxicidade dos nematicidas químicos, fazem com que haja uma busca cada vez maior por alternativas para o controle de nematóides que sejam, ao mesmo tempo, baratas, eficientes e ecologicamente aceitáveis. Segundo Katan & De Vay (1991), a cobertura do solo com plástico transparente (solarização), além de matar nematóides pelo calor, induz processos microbianos que promovem a supressividade do solo. A combinação da solarização com a biofumigação, que consiste na produção de gases tóxicos durante a decomposição de certos materiais orgânicos, faz com que o controle de patógenos do solo se torne mais eficiente (Stapleton & De Vay, 1995). O alil isotiocianato é um composto volátil tóxico para fungos e nematóides (Lewis & Papavizas, 1971; Neves *et al.*, 2003). Segundo Neves *et al.* (2003), experimentos em casa-de-vegetação com esse composto promoveram 100 % de controle de *Meloidogyne javanica* em tomateiro. Sementes de mamão (*Carica papaya* L.) contêm glucosinolatos que dão origem a benzil-isotiocianato (Dar *et al.*, 1965; Kermanshai *et al.*, 2001) e têm ação anti-helmíntica comprovada, sendo usada como vermífugo na medicina popular (Roig y Mesa, 1974; Lal *et al.*, 1976; Werner *et al.*, 1992). O efeito anti-helmíntico da semente de mamão tem sido comprovado em testes *in vitro* em animais infectados (Krishnakumari e Majumder, 1960; Dar *et al.*, 1965; Lal *et al.*, 1976). Neves *et al.* (2005a) estudaram a atividade de extrato aquoso de sementes de mamão sobre a eclosão de juvenis de *M. javanica* e de *M. incognita* em testes *in vitro* e constataram redução na eclosão de *M. javanica* em 95,3 % e de *M. incognita* em 99,3 %. Em outro trabalho, Neves *et al.* (2005b) estudaram o efeito nematostático e nematicida de sementes de mamão sobre *M. javanica* e *M. incognita* e relataram que houve 100 % de eficiência na morte de juvenis de ambas as

espécies do nematóide, demonstrando que esse material pode ser uma eficiente opção de controle de nematóides no solo.

Assim sendo, esse trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da incorporação ao solo de sementes de mamão, secas e moídas, com e sem cobertura com filme plástico transparente, no controle dos nematóides *M. incognita* e *M. javanica*, em casa-de-vegetação.

## Material e Métodos

Os nematóides *Meloidogyne javanica* e *M. incognita* foram multiplicados e mantidos em raízes de tomateiro ‘Santa Clara’, em casa-de-vegetação. O substrato empregado para plantio do tomateiro foi composto de solo e areia na proporção 1:1 (v:v) e a mistura tratada com brometo de metila. Mudanças de tomateiro ‘Santa Clara’ com 20 dias de idade foram transplantadas para vasos plásticos contendo quatro litros do substrato. Dois dias após o transplantio das mudas, o solo de cada vaso foi infestado com 5.000 ovos de *M. javanica* ou *M. incognita* provenientes de populações puras, previamente confirmadas por eletroforese. Durante a condução dos tomateiros foram feitas irrigações diárias e adubações de cobertura quinzenais, com N, P, K e micronutrientes.

As sementes de mamão (SM) foram separadas da polpa dos frutos, lavadas e secas em estufas por 36 horas a aproximadamente, 60 °C. Após a secagem, as sementes foram trituradas em multiprocessador obtendo-se um pó, que foi armazenado em local seco e ventilado até sua utilização nos experimentos.

Em vasos de plástico de 1 litro de capacidade foi colocada a mistura de solo argiloso e areia, na proporção de 1:1 (v:v), previamente peneirados e tratados com brometo de metila. O substrato de cada vaso foi infestado com suspensão de 5.000 ovos de *M. javanica* ou de *M. incognita*, obtidos de raízes de tomateiro pela extração segundo o método de Hussey

& Barker, adaptado por Boneti & Ferraz (1981). O transplântio de mudas de tomate foi feito dois dias após a infestação do solo. Para simular uma infestação natural de nematóides no campo, as plantas de tomate foram cultivadas em casa-de-vegetação durante três meses.

Decorrido esse período, as plantas foram retiradas e o solo foi revolvido em uma betoneira por dez minutos para homogeneização. Foram coletadas subamostras do solo, antes da biofumigação, para formar uma amostra composta da qual foi feita uma análise para quantificar os nematóides, extraídos pelo método de flutuação centrífuga em solução de sacarose (Jenkins, 1964). O solo foi colocado novamente nos vasos e 100 g do pó de SM foram incorporados, o que correspondeu à concentração de 10 %. A incorporação do pó de SM ao solo foi feita colocando-se o solo e o pó da semente em um saco plástico, homogeneizando a mistura manualmente. Em seguida a mistura solo + SM foi acondicionada nos vasos novamente. O solo com a SM incorporada foi molhado até próximo à capacidade de campo e coberto com plástico de polietileno transparente com espessura de 100 µm. Um tratamento com solo infestado com o nematóide, sem a incorporação do pó de SM e sem a cobertura com o plástico constituiu o tratamento testemunha. Após 30 dias da cobertura do solo, o plástico foi retirado e após 24 horas foi plantada uma muda de tomate de aproximadamente 20 dias de idade em cada vaso. As plantas foram cultivadas por um período de 60 dias, recebendo os tratamentos culturais necessários. A temperatura máxima e mínima do ambiente foi monitorada diariamente. As médias da temperatura máxima e mínima no interior da casa-de-vegetação durante o período de tratamento do solo foram de 32 °C e 14 °C respectivamente. A extração dos juvenis do solo pelo método de Jenkins (1964) resultou na média de 170 juvenis de *M. javanica* / 100 cm<sup>3</sup> e 659 juvenis de *M. incognita* / 100 cm<sup>3</sup>.

Os tratamentos foram: **1)** solo infestado com os nematóides com incorporação do pó de SM, sem cobertura com plástico transparente; **2)** solo infestado com incorporação do pó de SM, coberto com plástico transparente; **3)** solo infestado e coberto com plástico transparente; **4)** solo infestado (testemunha pousio); **5)** solo infestado com plantio contínuo de tomateiro;

**6)** solo não infestado (testemunha negativa). O peso e a altura da parte aérea das plantas, o peso dos sistemas radiculares e o número de galhas e de ovos por planta foram avaliados após 60 dias do transplântio das mudas. Para a retirada dos ovos do sistema radicular, as raízes de cada planta foram agitadas manualmente em recipiente fechado com 250 ml de NaOCl na concentração de 0,5 %, durante 3 minutos. A seguir, os ovos foram coletados em peneira de 0,025 mm de abertura (500 *mesh*) e enxaguados em água corrente e guardados em tubos plásticos armazenados na geladeira (7 °C) até o momento da avaliação. Os ovos foram contados com o auxílio de câmara de Peters e microscópio estereoscópio.

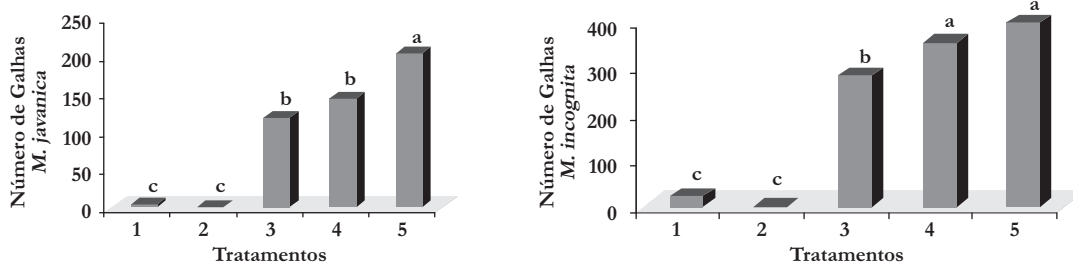
Os ensaios foram montados em delineamento inteiramente casualizado, com dez repetições para cada tratamento. Os dados obtidos na avaliação foram submetidos à ANOVA e as médias foram comparadas pelo teste de Duncan a 5 % de probabilidade.

## Resultados e Discussão

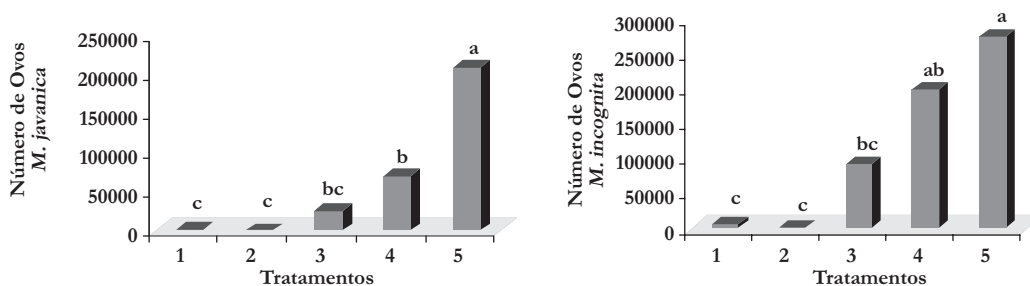
A biofumigação do solo com a SM (incorporação da SM + cobertura) reduziu em 100 % o número de galhas (Figura 1) e de ovos (Figura 2) de *M. javanica* e de *M. incognita*. O número de galhas e de ovos no tratamento em que houve apenas a incorporação da SM ao solo sem a cobertura com o plástico não diferiu estatisticamente do número de galhas e de ovos obtidos no tratamento em que foi incorporado o pó de SM ao solo com posterior cobertura com o plástico.

Os glicosinatos liberam isotiocianatos, nitrilas e tiocianatos (Mayton *et al.*, 1996; Mithen, 2001; Wittstock and Halkier, 2002) e a SM contém glicosinatos que dão origem a benzil-isotiocianato (Dar *et al.*, 1965; Kermanshai *et al.*, 2001). Portanto os resultados aqui encontrados corroboram os resultados anteriores encontrados por Neves (2003), em que o alil isotiocianato apresentou 100 % de eficiência no controle de *M. javanica* em tomateiro cultivado em vasos em casa-de-vegetação. Lazzeri *et al.* (1993) investigaram o efeito de glicosinatos e de seus produtos sobre o nematóide *Heterodera schachtii*, observando que alil isotiocianato causou a morte de 100 % dos nematóides após 96 horas de exposição ao produto *in vitro*.

Experimentos *in vitro* realizados por Neves *et al.*



**Figura 1** - Número de galhas por sistema radicular de plantas de tomateiro cultivadas em solo infestado com nematóides, submetido a diferentes tratamentos: **1)** incorporação de pó de sementes de mamão, sem cobertura com plástico transparente; **2)** biofumigação com pó de sementes de mamão (incorporação + cobertura com plástico); **3)** solarização do solo; **4)** testemunha pousio; **5)** plantio contínuo de tomateiro. Barras com letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan ( $P \leq 0,05$ ).



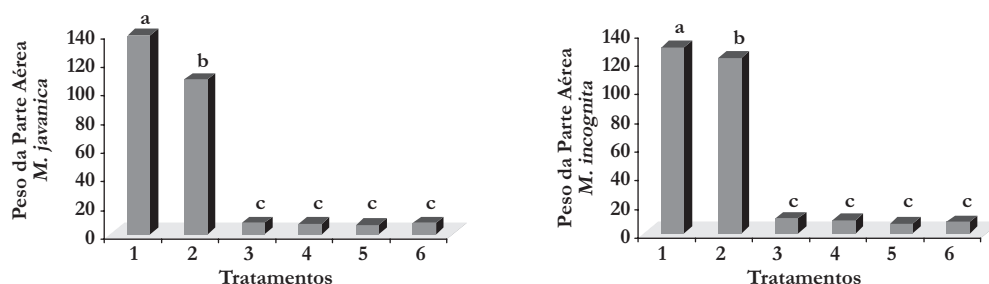
**Figura 2** - Número de ovos por sistema radicular de plantas de tomateiro cultivadas em solo infestado com nematóides, submetido a diferentes tratamentos: **1)** incorporação de pó de sementes de mamão, sem cobertura com plástico transparente; **2)** biofumigação com pó de sementes de mamão (incorporação + cobertura com plástico); **3)** solarização do solo; **4)** testemunha pousio; **5)** plantio contínuo de tomateiro. Barras com letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan ( $P \leq 0,05$ ).

(2005a,b) com extrato de SM resultaram na morte de 100 % de juvenis de *M. javanica* e *M. incognita* e redução da eclosão de juvenis de *M. javanica* de *M. incognita* em 95,3 % e 99,3 %, respectivamente. Coimbra *et al.* (2006) também observaram 100 % de imobilidade de juvenis e adultos do nematóide *Scutellonema bradys* após a exposição por 24 horas aos extratos de sementes e de folhas de mamão. Esses autores também obtiveram nesse trabalho 67,2 % e 64,8 % de mortalidade do nematóide exposto ao extrato de SM e de folhas de mamão, respectivamente. Tais resultados comprovam a eficiência do uso de SM no controle de nematóides.

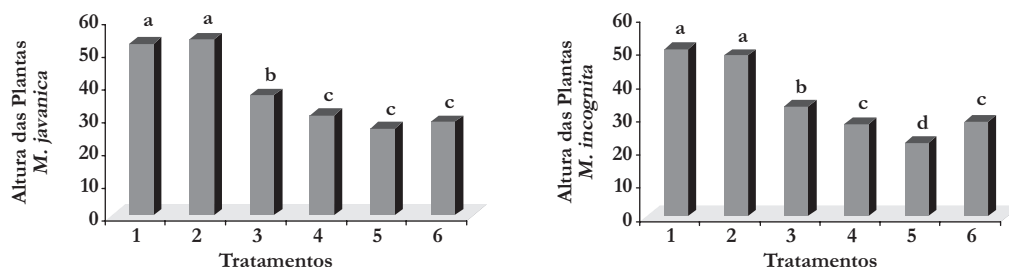
As plantas cultivadas em solo incorporado com pó de SM, independente da cobertura com o plástico, tiveram peso da parte aérea, altura e peso das raízes muito superiores aos demais tratamentos (Figura 3, 4 e 5). Nas plantas cultivadas em solo infestado com *M. javanica*, o tratamento em que o pó de SM foi apenas incorporado ao solo proporcionou um aumento de

780 %, 1.682 % e 84 % em relação ao peso das raízes, ao peso e a altura da parte aérea das plantas, respectivamente. No solo infestado com *M. javanica* tratado com incorporação do pó de SM com a cobertura com plástico, esse ganho de massa radicular, massa e altura da parte aérea das plantas foi, respectivamente, na ordem de 492 %, 1.284 % e 88,5 %, quando comparado às plantas cultivadas em solo não infestado com nematóide. Em relação aos pesos da raiz e da parte aérea, as plantas do tratamento em que o pó de SM foi apenas incorporado apresentaram valores estatisticamente maiores em comparação ao tratamento do solo com a biofumigação com a SM. O tratamento em que o solo foi apenas solarizado, sem incorporação da SM, não diferiu do tratamento em que o solo foi submetido a cultivos sucessivos durante todo o período do experimento e nem dos tratamentos sem nematóide e do pousio em relação à massa da parte aérea e radicular. Já em relação à altura,

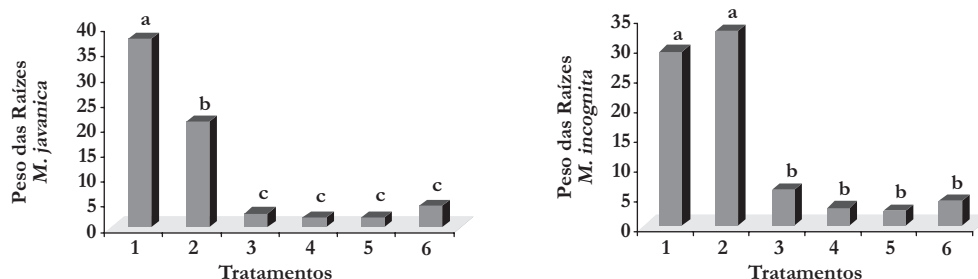




**Figura 3** - Peso da parte aérea (g) de plantas de tomateiro cultivadas em solo infestado com *Meloidogyne javanica* e *M. incognita*, submetido a diferentes tratamentos: **1)** incorporação de pó de sementes de mamão, sem cobertura com plástico transparente; **2)** biofumigação com pó de sementes de mamão (incorporação + cobertura com plástico); **3)** solarização do solo; **4)** testemunha pousio; **5)** plantio contínuo de tomateiro; **6)** solo não infestado com nematóide. Barras com letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan ( $P \leq 0,05$ ).



**Figura 4** - Altura (cm) das plantas de tomateiro cultivadas em solo infestado com *Meloidogyne javanica* e *M. incognita*, submetido a diferentes tratamentos: **1)** incorporação de pó de sementes de mamão, sem cobertura com plástico transparente; **2)** biofumigação com pó de sementes de mamão (incorporação + cobertura com plástico); **3)** solarização do solo; **4)** testemunha pousio; **5)** plantio contínuo de tomateiro; **6)** solo não infestado com nematóide. Barras com letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan ( $P \leq 0,05$ ).



**Figura 5** - Peso (g) do sistema radicular de plantas de tomateiro cultivadas em solo infestado com *Meloidogyne javanica* e *M. incognita*, submetido a diferentes tratamentos: **1)** incorporação de pó de sementes de mamão, sem cobertura com plástico transparente; **2)** biofumigação com pó de sementes de mamão (incorporação + cobertura com plástico); **3)** solarização do solo; **4)** testemunha pousio; **5)** plantio contínuo de tomateiro; **6)** solo não infestado com nematóide. Barras com letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan ( $P \leq 0,05$ ).

as plantas do solo solarizado foram maiores que as plantas cultivadas em solo sem nematóide, pousio e plantio sucessivo de tomate.

Nas plantas cultivadas em solo infestado com *M. incognita* o tratamento em que o pó da SM foi apenas incorporado ao solo proporcionou um aumento de 670 %, 1.561 % e 77 % no que diz respeito ao peso radicular e ao peso e à altura da parte aérea das plantas, respectivamente. Já no solo tratado com a biofumigação com SM, esse aumento foi de 590 %, 1.467 % e 70 % para o peso das raízes e para o peso e altura da parte aérea das plantas, respectivamente. Em relação à altura e massa das raízes das plantas, não houve diferença estatística entre cobrir o solo com plástico transparente ou não, após a incorporação do pó de SM. Já em relação ao peso da parte aérea das plantas, as plantas cultivadas em solo apenas com a incorporação do pó apresentaram maior valor que plantas cultivadas em solo tratado com a incorporação do pó de SM e cobertura com plástico. Ou seja, apenas a incorporação da SM já é suficiente para o aumento do peso e da altura das plantas, não sendo necessário a cobertura com plástico. Os pesos das raízes e da parte aérea das plantas cultivadas em solo solarizado não diferiram estatisticamente dos tratamentos pousio, solo sem infestação de nematóides e solo cultivado com plantios sucessivos de tomate. Porém em relação à altura, as plantas cultivadas em solo solarizado apresentaram valores maiores que as plantas de tais tratamentos, sendo esse valor menor apenas nos tratamentos em que a SM foi incorporada ao solo. Tanto para *M. javanica* quanto para *M. incognita*, os tratamentos testemunha pousio, solo sem infestação de nematóides e solo cultivado com plantios sucessivos de tomate não diferiram estatisticamente entre si em relação ao peso das raízes e da parte aérea das plantas.

Os resultados encontrados no presente trabalho consolidam a afirmação de que a incorporação de material vegetal ao solo resulta, em muitos casos, em um aumento do peso das plantas, o que pode refletir em um aumento final da produtividade da cultura. Nos resultados obtidos por Blum *et al.* (2003) os autores observaram que incorporações de cama aviária e, em menor intensidade, de casca de pinus, melhoraram as propriedades físicas e químicas do solo, favorecendo assim a emergência e o desenvolvimento inicial de

cucurbitáceas como a moranga e o pepino, o que pode ocasionar aumentos na produtividade. No trabalho realizado por Demétrio *et al.* (1998), a incorporação de feijão-bravo, *Capparis flexuosa*, ao solo proporcionou valores de produção de matéria seca de milho superiores aos obtidos com a aplicação de nitrogênio ao solo. Nesse trabalho os autores demonstram que o acúmulo de N no tecido do milho nos tratamentos com incorporação de feijão-bravo, foi semelhante à quantidade de N acumulada no tratamento com aplicação exclusiva de N, mostrando a eficiência no fornecimento de N pela incorporação de material vegetal ao solo, mesmo para cultura de ciclo curto.

Neste trabalho, concluiu-se que tanto a biofumigação do solo com SM como apenas a incorporação das sementes ao solo exerce controle altamente eficiente de *M. javanica* e *M. incognita*, além de promover o crescimento das plantas tanto em relação ao peso das raízes como também em relação ao peso da parte aérea e a altura das plantas. Pelos valores encontrados no presente trabalho, essa promoção do crescimento das plantas por si só já é suficiente para que o uso da semente de mamão incorporada ao solo seja altamente promissor. Além desse fato, pelo controle do nematóide observado nesse estudo, o uso da semente de mamão pode ser indicado como produto alternativo eficiente, principalmente no contexto das agriculturas familiar, sustentável e orgânica.

### Literatura Citada

- BONETI, J.I.S. & S. FERRAZ. 1981. Modificação do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de raízes de cafeeiro. Fitopatologia Brasileira, 6 (Suplemento): 553 (Resumo).
- BLUM, L.E.B., C.V.T. AMARANTE, G. GÜTTLER, A.F. MACEDO, D. KOTHE, A. SIMMLER, G. PRADO & L. GUIMARÃES. 2003. Produção de moranga e pepino em solo com incorporação de cama aviária e casca de pinus. Horticultura Brasileira, 21 (4): 627-631.
- COIMBRA, J.L., A.C.F. SOARES, M.S. GARRIDO, C.S. SOUSA & F.L.B. RIBEIRO. 2006. Toxicidade de extratos vegetais a *Scutellonema bradyi*. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 41 (7): 1209-1211.
- DAR, R.N., L.C. GARG & R.D. PATHAK. 1965. Anthelmintic activity of *Carica papaya* seeds. Indian Journal of Pharmacy, 27: 335-336.
- DEMÉTRIO, R., J.G.M. GUERRA, G.A. SANTOS, D.L. ALMEIDA, H. POLLI & F.A.O. CAMARGO. 1998.

- Absorção de nitrogênio do solo pelo milho influenciada pela adição de diferentes resíduos de culturas. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, 33 (4): 481-486.
- HUSSEY, R.S. 1985. Host-parasite relationship and associated physiological changes. In: SASSER, J.N. & C.C. CARTER (ed). An Advanced Treatise on *Meloidogyne* - Biology and Control. Raleigh (NC) EUA, North Carolina State University Graphics, p. 143-153.
- JENKINS, W.R. 1964. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. Plant Disease Reporter, 48: 692.
- KATAN, J. & J.E. De VAY. 1991. Soil Solarization. CRC Press, Boca Raton (FL) EUA, 267 p.
- KERMANSKAI, R., B.E. McCARRY, J. ROSENFELD, P.S. SUMMERS, E.A. WERETILNYK & G.J. SORGER, 2001. Benzyl isothiocyanate is the chief or sole anthelmintic in papaya seed extracts. Phytochemistry, 57: 427-435.
- KRISHNAKUMARI, M.K. & S.K. MAJUMDER. 1960. Studies on anthelmintic activities of seeds of *Carica papaya* Linn. Annals of Biochemistry and Experimental Medicine, 20: 551-556.
- LAL, J., S.CHANDRA, V. RAVIPRKASH & M.SABIR. 1976. *In vitro* anthelmintic action of some indigenous medicinal plants on *Ascaridia gali* worms. Indian Journal of Physiology and Pharmacology, 20: 64-68.
- LAZZERI, L., R.TACCONI & S. PALMIERI. 1993. *In vitro* activity of some glucosinolates and their reaction products toward a population of the nematode *Heterodera schachtii*. Journal Agricultural Food Chemical, 41: 825-829.
- LEWIS, J.A. & G.C. PAPAIVIZAS. 1971. Effect of sulfur-containing volatile compounds and vapors from cabbage decomposition on *Aphanomyces euteiches*. Phytopathology, 61: 208-214.
- MITHEN, R.F. 2001. Glucosinolates and their degradation products. Advances in Botanical Research, 35: 213-262.
- NEVES, W.S., M.M. COUTINHO, R.J.F. ZOOCA, R. DALLEMOLE-GIARETTA & L.G. FREITAS. 2005a. Inibição da eclosão de juvenis de *Meloidogyne javanica* e de *M. incognita* por extrato aquoso de sementes de mamão. In: XXXIII Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Brasília (DF). Fitopatologia Brasileira, 32 (Suplemento).
- NEVES, W.S., M.M. COUTINHO, R. DALLEMOLE-GIARETTA, R.J.F. ZOOCA, L.G. FREITAS & C.F.S. FABRY. 2005b. Atividade nematicida de extratos de semente de mamão sobre juvenis de *Meloidogyne javanica* e *M. incognita*. In: XXXIII Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Brasília (DF). Fitopatologia Brasileira, 32 (Suplemento).
- NEVES, W.S. 2003. Atividade nematicida de extratos de pimenta malagueta, mostarda e alho sobre *Meloidogyne javanica* (Tese de Mestrado). Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa (MG).
- ROIG y MESA, J.T. 1945. Plantas Medicinales Aromaticas o Venenosas de Cuba. Cultura, Havana (Cuba), 872 p.
- STAPLETON, J.J. & J.E. De VAY. 1995. A soil solarization: a natural mechanism of integrated pest management. In: REUVENI, R. (ed). Novel Approaches in Integrated Pest Management. Lewis, Boca Raton (FL) EUA, p. 309-322.
- WERNER, D., C. THUMAN & J. MAXWELL. 1992. Where there is no doctor: a village health care handbook. Hesperian Foundation, Palo Alto (CA) EUA., 446 p.
- WITTSTOCK, U. & B.A. HALKIER. 2002. Glucosinolate research in the *Arabidopsis* era. Trends in Plant Science, 7: 263-270.

## Patogenicidade de *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida: Steinernematidae) ao Cupim de Montículo *Cornitermes cumulans* (Isoptera: Termitidae)

Juliana M.O. Rosa<sup>1\*</sup>, Silvia R.S. Wilcken<sup>1</sup>, Carlos F. Wilcken<sup>1</sup>  
& Luís G. Leite<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Setor de Defesa Fitossanitária, Departamento de Produção Vegetal, Faculdade de Ciências Agrônomicas - Universidade Estadual Paulista (FCA – UNESP), 18610-307 Botucatu (SP) Brasil.

<sup>2</sup>Centro Experimental do Instituto Biológico, 13001-970 Campinas (SP) Brasil.

\*Autora para correspondência: jmorosa@fca.unesp.br

Recebido para publicação em 20 / 04 / 2007. Aceito em 14 / 07 / 2008

Editado por Luiz Carlos Ferraz

**Resumo** - Rosa, J.M.O., S.R.S. Wilcken, C. F. Wilcken & L.G. Leite. 2008. Patogenicidade de *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida: Steinernematidae) ao cupim de montículo *Cornitermes cumulans* (Isoptera: Termitidae).

*Cornitermes cumulans* é uma espécie de cupim freqüente em áreas de pastagens do Brasil, principalmente nas mais degradadas. O método mais indicado ao seu controle tem sido o químico, embora medidas de combate sejam geralmente evitadas pelos produtores. O controle biológico dessa praga com fungos entomopatogênicos, e possivelmente com nematóides entomopatogênicos, tem sido considerado técnica promissora e até recomendada em alguns países. Assim, com o objetivo de verificar a patogenicidade de *Steinernema carpocapsae* (isolado não identificado) às castas (operários e soldados) de *C. cumulans*, foram realizados um experimento em placas de Petri, com avaliações diárias, e dois em colônias artificiais. Num dos experimentos em colônias artificiais, a suspensão de nematóides, nas concentrações de 167 e 333 juvenis infectantes (JI) por inseto, foi aplicada sobre o alimento dos cupins e, no outro, a suspensão, nas concentrações de 133, 267 e 533 JI por inseto, foi aplicada sobre as colônias artificiais; esses dois experimentos foram avaliados nos 1º, 5º e 9º dias após a inoculação. Cada inseto morto foi dissecado para verificação dos nematóides. *S. carpocapsae* foi patogênico às duas castas de *C. cumulans*, em todos os experimentos.

**Palavras-chaves:** nematóides entomopatogênicos, controle biológico, pragas, pastagens.

**Summary** - Rosa, J.M.O., S.R.S. Wilcken, C. F. Wilcken & L.G. Leite. 2008. Pathogenicity of *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida: Steinernematidae) to the mound termite *Cornitermes cumulans* (Isoptera: Termitidae).

*Cornitermes cumulans* is a termite species often found in pastures of Brazil, mainly in the most degraded ones. Chemical control has been the most recommended method against this insect pest, but control measures are usually avoided by farmers. Biocontrol of termites with entomopathogenic fungi and possibly with entomopathogenic nematodes have been considered promising techniques, being recommended for use in several countries. This study aimed to evaluate the pathogenicity of *Steinernema carpocapsae* (an unidentified isolate) against *C. cumulans* castes (workers and soldiers). Three experiments were done, one using Petri dishes, with daily evaluations, and two others in artificial colonies (with workers and soldiers). For one of the experiments in artificial colonies, nematode suspensions (167 and 333 infective juveniles (IJ) per insect) were applied over the food supplied to the termites. For the other experiment, nematode suspensions (133, 267 and 533 IJ per insect) were applied directly over the artificial termite colonies. In these two experiments evaluations were done 1, 5 and 9 days after nematode application. Each dead insect was dissected for nematode verification. *S. carpocapsae* was highly pathogenic to both castes of *C. cumulans* in all experiments.

**Key words:** Entomopathogenic nematodes, biological control, pests, pastures.

## Introdução

O gênero *Cornitermes* ocorre principalmente nas florestas tropicais e cerrados da América do Sul e a espécie *C. cumulans* (Kollar, 1832) (Isoptera: Termitidae) predomina nas regiões de invernos amenos e verões muito quentes. No Brasil, essa espécie é mais freqüente nas regiões Sul e Sudeste, e no Mato Grosso do Sul (Cancellato, 1989). É mais relatada em lavouras, principalmente sob plantio direto, e em pastagens. Constrói montículos típicos, de formato cônico, variando de tamanho e coloração, dependendo da idade e região (Cooplantio, 2003). Ninhos epigeus predominam em áreas menos sujeitas à mecanização, como as pastagens. Assim, caso não haja a preocupação de controlá-los, pastagens mais velhas tenderão a apresentar níveis de infestação mais elevados (Embrapa, 1996; Valério *et al.*, 2006).

Segundo Arrigoni *et al.* (1989), na cultura da cana-de-açúcar, as espécies *Heterotermes tenuis* (Hagen, 1858) (Isoptera: Rhinotermitidae) e *C. cumulans* são tidas como pragas importantes, pois são as mais freqüentes e de maior distribuição. Quando a colheita da cana-de-açúcar é feita manualmente, os montículos de *C. cumulans* são na maioria destruídos nos tratamentos culturais após a colheita. Contudo, na colheita mecanizada, acabam sendo obstáculos reais quando atingidos pelas lâminas basais das máquinas. Assim, a atual recomendação é de que se realize a destruição mecânica dos montículos antes do preparo do solo, seguida por controle químico dirigido a eles (Valério *et al.*, 2004). O controle químico dos cupins vem sendo realizado há muitos anos, sendo que, para algumas espécies, este tipo de controle ainda se constitui em um método insubstituível, como no caso dos cupins de madeira em geral (Almeida & Alves, 1995).

O biocontrole de cupins com fungos entomopatogênicos vem sendo pesquisado e desenvolvido (Alves & Almeida, 1995; Jones *et al.*, 1996; Neves & Alves, 1999). Entretanto, ainda há controvérsias sobre a eficácia desses agentes contra essas pragas. Nematóides entomopatogênicos, ou simplesmente NEPs, têm demonstrado serem eficientes agentes de controle biológico para diversas pragas. Apresentam simbiose com bactérias patogênicas a insetos, que são introduzidas nos corpos das pragas-alvo e causam alta mortalidade destas após

24 a 48 horas (Ferraz *et al.*, 2008). Segundo Aguilera & De Nardo (2003), há grande interesse de empresas em todo o mundo na produção e comercialização de produtos à base de NEPs, especialmente dos gêneros *Steinernema* e *Heterorhabditis*, para uso em culturas de alto valor comercial ou nas quais o uso de inseticidas químicos não seja recomendado ou permitido.

Grewal (2000) relatou que *Steinernema carpocapsae* (Weiser, 1955) (Rhabditida: Steinernematidae) é uma das espécies de NEPs mais estudadas eficientes no controle de um amplo círculo de insetos hospedeiros. Sua produção em larga escala não é complexa e mostra-se viável para comercialização sob diferentes formulações.

Andaló *et al.* (2004) realizaram bioensaio para seleção de nematóides utilizando *Heterorhabditis* sp., *Steinernema arenarium* (Artyukhovsky, 1967), *S. carpocapsae* e *S. glaseri* (Steiner, 1929) em três concentrações (25, 50 e 100 nematóides / cochonilha), visando ao controle de fêmeas adultas da cochonilha da raiz do cafeeiro. Esses nematóides foram aplicados em placas de Petri contendo areia e 10 cochonilhas / placa. Observaram que *S. carpocapsae* na menor concentração causou maior mortalidade (78 %) em relação aos demais nematóides nas concentrações testadas, sendo esta espécie selecionada, pelos autores, por causar maior mortalidade em menor tempo, ou seja, em três dias.

Em relação à ação de NEPs sobre cupins que não *C. cumulans*, encontra-se na literatura nacional a referência de Passos & Alves (1995) dando conta de altos índices de mortalidade de soldados e operários de *H. tenuis* em laboratório, quando se inoculou *S. carpocapsae* isolado Exhibit à razão de 75 juvenis infectantes / cm<sup>2</sup> do substrato usado como isca (papel corrugado). Tais resultados não foram tidos como conclusivos, porque se verificou que a substância ativadora dos nematóides contida no produto comercial mostrou certa toxicidade frente aos cupins. Quando se empregaram níveis mais elevados, como 1000 juvenis / cm<sup>2</sup>, os nematóides apresentaram aparente efeito repelente, sendo detectados e evitados pelos cupins.

O presente estudo teve como objetivo verificar a patogenicidade de *S. carpocapsae*, em diferentes concentrações e formas de exposição do agente às

castas do cupim de montículo, *C. cumulans*, sob condição de laboratório.

## Material e Métodos

Os experimentos conduzidos, um em placa de Petri e dois em colônias artificiais do cupim, foram desenvolvidos no Laboratório de Nematologia da FCA - UNESP, Botucatu (SP). Utilizou-se nos três experimentos um isolado não identificado de *S. carpocapsae*, originário da Universidade da Flórida, cuja população inicial foi gentilmente fornecida pelo Departamento de Biotecnologia Vegetal da Universidade Federal de São Carlos, Campus de Araras (SP).

**Experimento em placas de Petri.** Este primeiro experimento foi conduzido com o objetivo de verificar a patogenicidade de *S. carpocapsae* a operários e soldados de *C. cumulans* em placas de Petri de 10,0 cm de diâmetro. Cada tratamento constou de cinco repetições, cada uma delas representada por uma placa de Petri contendo cinco operários ou cinco soldados, totalizando 25 operários ou 25 soldados por concentração. Cada placa teve a base revestida com papel de filtro umedecido com 1,0 ml de água destilada esterilizada e, em seguida, recebeu 1,0 ml de suspensão contendo 10.000 ou 20.000 nematóides, equivalente, respectivamente, às concentrações de 2.000 e 4.000 juvenis infectantes / inseto. As testemunhas constaram de cinco placas para cada casta e receberam apenas volume equivalente de água destilada esterilizada. As placas foram então mantidas em BOD na temperatura

de 25 °C. As avaliações da mortalidade foram feitas a cada 24 horas, até o 10º. dia, sendo os insetos mortos contados e separados individualmente em placas de Petri de 2,0 cm de diâmetro. Após quatro dias, os cupins mortos foram dissecados para verificação de nematóides. Os dados de mortalidade diária foram utilizados para cálculo da porcentagem da mortalidade acumulada.

**Experimento em colônias artificiais com o inóculo aplicado sobre o alimento.** O experimento foi conduzido em colônias artificiais (Figura 1), utilizando-se recipientes plásticos contendo camada de 1 cm de gesso no fundo, coberto com 400 ml de terra autoclavada. Aproximadamente 400 g da região do oco basal do cupinzeiro foram colocados em cada recipiente, sendo adicionados indivíduos das duas castas de *C. cumulans* na proporção de 1:5 (10 soldados para 50 operários). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com três tratamentos e cinco repetições (cupinzeiros), sendo a testemunha inoculada com 1 ml de água destilada / autoclavada.

A suspensão de nematóides foi adicionada com o auxílio de pipeta sobre 50 g de bagaço de cana-de-açúcar fornecido como alimento, sendo este espalhado, após a inoculação da suspensão, sob a colônia artificial. Na primeira concentração de *S. carpocapsae*, utilizou-se 0,60 ml de água destilada / autoclavada e 0,40 ml de suspensão contendo 10.000 JI, equivalente aproximadamente a 167 JI / inseto. Na segunda, foram 0,20 ml de água destilada / autoclavada e 0,80 ml de suspensão contendo



Figura 1 – Colônias artificiais do cupim de montículo (*Cornitermes cumulans*).

20.000 JI, equivalente a aproximadamente 333 JI / inseto. As avaliações ocorreram após 24, 120 e 216 horas (1º, 5º. e 9º. dias) da inoculação, quando os insetos mortos foram contados, separados e mantidos individualizados em placa de Petri de 2,0 cm de diâmetro, com papel filtro umedecido, e mantidas a 25 °C. Após quatro dias, os cupins mortos foram dissecados e examinados para verificação de nematóides. Os dados de mortalidade foram utilizados para o cálculo da porcentagem de mortalidade acumulada.

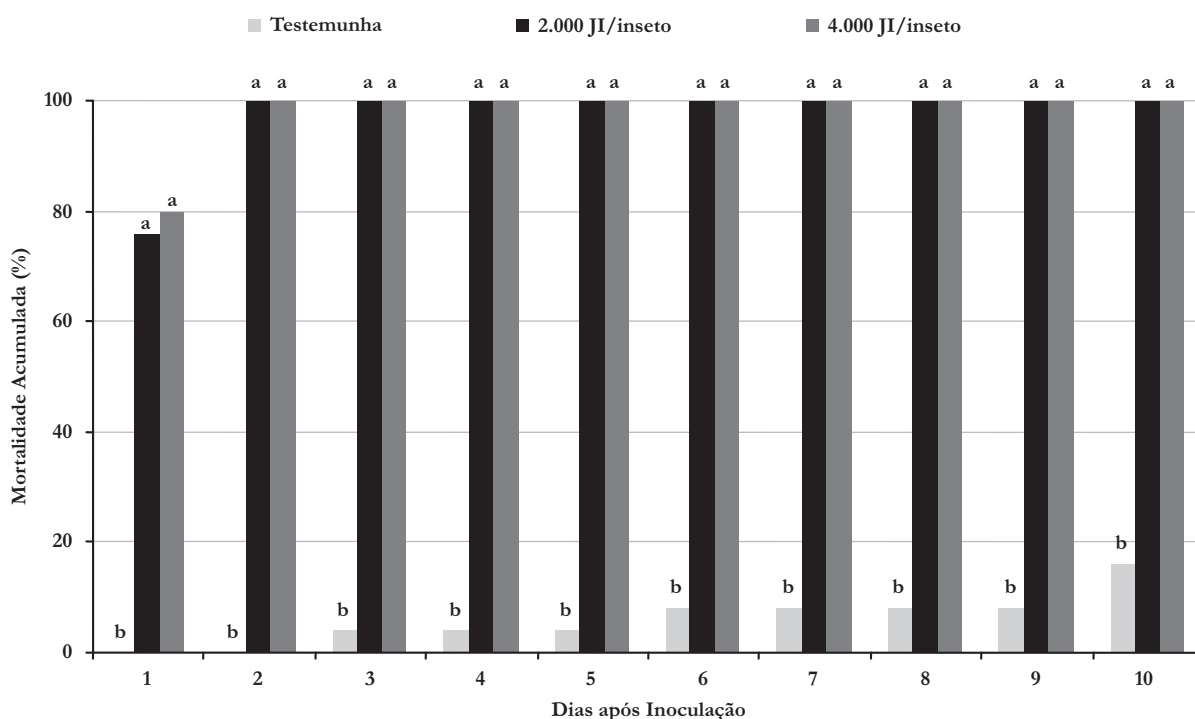
**Experimento em colônias artificiais com inóculo aplicado sobre a colônia.** Este experimento foi conduzido de forma semelhante à descrita no item anterior, apenas diferindo nas concentrações utilizadas (aproximadamente 133, 267 e 533 JI / inseto e a testemunha) e no volume de aplicação (8 ml) e modo de exposição (suspensão aplicada com pipeta sobre a colônia artificial). Constituiu-se de quatro tratamentos com cinco repetições, totalizando 20 parcelas (15 com e cinco sem nematóides), sendo os insetos coletados de cupinzeiros de pastagens ao redor da Fazenda Experimental Lageado, Botucatu (SP).

Para verificação da infectividade dos nematóides utilizados em ambos os experimentos com as colônias artificiais, foram mantidas três placas de Petri com cinco lagartas de *Galleria mellonella* L. inoculadas com as respectivas concentrações de *S. carpocapsae*.

**Análise estatística.** Os dados de porcentagem de mortalidade acumulada dos experimentos foram transformados em  $\sqrt{x + 0,5}$  e submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5 %, utilizando o programa computacional Sanest.

## Resultados e Discussão

**Experimento em placas de Petri.** Já no 1º. dia de avaliação, as duas concentrações de *S. carpocapsae* proporcionaram altas mortalidades acumuladas dos operários, de 76 e 80 % para as concentrações de 2.000 e 4.000 JI / inseto, respectivamente (Figura 2). No 2º. dia, verificou-se 100 % de mortalidade acumulada dos operários em ambas as concentrações, sendo que até este dia não houve mortalidade de operários na testemunha. Apesar de se ter 100 % de mortalidade



**Figura 2** – Mortalidade acumulada (%) de operários de *Cornitermes cumulans* expostos a *Steinernema carpocapsae* nas concentrações de 2.000 e 4.000 JI / inseto, e na testemunha. Experimento em placas de Petri. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 %, comparadas no mesmo dia de avaliação.

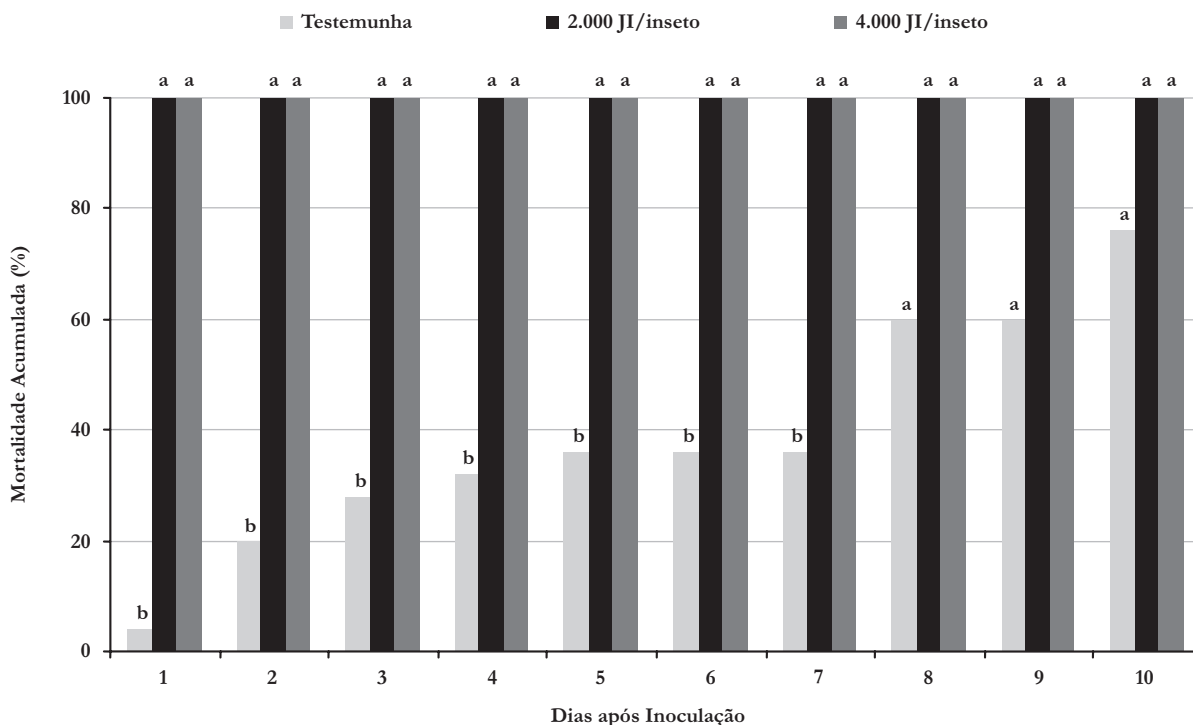
já no 2º. dia nas duas concentrações, as observações continuaram até o 10º. dia, para se saber da evolução da taxa ocorrente no tratamento testemunha (Figura 2).

Para os soldados, houve 100 % de mortalidade acumulada logo no 1º dia de avaliação, para as duas concentrações testadas, diferindo significativamente da mortalidade acumulada de 4 % obtida na testemunha; apesar disso, como explicado no parágrafo anterior, as observações prosseguiram até o 10º. dia (Figura 3). Portanto, verificou-se alta suscetibilidade dos soldados, quando submetidos às concentrações de 2.000 e 4.000 JI / inseto em placas de Petri. Foram encontrados nematóides, predominantemente juvenis, mas também adultos, no interior de todos os insetos inoculados e posteriormente dissecados (Tabela 1).

**Experimento em colônias artificiais com o inóculo aplicado sobre o alimento.** Para os operários, no 1º. dia após inoculação, determinaram-se mortalidades acumuladas de 48 e 71 % para as concentrações de 167 e 333 JI / inseto,

respectivamente, diferindo da obtida na testemunha (8 %) (Figura 4). Os resultados obtidos nas concentrações de 167 e 333 JI / inseto não diferiram entre si. Contudo, no 5º. dia após inoculação, o nematóide causou taxas maiores de mortalidade acumulada em ambas as concentrações, de 91 e 99 % para 167 e 333 JI / inseto, respectivamente. No 9º. dia, a mortalidade acumulada nas duas concentrações foi de 100 %, diferindo da obtida na testemunha (21 %).

Para os soldados (Figura 5), no 1º. dia após inoculação não houve diferenças significativas entre os níveis de mortalidade acumulada dos tratamentos com e sem nematóides. Entretanto, na 2ª. avaliação, realizada no 5º. dia da inoculação, determinaram-se níveis de mortalidade acumulada de 74 e 94 % nas concentrações de 167 e 333 JI / inseto, que não diferiram entre si, mas diferiram da obtida para a testemunha (12 %). Na 3ª. avaliação, ao 9º. dia da inoculação, obteve-se 100 % de mortalidade acumulada em ambas as concentrações, diferindo esses tratamentos da testemunha (18 %).

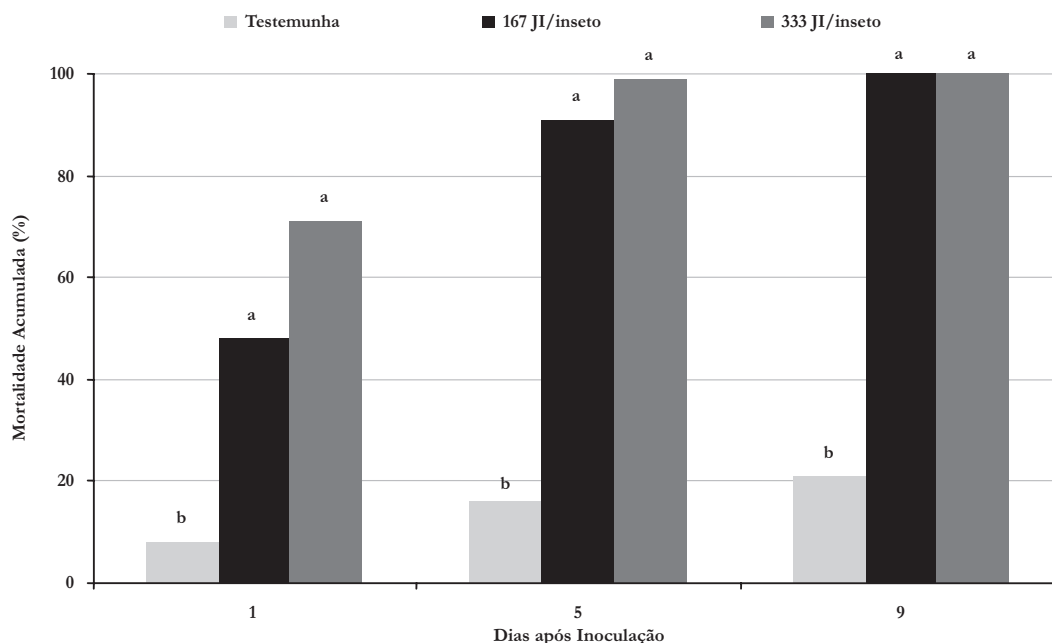


**Figura 3** – Mortalidade acumulada (%) de soldados de *Cornitermes cumulans* expostos a *Steinernema carpocapsae* nas concentrações de 2.000 e 4.000 JI / inseto, e na testemunha. Experimento em placas de Petri. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 %, comparadas no mesmo dia de avaliação.

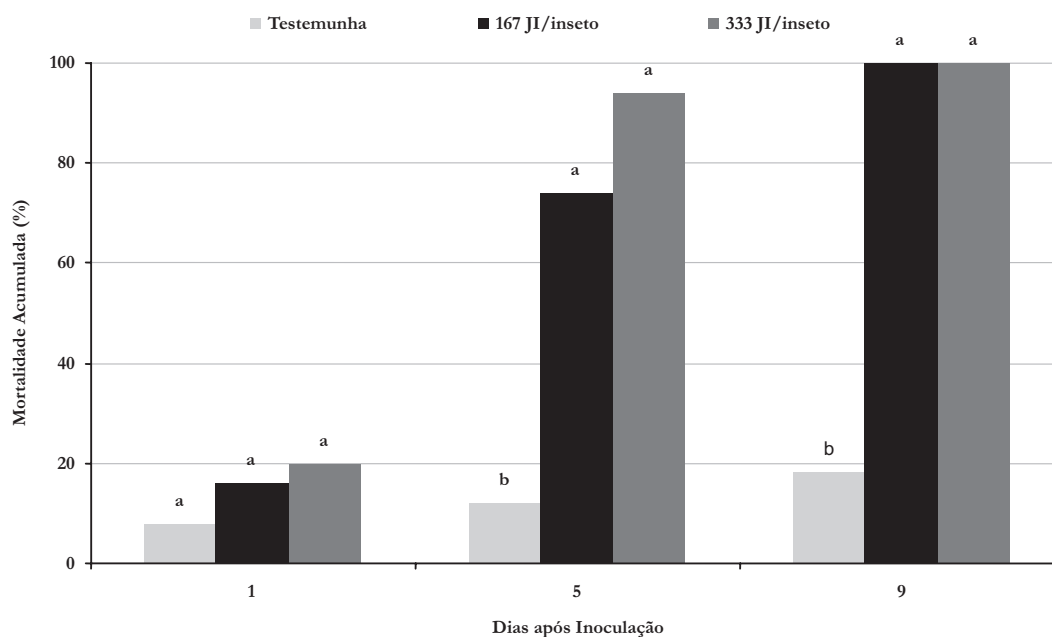


**Tabela 1** – Número médio de nematóides (JI = juvenis infectantes, A = adultos) encontrados por inseto morto após exposição de operários e soldados do cupim *Cornitermes cumulans* a JI de *Steinernema carpocapsae*. Experimento em placas de Petri.

Concentração (JI / inseto)	Operários		Soldados	
	JI	A	JI	A
2.000	76,7	1,4	107,0	0,3
4.000	118,2	1,0	219,9	0,6



**Figura 4** – Mortalidade acumulada (%) de operários de *Cornitermes cumulans* expostos a *Steinernema carpocapsae* nas concentrações de 167 e 333 JI / inseto, aplicados no alimento, e testemunha. Experimento conduzido em colônias artificiais. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%, comparadas no mesmo dia de avaliação.



**Figura 5** – Mortalidade acumulada (%) dos soldados de *Cornitermes cumulans* expostos a *Steinernema carpocapsae* nas concentrações de 166 e 333 JI / inseto, aplicados no alimento, e testemunha. Experimento conduzido em colônias artificiais. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 %, comparadas no mesmo dia de avaliação.

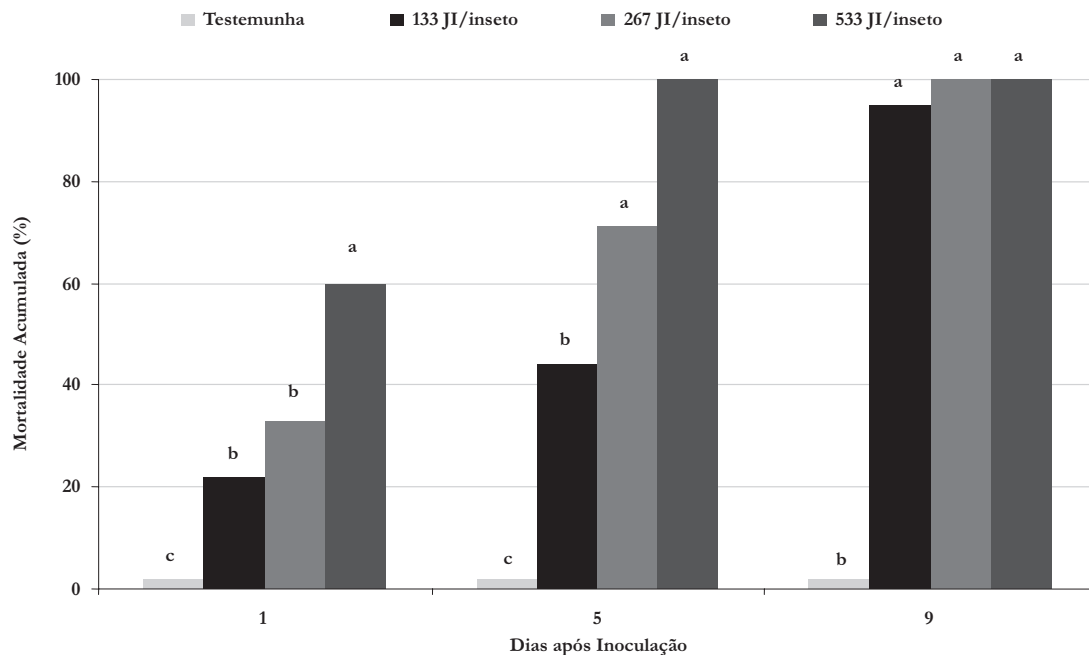
As concentrações de 167 e 333 JI / inseto de *S. carpocapsae* causaram alta mortalidade acumulada dos operários logo no 1º. dia e, no caso dos soldados, no 2º. dia após inoculação, proporcionando mortalidade acumulada de 100 % no 9º. dia para ambas as castas. A concentração de 333 JI / inseto proporcionou maior mortalidade para ambas as castas quando comparada com a de 167 JI / inseto, mas esses tratamentos não diferiram entre si. Foram encontrados nematóides no interior de todos os insetos inoculados e posteriormente dissecados, mas apenas exemplares juvenis (Tabela 2).

**Experimento em colônias artificiais com o inóculo aplicado sobre a colônia.** A concentração de 133 JI / inseto de *S. carpocapsae* proporcionou

mortalidades acumuladas de 22, 44 e 95 % no 1º., 5º. e 9º. dia, respectivamente, para os operários (Figura 6), enquanto que para os soldados foi de 22, 52 e 94 % (Figura 7). Para a concentração de 267 JI / inseto, a mortalidade foi de 33, 71 e 100 % para os operários e de 28, 82 e 100 % para os soldados. Para a concentração de 533 JI / inseto, a mortalidade acumulada de operários chegou a 60 % no 1º. dia e atingiu 100 % no 5º. dia, ao passo que para os soldados foi de 42, 92 e 100 % no 1º., 5º. e 9º. dia, respectivamente. Para os operários, na 1ª. avaliação, a mortalidade acumulada de 60 % proporcionada pela concentração de 533 JI / inseto diferiu daquelas devidas às demais concentrações e à testemunha. Na 2ª. avaliação (5º. dia), os valores de mortalidade

**Tabela 2** – Número médio de nematóides (JI = juvenis infectantes, A = adultos) encontrados por inseto morto após exposição de operários e soldados do cupim *Cornitermes cumulans* a JI de *Steinernema carpocapsae*. Experimento em colônias artificiais com inóculo aplicado sobre o alimento.

Concentração (JI / inseto)	Operários		Soldados	
	JI	A	JI	A
166	171,5	*	839,9	*
332	363,2	*	1.810,8	*



**Figura 6** – Mortalidade acumulada (%) de operários de *Cornitermes cumulans* expostos a *Steinernema carpocapsae* nas concentrações de 133, 267 e 533 JI / inseto, aplicados sobre a colônia, e testemunha. Experimento conduzido em colônias artificiais. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 %, comparadas no mesmo dia de avaliação.

acumulada das concentrações de 267 e 533 JI / inseto foram elevados (71 e 100 %, respectivamente) e não diferiram entre si. Na 3ª. avaliação (9º. dia), as três concentrações se equipararam nas taxas de mortalidade acumulada, evidenciando que a patogenicidade do nematóide nas concentrações testadas cresceu ao longo do tempo.

Para os soldados, na 1ª. avaliação, não houve diferenças significativas entre os níveis de mortalidade acumulada das concentrações estudadas; entretanto, no 9º. dia após inoculação, foi observado que as concentrações de 267 e 533 JI/inseto proporcionaram maiores mortalidades acumuladas do que a verificada para 133 JI/inseto.

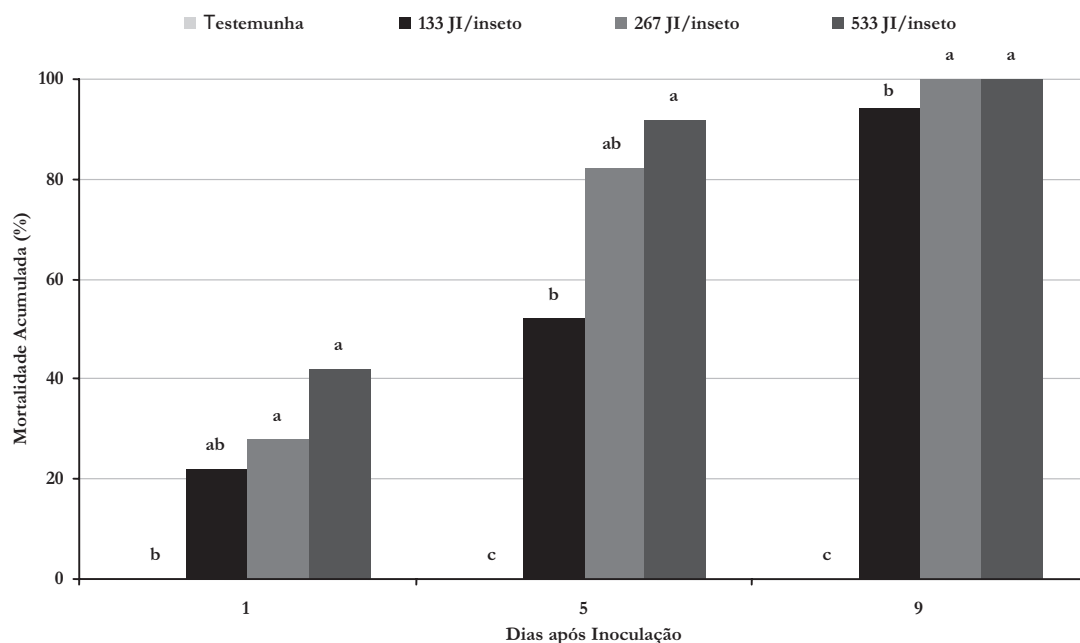
Os dados obtidos, principalmente para as

concentrações de 267 e 533 JI/inseto, evidenciaram bem a patogenicidade de *S. carpocapsae* às duas castas de *C. cumulans*. Foram encontrados nematóides no interior de todos os insetos inoculados e posteriormente dissecados, mas apenas exemplares juvenis (Tabela 3).

Nas concentrações testadas, *S. carpocapsae* mostrou-se eficiente no controle de ambas as castas de *C. cumulans*. Tais resultados corroboram os obtidos para outras espécies de cupins, como por Lamound *et al.* (1979), que observaram 100 % de mortalidade de *Nasutitermes exitiosus* (Hill, 1925) (Isoptera: Termitidae) após três dias, utilizando a concentração de 6.000 JI de *S. carpocapsae*, e por Wang *et al.* (2002), que comprovaram a eficiência de *S. carpocapsae* e de outras

**Tabela 3** – Número médio de nematóides (JI = juvenis infectantes, A = adultos) encontrados por inseto morto após exposição de operários e soldados do cupim *Cornitermes cumulans* a JI de *Steinernema carpocapsae*. Experimento em colônias artificiais com inóculo aplicado sobre a colônia.

Concentração (JI / inseto)	Operários		Soldados	
	JI	A	JI	A
133	86,5	*	705,7	*
267	260,6	*	1560,5	*
533	459,6	*	2.257,7	*



**Figura 7** – Mortalidade acumulada (%) dos soldados de *Cornitermes cumulans* expostos a *Steinernema carpocapsae* nas concentrações de 133, 267 e 533 JI / inseto, aplicados sobre a colônia, e testemunha. Experimento conduzido em colônias artificiais. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 %, comparadas no mesmo dia de avaliação.

espécies de *Steinernema* e *Heterorhabditis* frente a *Coptotermes formosanus* Shiraki, 1909 (Isoptera: Rhinotermitidae). Também confirmam os dados de Souza (2006), de alta mortalidade (88 %) de *C. cumulans* mediante inoculação com NEP, embora a espécie utilizada fosse outra, *Steinernema feltiae* (Filipjev, 1934), à concentração de 413 JI / inseto. Porém, mais que isso, vêm confirmar as observações de Rosa *et al.* (2007), que verificaram, em condição de laboratório, ter *S. carpocapsae* (isolado não identificado, procedente da Universidade da Flórida, EUA) causado maior mortalidade às castas de operários e soldados de *C. cumulans* do que os outros 11 isolados de NEPs testados.

Com a função de manutenção e limpeza das colônias, os operários movimentam-se mais que os soldados e, portanto, ficam mais expostos aos nematóides. Diferentemente, os soldados, cuja função é de proteção, permanecem mais tempo no interior da colônia, expondo-se menos aos NEPs. Devido a este fato, nas colônias artificiais usadas nos experimentos, a mortalidade dos operários foi maior quando comparada à dos soldados. Entretanto, em placas de Petri, não ocorreu esta diferença de exposição e os nematóides acabaram atacando os soldados em um menor tempo.

Apesar de terem sido utilizadas as mesmas concentrações do NEP por placa (10.000 e 20.000 JI) nos experimentos com placas de Petri e com colônias artificiais em que o inóculo foi aplicado no alimento, os números de insetos variaram, do que resultou um maior número de juvenis infectantes / cupim no experimento com placas de Petri. Assim, este fato contribuiu para a maior mortalidade de ambas as castas de *C. cumulans* em um menor tempo em placas de Petri. A mortalidade de *C. cumulans* provocada pelo nematóide *S. carpocapsae* revelou-se crescente com o tempo decorrido, atingindo níveis significativos mesmo em concentrações relativamente baixas.

Tais resultados demonstraram elevado potencial do isolado de *S. carpocapsae* utilizado visando ao controle de *C. cumulans*, porém mostra-se ainda claramente necessária a realização de mais estudos sob condição de campo para se aferir devidamente as mais adequadas formas de aplicação e concentrações do bioproduto, bem como os possíveis efeitos de fatores

abióticos, como temperatura e umidade, em tal tipo de tratamento.

## Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos à primeira autora.

## Literatura Citada

- AGUILLERA, M.M. & E.A.B. de NARDO. 2003. Situação mundial da pesquisa e uso de nematóides entomopatogênicos com ênfase na América do Sul. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, VIII, São Pedro. Resumos, p. 41.
- ALMEIDA, J.E.M. & S.B. ALVES. 1995. Seleção de armadilhas para a captura de *Heterotermes tenuis* (Hagen). Anais da Sociedade Entomológica do Brasil, 24 (3): 619-624.
- ALVES, S.B. & J.E.M. ALMEIDA. 1995. Novas alternativas para controle microbiológico de cupins. In: BERTI FILHO, E. & L.R. FONTES (ed). Alguns Aspectos Atuais da Biologia e Controle de Cupins. FEALQ, Piracicaba, p. 95-102.
- ANDALÓ, V., A. MOINO JUNIOR, L.V.C. SANTA-CECILIA & G.C. SOUZA. 2004. Seleção de isolados de fungos e nematóides entomopatogênicos para a cochonilha-da-raiz-do-cafeeiro *Dysmicoccus texensis* (Tinsley). Arquivos do Instituto Biológico, 71 (2): 181-187.
- ARRIGONI, E.B., L.C. ALMEIDA, P. KASTEN Jr. & A.A.C.M. PRECETTI. 1989. Distribuição de espécies de cupins, em cana-de-açúcar, em unidades cooperadas das regiões de Jaú e Sertãozinho. Boletim Técnico Copersucar, 48: 38-47.
- CANCELLO, E.M. 1989. Revisão de *Cornitermes* Wamann (Isoptera, Termitidae). (Tese de Doutorado) Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 151p.
- COOPLANTIO. 2003. Cupins (*Cornitermes cumulans*). <<http://www.cooplantio.com.br/scripts/cooplantio/pg/printfile.exe?f=20>> acesso em 23 de outubro de 2003.
- EMBRAPA. 1996. Cupim de montículo em pastagens. <<http://www.cnpqc.embrapa.br/publicacoes/divulga/GCD18.html>> acesso em 2 de maio de 2005.
- FERRAZ, L.C.C.B., L.G. LEITE, R.B. LOPES, A. MOINO Jr. & C. DOLINSKI 2008. Utilização de nematóides para o controle de pragas agrícolas e urbanas. In: ALVES, S.B. & R.B. LOPES (ed). Controle Microbiano de Pragas na América Latina. FEALQ, Piracicaba, p. 171-202.
- GREWAL, P. 2000. Biology & ecology: insect parasitic nematodes. <<http://www.oardc.ohio-state.edu/nematodes/biologyecology.htm>> acesso em 24 de outubro de 2003.

- JONES, W.E., J.K. GRACE & M. TAMASHIRO. 1996. Virulence of seven isolates of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* to *Coptotermes formosanus* (Isoptera: Rhinotermitidae). *Environmental Entomology*, 25: 481-487.
- LAUMOND, C., H. MAULÉON & A. KERMARREC. 1979. New data on the host spectrum and the parasitism of the entomophagous nematode, *Neoaplectana carpocapsae*. *Entomophaga*, 24 (1): 13-27.
- NEVES, P.O.J. & S.B. ALVES. 1999. Controle associado de *Cornitermes cumulans* (Kollar, 1832) (Isoptera: Termitidae) com *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* e imidacloprid. *Scientia Agricola*, 56: 313-319.
- PASSOS Jr., N.C. & S.B. ALVES. 1995. Controle de *Heterotermes tenuis*, cupim subterrâneo da cana-de-açúcar, com *Steinernema carpocapsae*. In: SIMPÓSIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS, III, Piracicaba. Resumos, p. 380.
- ROSA, J.M.O., S.R.S. WILCKEN, M.M. AGUILLERA & L.G. LEITE. 2007. Suscetibilidade de *Cornitermes cumulans* (Kollar, 1832) a isolados de nematóides entomopatogênicos. *Nematologia Brasileira*, 31 (3): 210-221.
- SOUZA, C.G. 2006. Seleção de isolados de nematóides entomopatogênicos visando o controle de *Cornitermes cumulans* (Kollar, 1832) (Isoptera: Termitidae). (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal de Lavras (MG), 41 p.
- VALÉRIO, J.R., N. MACEDO, C.F. WILCKEN & R. CONSTANTINO. 2004. Cupins em pastagens, cana-de-açúcar e plantações florestais. In: SALVADORI, J.R., C.J. ÁVILA, M.T.B. SILVA (ed). *Pragas de solo no Brasil*. Embrapa Trigo, Passo Fundo RS, p. 400-456.
- VALÉRIO, J.R., A.V. SANTOS, A.P. SOUZA, L.R. BARBOSA & M.C.M. OLIVEIRA. 2006. Níveis de infestação de cupins-de-montículo em pastagens de diferentes gramíneas forrageiras. <[http://www.biologico.sp.gov.br/biologico/v68\\_supl\\_raib/236.pdf](http://www.biologico.sp.gov.br/biologico/v68_supl_raib/236.pdf)> acesso em 01 de dezembro de 2006.
- WANG, C., J.E. POWELL & K. NGUYEN. 2002. Laboratory evaluations of four entomopathogenic nematodes for control of subterranean termites (Isoptera: Rhinotermitidae). *Environmental Entomology*, 31 (2): 381- 387.

## Influência da Nutrição Mineral na Distribuição Espacial do Nematóide de Cisto da Soja

Jadir B. Pinheiro<sup>1\*</sup>, Edson A. Pozza<sup>2</sup>, Adélia A. Alexandre Pozza<sup>3</sup>, Alécio S. Moreira<sup>2</sup>,  
Marcelo de C. Alves<sup>2</sup> & Vicente P. Campos<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Embrapa Hortaliças, C. Postal 218, 70359-970 Brasília (DF) Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras (UFLA), C. Postal 3037,  
37200-000, Lavras (MG) Brasil.

<sup>3</sup>Departamento de Ciência do Solo, UFLA.

\*Autor para correspondência: jadir@cnph.embrapa.br

Recebido para publicação em 19 / 12 / 2007. Aceito em 21 / 07 / 2008

Editado por Mário Inomoto

**Resumo** - Pinheiro, J.B., E.A. Pozza, A.A.A. Pozza, A.S. Moreira, M.C. Alves & V.P. Campos. 2008. Influência da nutrição mineral na distribuição espacial do nematóide de cisto da soja.

A distribuição espacial do nematóide de cisto da soja (NCS), *Heterodera glycines*, foi avaliada a partir de pontos amostrais, georeferenciados por GPS, na reboleira e na sua periferia durante o estágio R6 do desenvolvimento fenológico da soja, em fazenda localizada no município de Uberlândia (MG). Em cada ponto amostral foram coletadas 5 subamostras, na profundidade de 20 cm, que foram homogeneizadas para retirada de duas amostras, uma para análise nematológica e outra para análise de fertilidade. Foi utilizado o programa GS + V.7.0<sup>®</sup> para a obtenção dos semivariogramas e mapas. Para as variáveis número de juvenis de segundo estágio (J<sub>2</sub>), teor de K, teor de Ca e pH do solo houve forte dependência espacial. As variáveis n.º. de cistos viáveis, n.º. de cistos não viáveis e n.º. de ovos/cisto apresentaram moderada dependência espacial. Para J<sub>2</sub>, apenas 14 % da variação das amostras foi aleatória. Para cistos viáveis, cistos não viáveis e ovos por cisto, 27 %, 47 % e 41 %, respectivamente da variação das amostras foi ao acaso. Os teores de Ca, K e o pH no solo apresentaram, respectivamente, 0,06 %, 3,10 % e 0,14 % de aleatoriedade. Houve alta correlação visual e de Pearson entre as variáveis J<sub>2</sub>, cistos viáveis, cistos não viáveis e ovos por cisto com os teores de Ca. Teores de Ca elevados no solo foram altamente correlacionados com os valores altos de pH. Para os teores de potássio, houve correlação visual e de Pearson com a variável cisto viável no solo. Ajustou-se o modelo esférico para todas as variáveis do NCS analisadas, com alcances para J<sub>2</sub>, cistos viáveis, cistos não viáveis e ovos por cisto de 44,5; 63,1; 59,7 e 48,1 m, respectivamente. Ajustaram-se os modelos gaussianos para os teores de Ca e pH do solo, e o modelo esférico para o teor de K no solo. Os alcances foram de 26,9, 28,1 e 472,9 m para o teor de K, teor de Ca e pH, respectivamente.

**Palavras-chaves:** geoestatística, *Heterodera glycines*, cálcio, potássio, reboleira.

**Summary** - Pinheiro, J.B., E.A. Pozza, A.A.A. Pozza, A.S. Moreira, M.C. Alves & V.P. Campos. 2008. Influence of mineral nutrition on the spatial distribution of soybean cyst nematode.

The spatial distribution of soybean cyst nematode (SCN), *Heterodera glycines*, was determined by thirty sampling sites, georeferenced by GPs, in the high SCN density spot and surroundings, during the phenological soybean growth R6 located in Uberlândia city, Minas Gerais State, Brazil. In each sampling site, five subsamples were collected at 20 cm-depth, homogenized and separated into two smaller samples, one for nematological analysis and the other for fertility purposes. In the data analysis, the GS + V.7.0<sup>®</sup> software was used to generate semiovariograms and maps. For the second stage juveniles (J<sub>2</sub>), K and Ca contents and pH in the soil occurred a strong spatial dependence. For viable and non-viable cysts and eggs / cyst occurred moderated

spatial dependence. For the  $J_2$ , only 14 % of the sample variation was randomly distributed. For viable and non-viable cysts and eggs/cyst, respectively, 27 %, 47 % and 41 % of the sample variation were randomly distributed. The Ca and K contents and pH in the soil presented respectively 0.06 %, 3.1 % and 0.14 % randomization. There was a high visual and Pearson's correlation between Ca content and the variables such as  $J_2$ , viable and non-viable cysts and eggs/cyst. High Ca contents in the soil were highly correlated with high pH values. For potassium contents there was visual and Pearson's correlation with viable cyst in the soil. All SCN variables analyzed fitted better to the spherical model and sampling sites at the distance of 44.5; 63.1; 59.7 and 48.1 m, for  $J_2$ , viable and non-viable cysts and eggs/cyst, respectively. The Ca content and pH in the soil adjusted to the Gaussian model and K content in the soil to the spherical model and sampling sites at the distance of 26.9, 28.1 and 472.9 m for K and Ca contents and pH, respectively.

**Key words:** geostatistics, *Heterodera glycines*, calcium, potassium, patch.

## Introdução

O nematóide de cisto da soja (NCS), *Heterodera glycines* Ichinohe, é reconhecido como um dos principais problemas fitossanitários da cultura da soja nos principais países produtores (Embrapa, 1997). O manejo do NCS, assim como o de outras espécies de fitonematóides, é particularmente difícil, principalmente por suas dimensões microscópicas e por habitar a rizosfera. Sendo assim, o produtor desconhece quais áreas da propriedade estão infestadas ou isentas desses organismos (Santos Júnior, 2002). Além da difícil visualização destes patógenos, os solos dos cerrados apresentam baixa fertilidade natural, com desequilíbrios nutricionais geralmente causados por formulações inadequadas de adubo e, principalmente, por calagem excessiva na superfície. Embora os fertilizantes sejam largamente utilizados na agricultura, a ação dos mesmos na redução do estresse causado por *H. glycines* e por outros patógenos recebe pouca atenção. Como o estado nutricional da planta de soja influi também no número de nematóides que dela se alimentam, o monitoramento da população de nematóides e da fertilidade do solo é de fundamental importância para orientar as práticas de manejo e as técnicas de recuperação de áreas infestadas (Yorinori, 1994).

A distribuição de nematóides no campo é descrita como agregada, o que implica numa dependência espacial. Portanto, para obter informações sobre o comportamento das mesmas, são requeridos processos adequados de amostragem, determinação e análise dos dados. Os métodos estatísticos normalmente utilizados, geralmente, não são

apropriados para descrever dados correlacionados espacialmente (Clark, 1979).

A teoria da variável regionalizada, conhecida como geoestatística, é uma metodologia adequada para a análise de dados que estão correlacionados dessa forma. Por meio da geoestatística, é possível caracterizar a estrutura da dependência espacial entre os parâmetros que definem a distribuição espacial dos nematóides no solo. Uma vez detectada dependência espacial entre as observações, o processo de "krigagem" permite estimar valores em locais não amostrados. O mapeamento permite a visualização espacial dos nematóides na área de interesse, o que constitui aspecto de inquestionável importância, como ferramenta de apoio às decisões para o manejo de populações desses patógenos (Farias, 1999). Este trabalho teve como objetivo verificar utilizando como ferramenta a geoestatística, se existe relação entre a fertilidade do solo com a distribuição espacial do NCS.

## Material e Métodos

**Localização do experimento.** O ensaio foi conduzido em área cultivada com soja, ("MG/BR 46 Conquista"), semeada em 20 de novembro de 2005 na Agropecuária Marataí S/A, coordenadas geográficas: 19° 20'S; 47° 51'W e 978 m de altitude, no município de Uberlândia (MG).

**Seleção da área.** A área foi selecionada em função da presença de *H. glycines*, confirmada pela extensa reboleira de plantas com nanismo amarelo e também pela observação de fêmeas do nematóide no sistema radicular.

**Pontos amostrais e coleta.** Foram coletados 30

pontos amostrais de 20 em 20 m na reboleira e na periferia da mesma, quando as plantas de soja se encontravam no estádio R6 (pleno enchimento das vagens), totalizando uma área de 0,8 ha. Cada ponto foi georreferenciado por meio de GPS. Em cada ponto amostral foram coletadas cinco subamostras, na profundidade de 20 cm, utilizando trado. Essas foram homogeneizadas e retiraram-se duas amostras, uma para análise nematológica e outra para análise de fertilidade. A extração e a quantificação dos nematóides foram realizadas no Laboratório de Nematologia do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras. Já as análises químicas e físicas do solo aconteceram no laboratório de Ciência do Solo da mesma Universidade. Os atributos físicos do solo da área amostrada encontram-se relacionados na Tabela 1. Na metodologia de coleta adotada, não se efetuou qualquer modificação nos trabalhos normais do produtor quanto ao preparo e a adubação do solo, plantio, condução, tratos fitossanitários e colheita.

**Quantificação do NCS. Juvenis de segundo estádio.** Para as análises nematológicas, foi utilizado o método da flutuação centrífuga em solução de sacarose (Jenkins, 1964), tomando-se alíquotas de 100 cm<sup>3</sup> de solo para cada ponto amostral. A suspensão obtida foi utilizada para a determinação do número de juvenis de segundo estádio (J<sub>2</sub>) no solo, com auxílio de câmara de contagem de Peters e microscópio ótico.

**Extração de cistos e ovos por cisto.** Uma alíquota de 100 cm<sup>3</sup> de solo de cada ponto amostral foi adicionada ao recipiente contendo 1 a 2 litros de água e os torrões desmanchados, para liberar os nematóides presentes nos mesmos. Após a homogeneização, a suspensão permaneceu em repouso por 15 segundos e, na seqüência, foi vertida em peneira de 0,85 mm, sobreposta à outra de 0,18 mm. Este procedimento foi repetido três vezes,

quando, então, o resíduo da peneira de 0,18 mm foi recolhido, com auxílio de pisseta, para um béquer. Para a liberação dos ovos os cistos foram rompidos pressionando-se um béquer sobre eles na própria peneira de 0,18 mm, acoplada a uma de 0,025 mm (Dias *et al.*, 1999). Em seguida, os ovos foram recolhidos da peneira de 0,025 mm em solução de sacarose (454 g de açúcar / l de água), e submetidos a uma centrifugação a 2.000 rpm por 1 min., visando separá-los das impurezas.

**Análises de fertilidade.** As análises químicas das amostras de solo foram realizadas de acordo com as metodologias padronizadas pela Comissão de Fertilidade do Solo do Estado de Minas Gerais (CFSEMG, 1999).

**Análise geoestatística.** A dependência espacial foi analisada com o uso da geoestatística, por meio de ajustes de semivariogramas, com base na pressuposição de estacionariedade da hipótese intrínseca, de acordo com a metodologia de Burrough & McDonnell (1998). O semivariograma, em termos práticos, é a ferramenta matemática que permite estudar a dispersão natural das variáveis regionalizadas. Ele indica o grau de continuidade espacial e produz o mínimo necessário de informação sobre o fenômeno a ser estudado. É uma curva que representa o grau de continuidade de uma variável regionalizada (Valente, 1988). O ajuste dos modelos de semivariogramas foi escolhido em função do quadrado médio do erro, do erro padrão de predição e da autovalidação (“Jack Knife”). Após o ajuste dos semivariogramas, foi realizada a interpolação dos dados por “krigagem” ordinária, de forma a possibilitar a visualização de padrões de distribuição espacial das variáveis na lavoura. A “krigagem” para obtenção dos mapas é uma técnica de interpolação para estimativa de valores de uma propriedade em locais não amostrados, a partir de valores vizinhos resultantes da amostragem

**Tabela 1** - Atributos físicos do solo (textura argilosa) da área amostrada. UFLA, Lavras MG, 2006.

Atributos	dag / kg
Areia	15
Silte	24
Argila	61



realizada (Isaaks & Srivastava, 1989). Foi utilizado, para ajustar os semivariogramas e plotar os mapas de “krigagem”, o programa GS+ v.7.0<sup>®</sup>.

## Resultados e Discussão

As condições climáticas predominantes durante a condução da cultura no campo foram favoráveis ao desenvolvimento do NCS. A umidade relativa, a pluviosidade e a temperatura média registradas de novembro de 2005 até março de 2006, mês no qual foi realizada a amostragem, foram de 69,2 %, 324 mm e 24,1 °C, respectivamente. As temperaturas médias máximas e mínimas ficaram, respectivamente, em 30,3 °C e 17,6 °C.

**Juvenis de segundo estágio (J<sub>2</sub>), cistos viáveis, cistos não viáveis e ovos/cisto.** Para a variável n<sup>o</sup> de J<sub>2</sub> de *H. glycines*/100 cm<sup>3</sup> de solo, observou-se forte estrutura de dependência espacial, de acordo com a relação Co / Co+C, com apenas 14 % de aleatoriedade das amostras. As variáveis n<sup>o</sup> de cistos viáveis e cistos não viáveis / 100 cm<sup>3</sup> de solo e n<sup>o</sup> de ovos por cisto apresentaram moderada dependência espacial com 27 %, 47 % e 41 %, respectivamente, de aleatoriedade das amostras (Tabela 2). Com base nas semivariâncias experimentais obtidas ajustou-se o modelo esférico para todas as variáveis do NCS analisadas. Verificaram-se alcances para J<sub>2</sub>, cistos viáveis, cistos não viáveis e ovos por cisto de 44,5 m; 63,1 m; 59,7 m e 48,1 m, respectivamente. Portanto, a estatística clássica pode ser aplicada a partir de amostras coletadas acima destas distâncias, ou seja, o raio de dependência espacial e de domínio da geoestatística para essas variáveis

encontra-se nos valores até essas respectivas distâncias (Tabela 2 e Figuras 1B, 2B, 3B e 4B).

A moderada dependência espacial do n<sup>o</sup> de cistos, provavelmente, pode estar ligada ao fato da dispersão dos cistos ocorrer principalmente por máquinas e veículos dos próprios agricultores, ao deslocarem dentro da área ou de uma área para outra. O vento também é um fator bastante importante, redistribuindo rapidamente os cistos do nematóide nas propriedades agrícolas (Andrade & Asmus, 1997). A escolha, nesse trabalho, do modelo esférico para representar a distribuição espacial de *H. glycines*, concorda com trabalhos realizados com outras espécies de nematóides. Assim, Caswell & Chellemi (1986) estudando a distribuição espacial de *Rotylenchulus reniformis* Linford & Oliveira em plantação de abacaxi no Havaí, em área de 40 × 116 m, concluíram que a distribuição espacial do mesmo é fortemente agregada. Os autores usaram a geoestatística e observaram o ajuste do modelo esférico, apresentando alcance da dependência espacial de 10 m.

Chen & Bird (1992) fizeram estudo geoestatístico para *Pratylenchus penetrans* Cobb (Chitwood & Oteifa) na cultura da batata, numa grade de 100 × 100 m. O semivariograma obtido também apresentou modelo esférico, mas mostrou anisotropia, isto é, os semivariogramas não foram iguais para todas as direções. Entretanto, Webster & Boag (1992), contando os cistos viáveis na camada superficial do solo, não observaram anisotropia nas distribuições espaciais de duas espécies de nematóides (*Globodera rostochiensis* (Wollenweber) Behrens e *Heterodera avenae*

**Tabela 2** - Parâmetros dos semivariogramas isotrópicos experimentais obtidos para as diferentes variáveis analisadas, em área de soja infestada pelo nematóide de cisto da soja (NCS). Uberlândia MG, 2006.

Variável	Modelo	Co	Co + C	Ao	Co / Co+C
J <sub>2</sub> / 100 cm <sup>3</sup>	esférico	8400	57170	44,5	0,14
CV / 100 cm <sup>3</sup>	esférico	639	2335	63,1	0,27
cnv / 100 cm <sup>3</sup>	esférico	2970	6210	59,7	0,47
Ovos / cisto	esférico	5830	13950	48,1	0,41
Potássio	esférico	32	1001	26,9	0,031
Cálcio	gaussiano	0,001	1634	28,1	0,00061
pH	gaussiano	0,001	0,408	472,9	0,0024

J<sub>2</sub> / 100 cm<sup>3</sup> = juvenis de segundo estágio por 100 cm<sup>3</sup> de solo; CV / 100 cm<sup>3</sup> = número de cistos viáveis por 100 cm<sup>3</sup> de solo; CNV / 100 cm<sup>3</sup> = número de cistos não viáveis por 100 cm<sup>3</sup> de solo; Ovos / cisto = número de ovos por cisto; Co = efeito pepita; Co + C = patamar; Ao = alcance; K (razão) = Co / Co+C ≤ 0,25 = forte dependência espacial; 0,25 ≤ Co / Co+C ≤ 0,75 = moderada dependência espacial; 0,75 < Co / Co+C < 1,00 = fraca dependência espacial; Co / Co+C = 1,00 = variável independente espacialmente (efeito pepita puro).

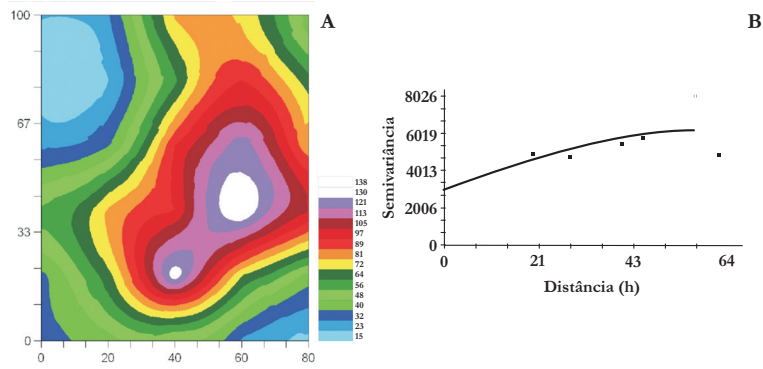


Figura 1 - Número de juvenis de segundo estágio de *Heterodera glycines* por 100 cm<sup>3</sup> de solo: **A)** mapa de “krigagem”, **B)** semivariograma.

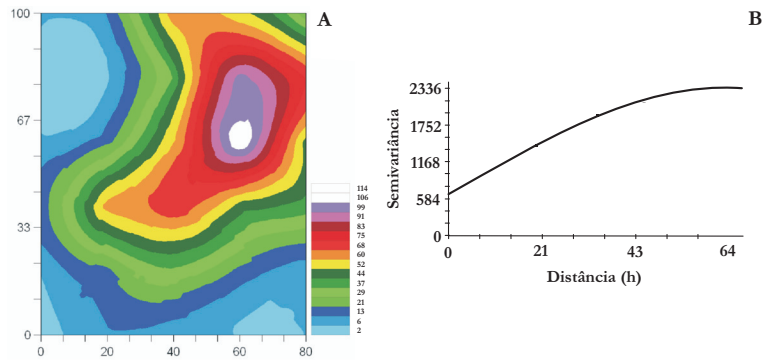


Figura 2 - Número de cistos viáveis de *Heterodera glycines* por 100 cm<sup>3</sup> de solo: **A)** mapa de “krigagem”, **B)** semivariograma.

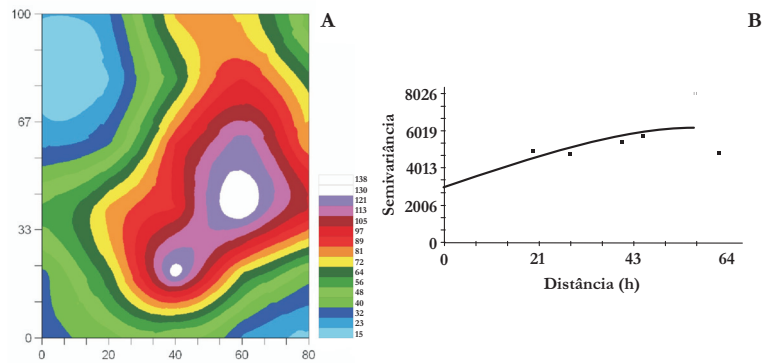


Figura 3 - Número de cistos não viáveis de *Heterodera glycines* por 100 cm<sup>3</sup> de solo: **A)** mapa de “krigagem”, **B)** semivariograma.

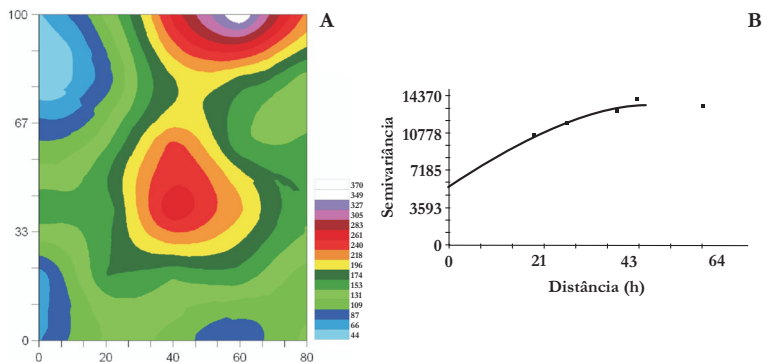


Figura 4 - Número de ovos por cisto de *Heterodera glycines*: **A)** mapa de “krigagem”, **B)** semivariograma.

Wollenweber). A distribuição espacial de ambas as espécies foi fortemente agregada. Os semivariogramas apresentaram a mesma forma esférica em todas as amostragens, com alcance efetivo de 60 m para a dependência espacial.

Wallace & Hawkins (1994) aplicaram a geoestatística para avaliar dados de solos e de nematóides de 200 amostras de solo coletadas do horizonte Ap de um campo de grama-canário, no norte de Minnessota. Observaram, também, para ambas as variáveis, modelo de semivariograma esférico, com pouca variabilidade aleatória associada com dados de solo e grande variabilidade inerente aos dados de nematóides. Com a “krigagem” dos dados de solo e dos nematóides, produziram-se mapas de contorno (isolinhas) satisfatórios.

#### **Teores de cálcio, de potássio e pH do solo.**

Para os teores de cálcio, de potássio e pH do solo, verificaram-se forte dependência espacial, indicada pelo componente (K), com 0,06 %, 3,10 % e 0,14 % de aleatoriedade, respectivamente. Ajustou-se o modelo esférico para o teor de K e o modelo gaussiano para o teor de Ca e o pH do solo, com alcances observados de 26,9 m, 28,1 m e 472,9 m, para teor de K, teor de Ca e pH, respectivamente. Os parâmetros dos semivariogramas, bem como o alcance da dependência espacial para essas variáveis, situaram-se nos valores até essas respectivas distâncias (Tabela 2 e Figuras 5B, 6B e 7B). A forte dependência espacial, observada para estas variáveis, leva a questionamentos sobre o número de observações necessárias para estimar valores das propriedades do solo de uma área, com suficiente precisão e representatividade. Por essa razão, McBratney & Webster (1983) enfatizaram a importância do conhecimento da dependência espacial das propriedades do solo para a redução do esforço de amostragem. Segundo os autores, o solo, em locais próximos, tende a ser mais similar do que entre locais distantes. Portanto, uma observação sempre carrega consigo informações da sua vizinhança. Como na amostragem ao acaso, algumas observações são tomadas juntas, ocorre duplicação da informação em alguma extensão. Assim, o conhecimento do alcance da dependência espacial de uma variável de reconhecimento pode minimizar essa duplicação, reduzindo a intensidade e o esforço da amostragem.

**Correlações.** Observou-se alta correspondência visual por meio dos mapas de krigagem entre as variáveis do NCS ( $J_2$ , cistos viáveis, cistos não viáveis e ovos por cisto) com os teores de Ca. Maiores valores dos teores de Ca ( $5,66 \text{ cmolc} / \text{dm}^3$ ) coincidiram visualmente no mapa, com valores altos de  $J_2$  ( $659 J_2 / 100 \text{ cm}^3$  de solo), cistos viáveis ( $114 / 100 \text{ cm}^3$  de solo), cistos não viáveis ( $138 / 100 \text{ cm}^3$  de solo) e ovos por cisto ( $370 \text{ ovos} / \text{cisto}$ ) (Figuras 1A, 2A, 3A, 4A e 6A). Esta correlação visual pôde ser confirmada pelas correlações significativas positivas de Pearson (Tabela 3). Sologuren & Santos (1997), estudando as características químicas de solo em reboleiras de soja com *H. glycines*, também encontraram correlações positivas entre as densidades de cistos viáveis e de  $J_2$  com valores de pH, Ca, Mg e saturação de bases. O pH apresentou correlação positiva com o total de cistos e ovos por cisto viável. De acordo com os autores, as características químicas do solo interferem na dinâmica populacional do nematóide. Entretanto, Rocha *et al.* (2006), avaliando o efeito de doses crescentes de calcário (0; 0,67; 1,35; 2,70 e 4,05 toneladas/ha) sobre a população do NCS, em casa-de-vegetação, observaram que o número de fêmeas diminuiu à medida que aumentaram-se as doses de calcário, até a dose de 3,04 t / ha. O número de cistos no solo reduziu linearmente à medida que foram aumentadas as doses de calcário. De acordo com os autores, a redução observada na população do NCS, em função de doses crescentes de calcário, pode ser explicada pelas condições em que foi realizado o experimento. A dose de 1,35 t / ha de calcário, utilizada em casa-de-vegetação, possivelmente não foi suficiente para atingir a saturação por bases de 50 % e, conseqüentemente, as outras doses não atingiram proporcionalmente, os níveis esperados. É importante observar que os experimentos com calcário podem não apresentar resultados significativos no início, pois o tempo pode não ser suficiente para promover sua reação com outros componentes do solo. Este fato não foi observado na área de realização das amostragens, pois o calcário foi aplicado dois meses antes da semeadura, que ocorreu em novembro de 2005, com as amostragens realizadas em março de 2006, tempo provavelmente suficiente para reações no solo.

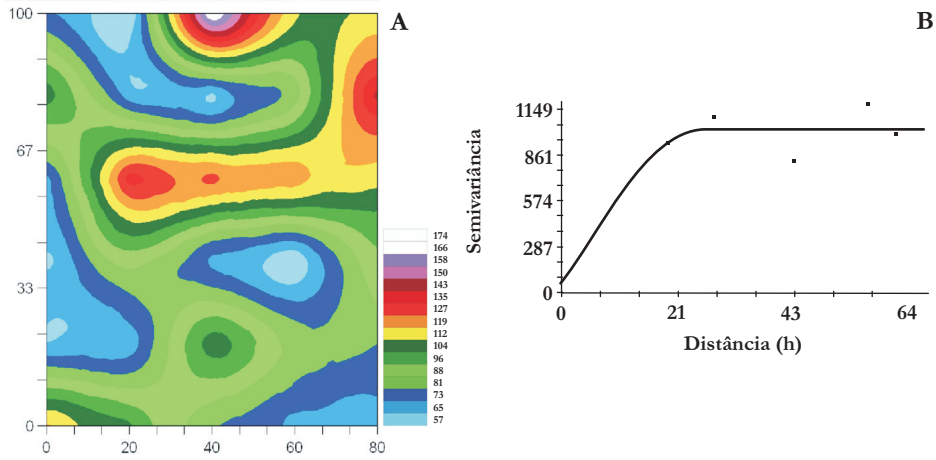


Figura 5 - Teor de potássio (cmolc / dm<sup>3</sup>) em solo infestado pelo nematóide de cisto da soja, em Uberlândia MG: **A)** mapa de “krigagem”, **B)** semivariograma.

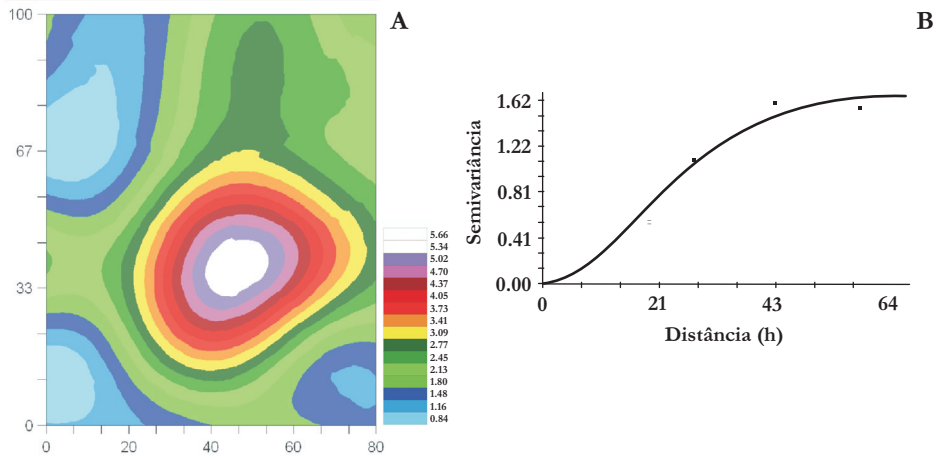


Figura 6 - Teor de cálcio (cmolc / dm<sup>3</sup>) em solo infestado pelo nematóide de cisto da soja, em Uberlândia MG: **A)** mapa de “krigagem”, **B)** semivariograma.

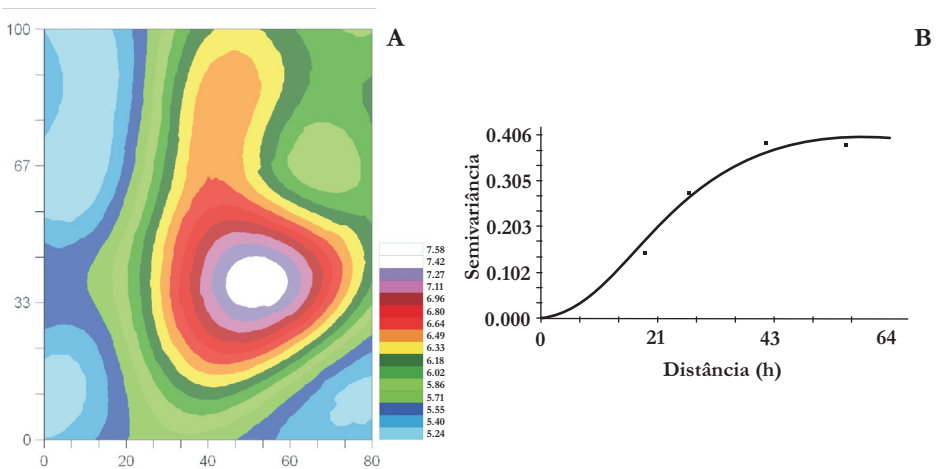


Figura 7 - pH de solo infestado pelo nematóide de cisto da soja, em Uberlândia MG: **A)** mapa de “krigagem”, **B)** semivariograma.

Os teores elevados de Ca no solo (5,66 cmolc / dm<sup>3</sup>) mostraram-se altamente correlacionados com os valores altos de pH (7,58) (Tabela 3, Figuras 6A e 7A). A adição de Ca ao solo, por meio da calagem ou outras táticas de manejo, aumentam o pH do solo (Sfredo *et al.*, 1994; Malavolta, 2006), influenciando a atividade dos nematóides, ainda que seus efeitos prováveis sejam indiretos. Assim, a calagem superestimada realizada em solos do cerrado brasileiro aumentou o pH e a saturação por bases, e provavelmente contribuiu para que a população de cistos persistisse alta mesmo após o cultivo de milho por um ou dois anos (Canevese, 1996; Garcia & Silva, 1996; Silva *et al.*, 1997). Em outros estudos, Francl (1993), Anand *et al.* (1995) e Pereira *et al.* (1997) confirmaram essa tendência. Dessa forma, os resultados encontrados na literatura confirmam os aqui obtidos. Provavelmente, o pH alto do solo condiciona dois fatores desfavoráveis à soja: a redução na população de fungos antagonistas do NCS, reduzindo a taxa de controle natural, e a imobilização de alguns micronutrientes no solo, diminuindo a tolerância das plantas. Essa redução da tolerância das plantas, possivelmente, também está ligada ao aumento da população de *H. glycines*, observada em decorrência do aumento nos teores de Ca e do pH no solo. De acordo com Anand *et al.* (1995), solos com pH de 6,5 e 7,5 são favoráveis ao crescimento da soja, o que deve resultar em maior desenvolvimento radicular e, conseqüentemente, melhores condições para o desenvolvimento de sítios de infecção, aumentando, assim, a população do NCS.

Porém, existem espécies de nematóides que sobrevivem melhor em faixas de valores de pH intermediárias. Schmitt (1989) afirma que as maiores populações de *Belonolaimus longicaudatus* Rau, geralmente associadas a menores produtividades da soja, em solo com pH 6,0, são indicações de que a relação patógeno-hospedeiro é mais favorecida nesse pH do que em solos mais ácidos ou mais alcalinos. Em campos de produção de soja no estado de Iowa, a população de *Helicotylenchus pseudorobustus* (Steiner) Golden apresentou correlação positiva com o pH do solo, enquanto para *Xiphinema americanum* Cobb esta correlação foi negativa (Norton *et al.*, 1971).

Para os teores de K no solo, somente houve correlação visual, por meio dos mapas de “krigagem”, para a variável cisto viável no solo (Figuras 2A e 5A). Regiões do mapa com maiores teores de K (174 cmolc / dm<sup>3</sup>) coincidem com as maiores populações de cistos viáveis no solo (114 cistos / 100 cm<sup>3</sup> de solo). Esta correlação significativa positiva também foi confirmada pela correlação de Pearson (Tabela 3). A falta de correlação entre a maioria das variáveis do NCS com os teores de K, provavelmente, devem-se ao fato de o excesso de Ca acentuar uma eventual carência de K no solo. Pois, existe antagonismo entre estes dois cátions (Malavolta, 2006).

### Literatura Citada

- ANAND, S. C.K., W. MATSON & S.B. SHARMA. 1995. Effect of soil temperature and pH on resistance of soybean to *Heterodera glycines*. *Journal of Nematology*, 27 (4): 478-482.

**Tabela 3** - Coeficientes de correlação de Pearson entre variáveis do nematóide do cisto da soja com os teores de potássio (K), de cálcio (Ca) e o pH do solo.

Variáveis	K	Ca	pH
J <sub>2</sub> / 100 cm <sup>3</sup>	0,30 <sup>ns</sup>	0,63**	0,60**
CV / 100 cm <sup>3</sup>	0,41*	0,55**	0,51**
CNV / 100 cm <sup>3</sup>	0,30 <sup>ns</sup>	0,67**	0,64**
Ovos / cisto	0,14 <sup>ns</sup>	0,51**	0,57**
K	-	0,00360 <sup>ns</sup>	0,14 <sup>ns</sup>
Ca	0,000360 <sup>ns</sup>	-	0,92**
pH	0,14 <sup>ns</sup>	0,92**	-

J<sub>2</sub> / 100 cm<sup>3</sup> = juvenis de segundo estágio por 100 cm<sup>3</sup> de solo; CV / 100 cm<sup>3</sup> = número de cistos viáveis por 100 cm<sup>3</sup> de solo; CNV / 100 cm<sup>3</sup> = número de cistos não viáveis por 100 cm<sup>3</sup> de solo; Ovos / cisto = número de ovos por cisto; K = teor de potássio em cmolc / dm<sup>3</sup> de solo; Ca = teor de cálcio em cmolc / dm<sup>3</sup> de solo.

\*Significativo a 5 % de probabilidade.

\*\*Significativo a 1% de probabilidade.

<sup>ns</sup>Não significativo.

- ANDRADE, P.J.M. & G.L. ASMUS. 1997. Disseminação do nematóide de cisto da soja, *Heterodera glycines*, pelo vento durante o preparo do solo. *Nematologia Brasileira*, 21 (1): 98-100.
- BURROUGH, P.A. & R.A. McDONNELL. 1998. Principles of geographical information systems: Spatial Information Systems and Geostatistics. 2. ed. Oxford University Press, Oxford UK, 333 p.
- CANEVESE, G. 1996. Controle do Nematóide de Cisto na Cultura da Soja na Região Tropical nos Cerrados do Brasil, 15 p. (Boletim Técnico n.º. 1).
- CASWEL, E.P. & D.A. CHELLENMI. 1986. A geostatistical analysis of spatial pattern of *Rotylenchus reniformis* in a Hawaiian pineapple field. *Journal of Nematology*, 18: 603.
- CHEN, J. & G.W. BIRD. 1992. Geostatistical studies of a geo-referenced *Pratylenchus penetrans* - *Solanum tuberosum* continuum. *Journal of Nematology*, 24 (4): 586 (Abstract).
- COMISSÃO DE FERTILIDADE DO SOLO DO ESTADO DE MINAS GERAIS. 1999. Recomendações para Uso de Corretivos e Fertilizantes em Minas Gerais: 5ª. Aproximação. Viçosa MG, 359 p.
- CLARK, I. 1979. Practical Geostatistics. Applied Science Publishers, Essex, 129 p.
- DIAS, W.P., J.F.V. SILVA., A.L. WAIN. & J.E. PEREIRA. 1999. Distribuição de raças de *Heterodera glycines* no Brasil. In: O Nematóide de Cisto da Soja: A Experiência Brasileira. Sociedade Brasileira de Nematologia, Jaboticabal SP, p. 95-103.
- EMBRAPA SOJA. 1997. Resultados de Pesquisa da Embrapa Soja 1996. Embrapa Soja, Londrina PR, 217 p. (Documentos 104).
- FARIAS, P.R.S. 1999. Distribuição espacial do nematóide reniforme com o uso da geoestatística, em um solo com rotação de culturas. (Tese Doutorado). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal SP, 109 p.
- FRANCL, L.J. 1993. Multivariate analysis of selected edaphic and their relationship to *Heterodera glycines* population density. *Journal of Nematology*, 25 (2): 270-276.
- GARCIA, A. & J.F.V. SILVA. 1996. Interação entre a população de cistos de *Heterodera glycines* e o pH do solo. *Fitopatologia Brasileira*, 21 (Suplemento): 420.
- ISAAKS, E.H. & R.M. SRIVASTAVA. 1989. An Introduction to Applied Geostatistics. Oxford University Press, New York, 560 p.
- JENKINS, F.G.W. 1964. A rapid centrifugal-flotation technique for extracting nematodes from soil. *Plant Disease Reporter*, 48: 692.
- MALAVOLTA, E. 2006. Manual de Nutrição Mineral de Plantas. Editora Agronômica Ceres, São Paulo, 638 p.
- McBRATNEY, A.B. & R. WEBSTER. 1983. How many observations are needed for regional estimation of soil properties? *Soil Science*, 135 (3): 177-183.
- NORTON, D.C., L.R. FREDERICK., P.E. PONCHILLIA & J.W. NYHAN. 1971. Correlations of nematodes and soil properties in soybean fields. *Journal of Nematology*, 3 (2): 154-163.
- PEREIRA, J.E., J.F.V. SILVA, A. GARCIA & A.F. LANTMANN. 1997. Análise multivariada na seleção de fatores químicos do solo e sua relação com a densidade populacional do nematóide de cisto e rendimento da cultura da soja. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, XX, Gramado. Resumos, p. 61.
- ROCHA, M.R., Y. CARVALHO, G.C. CORRÊA, G.P. CATTINI & G. PAOLINI. 2006. Efeito de doses crescentes de calcário sobre a população de *Heterodera glycines* em soja. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 36 (2): 89-94.
- SANTOS JÚNIOR, R.F. 2002. Resposta espectral de plantas de soja cv. BRS133 infectadas por *Heterodera glycines* ou *Meloidogyne javanica*. (Dissertação de Mestrado). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal SP, 53 p.
- SCHMITT, D.P. 1989. Effect of soil pH on nematicide efficacy on soybean. *Journal of Nematology*, 21 (4): 615-618.
- SFREDO, G.J., C.M. BORKERT, A.J. CATTELAN & M. HUNGRIA. 1994. Adubação e calagem para soja no Brasil. *Informativo Abrates*, 4 (1): 19-43.
- SILVA, J.F.V., A. GARCIA., J.E. PEREIRA & D. HIROMOTO. 1997. Nematóide de cisto da soja (*Heterodera glycines* Ichinohe). In: EMBRAPA SOJA. Resultados de Pesquisa da Embrapa Soja. Embrapa Soja, Londrina PR. (Documentos, 104).
- SOLOGUREN, L.J. & M.A. SANTOS. 1997. Estudo de características químicas de solo em reboleiras de soja com *Heterodera glycines*. *Fitopatologia Brasileira*, 22 (Suplemento): 329.
- VALENTE, J.M.G.P. 1988. Geomatemática – Lições de Geoestatística. 2ª. ed. Fundação Gorceix, Ouro Preto, 2.210 p.
- WALLACE, M.K. & D.M. HAWKINS. 1994. Applications of geostatistic in plant nematology. *Journal of Nematology*, 26 (4): 626-634.
- WEBSTER, R. & B. BOAG. 1992. Geostatistical analysis of cyst nematodes in soil. *Journal of Soil Science*, 43 (3): 583-595.
- YORINORI, J.T. 1994. Epidemiologia, dinâmica de população e controle. In: SEMINÁRIO NACIONAL SOBRE O NEMATÓIDE DE CISTO DA SOJA, I, Brasília. Resumos, p.65-76.

## Reação de Espécies de Plantas Daninhas a *Meloidogyne paranaensis*\*

Ana Paula do A. Mônaco<sup>1,4\*\*</sup>, Rui G. Carneiro<sup>2</sup>, Walter M. Kranz<sup>2</sup>, José Carlos Gomes<sup>2</sup>, Alexandra Scherer<sup>2</sup>, Kelly C. Nakamura<sup>2,3</sup>, Marcela P. Moritz<sup>1,4</sup>, Débora C. Santiago<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual de Londrina - UEL, Rodovia Celso Garcia Cid km 380, C. Postal 6001, 86051-990, Londrina (PR) Brasil.

<sup>2</sup>Instituto Agrônômico do Paraná – IAPAR, Rodovia Celso Garcia Cid km 375, C. Postal 481, 86047-902, Londrina (PR) Brasil.

<sup>3</sup>Bolsista da Fundação de Apoio à Pesquisa e ao Agronegócio (FUNAPE).

<sup>4</sup>Bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

\*Parte da Dissertação da primeira autora, para obtenção do título de Mestre em Agronomia (Fitopatologia) pela Universidade Estadual de Londrina.

\*\*Autora para correspondência: anapaulamonaco@yahoo.com.br

Recebido para publicação em 18 / 03 / 2008. Aceito em 11 / 08 / 2008

Editado por Claudio Marcelo Oliveira

**Resumo** - Mônaco A.P.A., R.G. Carneiro, W.M. Kranz, J.C. Gomes, A. Scherer, K.C. Nakamura, M.P. Moritz & D.C. Santiago. 2008. Reação de espécies de plantas daninhas a *Meloidogyne paranaensis*.

*Meloidogyne paranaensis* foi inicialmente detectado em lavouras de café do Brasil, e tem grande importância devido à ampla distribuição geográfica e pela severidade dos danos que causa em diferentes culturas. As plantas daninhas podem ser hospedeiras de fitonematóides, mantendo ou elevando o nível de inóculo no solo, o que torna importante conhecer as suas reações a esses parasitas. Com o objetivo de estudar a reação de trinta e oito espécies de plantas daninhas a *M. paranaensis*, cinco experimentos foram conduzidos em delineamentos inteiramente casualizados, com dez repetições, em casa de vegetação. Para tanto as plântulas foram individualmente inoculadas com suspensão de 5.000 ou 1.557 ovos e juvenis de segundo estágio (J<sub>2</sub>) e mantidas por 55, 57 e 58 dias em casa de vegetação. Após esse período, procedeu-se a extração e contagem de ovos e J<sub>2</sub> dos sistemas radiculares e cálculo dos fatores de reprodução (FR). A identificação das espécies vegetais foi realizada após a herbarização das plantas. As espécies *Rhynchetilium repens*, *Ambrosia elatior*, *Senna obtusifolia*, *Sorghum halepense*, *Ipomoea quamoclit*, *Porophyllum ruderale*, *Leonurus sibiricus*, *Solanum americanum*, *Emilia sonchifolia*, *Erechtites hieraciifolius*, *Commelina benghalensis*, *Sonchus oleraceus*, *Richardia brasiliensis* e *Sida rhombifolia* foram resistentes ao patógeno. *Amaranthus hybridus*, *Portulaca oleracea*, *Raphanus raphanistrum*, *Bidens sulbaternans*, *Amaranthus deflexus*, *Eleusine indica*, *Cleome affinis*, *Setaria geniculata*, *Ageratum conyzoides*, *Hyptis lophanta*, *Chenopodium album*, *Momordica charantia*, *Talinum paniculatum*, *Verbena litoralis*, *Lepidium pseudodidymum*, *Digitaria horizontalis*, *Ipomoea triloba*, *Amaranthus viridis*, *Polygonum persicaria*, *Chenopodium carinatum* e *Physalis angulata* foram consideradas suscetíveis. *Brachiaria decumbens*, *Cenchrus echinatus* e *Leonotis nepetaefolia* comportaram-se como imunes a *M. paranaensis*.

**Palavras-chaves:** plantas invasoras, reprodução, resistência, suscetibilidade, nematóide das galhas.

**Summary** - Mônaco A.P.A., R.G. Carneiro, W.M. Kranz, J.C. Gomes, A. Scherer, K.C. Nakamura, M.P. Moritz & D.C. Santiago. 2008. Host reaction of weed species to *Meloidogyne paranaensis*.

*Meloidogyne paranaensis* was first detected in coffee crops in Brazil, and it is of great importance mainly because of severity of its damages to different crops and its broad geographical distribution. Weeds may be hosts of nematode, maintaining high inoculum level in soil, which makes important to know their reaction to that parasite. The present paper had the objective to study the reaction of 38 species of weeds to *M. paranaensis*.

Five trials were managed in a completely randomized with 10 replicates in a greenhouse. The plants were inoculated with a suspension of 5,000 or 1,557 eggs and second stage juvenile ( $J_2$ ) and kept during 55, 57 and 58 days in greenhouses. After these periods the eggs and  $J_2$  were extracted and counted from root systems and the reproduction factor (RF) was calculated. The identification of the plant species were made after herbarization. The species *Rhynchelitrum repens*, *Ambrosia elatior*, *Senna obtusifolia*, *Sorghum halepense*, *Ipomoea quamoclit*, *Porophyllum ruderale*, *Leonurus sibiricus*, *Solanum americanum*, *Emilia sonchifolia*, *Erechtites hieraciifolius*, *Commelina benghalensis*, *Sonchus oleraceus*, *Richardia brasiliensis*, *Sida rhombifolia* were resistant to the pathogen. *Amaranthus hybridus*, *Portulaca oleracea*, *Raphanus raphanistrum*, *Bidens sulbalternans*, *Amaranthus deflexus*, *Eleusine indica*, *Cleome affinis*, *Setaria geniculata*, *Ageratum conyzoides*, *Hyptis lophanta*, *Chenopodium album*, *Momordica charantia*, *Talinum paniculatum*, *Verbena litoralis*, *Lepidium pseudodidymum*, *Digitaria horizontalis*, *Ipomoea triloba*, *Amaranthus viridis*, *Polygonum persicaria*, *Chenopodium carinatum*, *Physalis angulata* were considered susceptible. *Brachiaria decumbens*, *Cenchrus echinatus*, *Leonotis nepetaefolia* were immune to *M. paranaensis*.

**Key words:** weeds, reproduction, resistance, susceptibility, root-knot nematodes.

## Introdução

Nematóides parasitas de plantas causam consideráveis reduções na produtividade agrícola mundial, acarretando perdas anuais estimadas em 100 bilhões de dólares. Os danos causados por estes parasitas dependem da suscetibilidade da planta, das condições ambientais, da interação com outros patógenos e da densidade populacional do nematóide (Tihohod, 1993). Dentre os gêneros de fitonematóides, destacam-se os formadores de galhas (*Meloidogyne* spp.). Tais nematóides encontram-se amplamente distribuídos em lavouras de café do Brasil, causando grandes perdas para os produtores e para a economia do país (Campos *et al.*, 1990). Dentre eles, *Meloidogyne paranaensis* apresenta especial importância para o estado do Paraná (Carneiro *et al.*, 1996), devido à distribuição geográfica e a severidade dos danos causados nas diferentes culturas. Essa espécie durante algum tempo foi confundida com *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood, identificada como biótipo IAPAR, e posteriormente foi caracterizada como sendo uma nova espécie por Carneiro *et al.* (1996).

Inicialmente *M. paranaensis* foi detectada em plantas de café (*Coffea arabica* L.) (Carneiro *et al.*, 1996) e, posteriormente, sua reação também foi estudada em erva mate (*Ilex paraguariensis* L.) (Santiago *et al.*, 2000), soja (*Glycine max* L. Merrill) (Castro *et al.*, 2003), aveia preta (*Avena strigosa*) e aveia branca (*Avena sativa*) (Moritz *et al.*, 2003; Carneiro *et al.*, 2006a), milho (*Zea mays* L.) (Moritz *et al.*, 2003), diversas plantas daninhas (Roese & Oliveira, 2004), mandioca (*Manihot esculenta*

L.) (Carneiro *et al.*, 2006b), sorgo (*Sorghum bicolor*) (Moritz *et al.*, 2006), diversas gramíneas (Carneiro *et al.*, 2006c) e trigo (*Triticum aestivum*) (Scherer *et al.*, 2006). As plantas daninhas que se desenvolvem junto ao cafeeiro podem constituir-se hospedeiras de nematóides fitoparasitos, elevando o nível de inóculo no solo (Lima *et al.*, 1985). Elas são importantes na produção agrícola, devido ao alto grau de interferência imposta às culturas, pela ação conjunta da competição e da alelopatia. Ao contrário dos ataques de pragas e doenças, que ocorrem normalmente por uma ou poucas espécies, a infestação de plantas daninhas é representada por muitas espécies, emergindo em épocas diferentes, dificultando sobremaneira o controle (Karam, 2006).

Uma vez que plantas daninhas podem hospedar e aumentar as populações de nematóides no solo, torna-se importante conhecer a reação dessas plantas a *M. paranaensis*, para sabermos quais espécies devem ser eliminadas das áreas sob manejo de solo para o controle eficiente de nematóides. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a reação de 38 espécies de plantas daninhas a *Meloidogyne paranaensis*.

## Material e Métodos

Este estudo foi realizado em casa de vegetação no Instituto Agrônomo do Paraná - IAPAR, em Londrina (PR), onde foram avaliadas trinta e oito espécies de plantas daninhas quanto à reação a *M. paranaensis*. Foram conduzidos cinco experimentos em delineamentos inteiramente casualizados, com dez



repetições. Plantas de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* L.) 'Rutgers' foram utilizadas como testemunhas da viabilidade dos inóculos do nematóide. As sementes das plantas daninhas foram coletadas no campo de plantas associadas a diferentes culturas ou pastagens, nos municípios de Miraselva, Xambê, Rolândia e Londrina e colocadas para germinar em substrato de areia e solo (2:1, v:v) contidos em vasos plásticos com capacidade para 500 cm<sup>3</sup> e mantidas em casa de vegetação. O substrato foi previamente tratado com brometo de metila na dosagem de 100 ml / m<sup>3</sup>. As plântulas obtidas foram transplantadas para outros vasos de mesmo volume contendo o mesmo substrato, mantendo-se uma planta por vaso.

Para a identificação das espécies das plantas daninhas procedeu-se à herbarização segundo recomendações do Instituto de Botânica (1989). As identificações foram realizadas por taxonomista do IAPAR, e os materiais herbarizados foram registrados no herbário do Centro Universitário Filadélfia, em Londrina.

O inóculo inicial do nematóide foi obtido através da purificação de população coletada em campo, no município de Rolândia (PR), de raízes de cafeeiro de lavoura altamente infestada com *M. paranaensis*. A identificação da espécie foi realizada utilizando a técnica de eletroforese de isoenzimas descrita por Carneiro & Almeida (2001). Essa população pura foi mantida em casa de vegetação em plantas de cafeeiro. O método de Hussey & Barker (1973), modificado por Boneti & Ferraz (1981) foi utilizado para o processamento das raízes. A inoculação de cada plântula com o nematóide foi feita pela deposição de 5 ml de uma suspensão contendo 1.000 ovos + J<sub>2</sub> / ml em três orifícios de aproximadamente 2 cm de profundidade localizados ao redor das plântulas.

Para a avaliação da reprodução do nematóide, os sistemas radiculares das plantas foram coletados e separados da parte aérea, lavados e então processados pela técnica de Boneti & Ferraz (1981) para extração dos ovos. As quantificações de ovos e J<sub>2</sub> foram feitas em câmara de Peters sob microscópio óptico. Com os valores obtidos foram determinados os fatores de reprodução (FR). Foram consideradas resistentes as espécies vegetais com FR médios < 1, suscetíveis aquelas com FR ≥ 1 e imunes as que apresentaram

FR = 0 (Oostenbrink, 1966).

Para as análises estatísticas os dados foram transformados em  $\sqrt{x+1}$  visando à homogeneidade das variâncias e a normalidade dos dados. As médias foram submetidas a análise de variância e comparadas pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade. Para otimização da instalação e avaliação, o trabalho foi dividido em cinco experimentos. Com exceção do experimento 5, no qual foram inoculados 1.557 ovos e J<sub>2</sub> / planta, os demais foram conduzidos seguindo a metodologia já descrita. As avaliações foram realizadas de 55 a 58 dias após a inoculação. Durante o período de condução dos experimentos, 21 / 06 / 06 a 19 / 09 / 06, a média das temperaturas mínimas foi de 19,6 °C e das máximas de 38,2 °C, sendo a temperatura média de 28,9 °C.

## Resultados e Discussão

A reação das 38 espécies de plantas daninhas a *Meloidogyne paranaensis* são apresentadas na Tabela 1. Comportaram-se como suscetíveis ao nematóide as seguintes plantas: caruru-roxo, beldroega, nabiça, picão-preto, caruru-rasteiro, capim-pé-de-galinha, mussambê, capim-rabo-de-raposa, mentrasto, catirina, ançarinha-branca, melão-de-são-caetano, maria-gorda, erva-de-pai-caetano, menstruz, capim-colchão, corda-de-viola, caruru-verde, erva-de-bicho, anserina-rendada e joá-de-capote. Comportaram-se como resistentes capim-favorito, losna-do-campo, fedegoso, capim-massambará, esqueleto, erva-fresca, rubim, maria-pretinha, falsa-serralha, caruru-amargoso, trapoeraba, serralha, poaia-branca e guanxuma. A imunidade ao nematóide foi constatada em capim-braquiária, capim-carrapicho e cordão-de-frade. A viabilidade do inóculo de *M. paranaensis* foi confirmada pelo número de ovos produzidos em tomateiros (Tabela 1).

Estudos da reação de espécies vegetais a *M. paranaensis* são escassos, sendo que apenas Roese & Oliveira (2004) verificaram o comportamento de plantas daninhas a este nematóide. Algumas espécies avaliadas por esses autores também foram avaliadas no presente estudo, sendo que nem sempre os resultados foram iguais. No trabalho citado, *Solanum americanum* e *Sorghum halepense* comportaram-se como suscetíveis, enquanto no presente trabalho foram

**Tabela 1** - Número de ovos, fator de reprodução (FR) e reação de plantas daninhas a *Meloidogyne paranaensis*, após aproximadamente 57 dias da inoculação em casa de vegetação.

Espécie	Nome vulgar	Nº. de ovos	FR <sup>1</sup>	Reação <sup>2</sup>
<b>Experimento 1</b>				
<i>Lycopersicon esculentum</i> L.	Tomate	192.560 a	38,5	S
<i>Amaranthus hybridus</i> L.	Caruru-roxo	137.200 a	27,4	S
<i>Portulaca oleracea</i> L.	Beldroega	81.880 b	16,3	S
<i>Raphanus raphanistrum</i> L.	Nabiça	76.500 b	15,3	S
<i>Bidens sulbaltersiana</i> DC.	Picão-preto	68.260 b	13,6	S
<i>Amaranthus deflexus</i> L.	Caruru-rasteiro	54.620 b	10,9	S
<i>Eleusine indica</i> (L.) Gaertn.	Capim-pé-de-galinha	25.220 c	5,0	S
<i>Cleome affinis</i> DC.	Mussambê	20.700 cd	4,1	S
<i>Setaria geniculata</i> (Lam.) Beauv.	Capim-rabo-de-raposa	9.860 de	1,9	S
<i>Rhynchosyris repens</i> (Willd.) C.E. Hulb.	Capim-favorito	2.100 ef	0,4	R
<i>Ambrosia elatior</i> L.	Losna-do-campo	2.040 ef	0,4	R
<i>Senna obtusifolia</i> (L.) Irw. et Barn.	Fedegoso	400 f	0,0	R
<i>Sorghum halepense</i> (L.) Pers.	Capim-massambará	140 f	0,0	R
<i>Ipomoea quamoclit</i> L.	Esqueleto	80 f	0,0	R
<i>Brachiaria decumbens</i> Stapf.	Capim-braquiária	0 f	0,0	I
<i>Cenchrus echinatus</i> L.	Capim-carrapicho	0 f	0,0	I
<b>Experimento 2</b>				
<i>Lycopersicon esculentum</i> L.	Tomate	144.480 a	28,8	S
<i>Ageratum conyzoides</i> L.	Mentrasto	92.220 a	18,4	S
<i>Hyptis lophanta</i> Mart. Ex Benth.	Catirina	47.160 b	9,4	S
<i>Cbenopodium album</i> L.	Ançarinha-branca	35.780 b	7,1	S
<i>Momordica charantia</i> L.	Melão-de-são-caetano	13.840 c	2,7	S
<i>Talinum paniculatum</i> (Jacq.) Gaertn.	Maria-gorda	7.040 cd	1,4	S
<i>Porophyllum ruderale</i> (Jacq.) Cass.	Erva-fresca	380 d	0,0	R
<i>Leonurus sibiricus</i> L.	Rubim	220 d	0,0	R
<b>Experimento 3</b>				
<i>Lycopersicon esculentum</i> L.	Tomate	217.950 a	43,5	S
<i>Verbena litoralis</i> HBK.	Erva-de-pai-caetano	27.133 b	5,4	S
<i>Lepidium pseudodidymum</i> Thell.	Mentruz	15.060 bc	3,0	S
<i>Digitaria horizontalis</i> Willd.	Capim-colchão	9.140 c	1,8	S
<i>Solanum americanum</i> Mill.	Maria-pretinha	20 d	0,0	R
<b>Experimento 4</b>				
<i>Ipomoea triloba</i> L.	Corda de viola	180.600 a	36,1	S
<i>Amaranthus viridis</i> L.	Caruru-verde	89.980 b	17,9	S
<i>Lycopersicon esculentum</i> L.	Tomate	51.200 b	10,2	S
<i>Emilia sonchifolia</i> DC.	Falsa-serralha	1.780 c	0,3	R
<i>Erechtites hieracifolius</i> (L.) Raf. ex DC.	Caruru-amargoso	1.200 c	0,2	R
<i>Commelina benghalensis</i> L.	Trapoeiraba	267 c	0,0	R
<i>Sonchus oleraceus</i> L.	Serralha	100 c	0,0	R
<i>Leonotis nepetaefolia</i> (L.) R.Br.	Cordão-de-frade	0 c	0,0	I
<b>Experimento 5</b>				
<i>Lycopersicon esculentum</i> L.	Tomate	20.720 a	13,3	S
<i>Polygonum persicaria</i> L.	Erva-de-bicho	6.771 ab	4,3	S
<i>Cbenopodium carinatum</i> R.Br.	Anserina-rendada	5.220 b	3,3	S
<i>Physalis angulata</i> L.	Joá-de-capote	2.575 bc	1,6	S
<i>Richardia brasiliensis</i> Gomez	Poaia-branca	240 c	0,1	R
<i>Sida rhombifolia</i> L.	Guanxuma	60 c	0,0	R

Média de 10 repetições. Médias seguidas da mesma letra, na coluna para o mesmo experimento, não diferiram entre si pelo teste de Tukey ( $P = 0,05$ ). <sup>1</sup>FR = população final de ovos (PF) / população inicial de ovos ( $P_i = 5.000$  para experimentos 1, 2, 3 e 4; 1.557 para experimento 5). <sup>2</sup>R = Resistente (FR < 1); S = Suscetível (FR <sup>3</sup> 1); I = Imune (FR = 0).

resistentes; *Ageratum conyzoides*, foi resistente no trabalho citado e suscetível no presente, e *Digitaria horizontalis* foi caracterizada como imune por aqueles autores e, no presente trabalho como suscetível. Essas diferenças observadas nos dois trabalhos não devem ser decorrentes das metodologias empregadas, uma vez que as mesmas foram bastante semelhantes. Também as taxas de reprodução observadas nos dois trabalhos indicam que os inóculos utilizados eram viáveis. Assim, pode-se creditar as diferenças de reações observadas para mesmas espécies de plantas daninhas a duas hipóteses: variabilidade intra-específica das plantas daninhas ou variação fisiológica em *M. paranaensis* (existência de raças fisiológicas), fato já observado para outras espécies de *Meloidogyne* (Taylor & Sasser, 1978). Para as espécies *Raphanus raphanistrum*, *Sonchus oleraceus*, *Eleusine indica*, *Commelina benghalensis*, *Emilia sonchifolia*, *Richardia brasiliensis*, *Sida rhombifolia* e *Cenchrus echinatus*, os resultados observados por Roese & Oliveira (2004) foram semelhantes aos obtidos neste trabalho.

Dentre as plantas com maior potencial de incremento populacional do nematóide citam-se caruru-roxo, mentrasto, erva-de-pai-de-caetano, mentruz, corda-de-viola, erva-de-bicho, anserina-rendada e joá-de-capote. Joá-de-capote, embora não tenha diferido estatisticamente da poaia-branca e guanxuma quanto à produção de ovos, não pode ser citada como redutora da população do nematóide, pois permitiu a obtenção de FR maior que um.

As menores quantidades de ovos foram produzidas por capim-favorito, losna-do-campo, fedegoso, capim-massambará, esqueleto, capim-braquiária, capim-carrapicho, maria-gorda, erva-fresca, rubim, maria-pretinha, falsa-serralha, caruru-amargoso, trapoeraba, serralha, cordão-de-frade, poaia-branca e guanxuma, sendo essas as espécies com maiores potenciais para redução populacional do nematóide.

Portanto, das espécies de plantas daninhas avaliadas, 68 % foram suscetíveis a *Meloidogyne paranaensis*, indicando o potencial das mesmas para incrementar a população do nematóide, e a possível necessidade de sua eliminação durante manejo de solo visando controle deste nematóide.

## Agradecimentos

Os autores agradecem ao Programa Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento do Café e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelos recursos financeiros e bolsa de iniciação científica alocados no desenvolvimento deste trabalho.

## Literatura Citada

- BONETI, J.I.S. & S. FERRAZ. 1981. Modificação do método de Hussey & Barker para a extração de ovos de *M. exigua*, em raízes de cafeeiro. *Fitopatologia Brasileira*, 6 (3): 553.
- CAMPOS, V.P., P. SIVAPALAN & N.C. GNANAPRAGASAM. 1990. Nematode parasites of coffee, cocoa and tea. In: LUC, M., R.A. SIKORA & J. BRIDGE (ed). *Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture*. Wallingford UK, CAB International. p. 387-430.
- CARNEIRO, R.G., M.P. MORITZ, A.P.A. MÔNACO, A.C.C. LIMA & D.C. SANTIAGO. 2006a. Reação de cultivares de aveia às raças 1 e 3 de *Meloidogyne incognita* e a *M. paranaensis*. *Nematologia Brasileira*, 30 (3): 281-285.
- CARNEIRO, R.G., M.P. MORITZ, A.P.A. MÔNACO, A.C.C. LIMA & D.C. SANTIAGO. 2006b. Reação de cultivares de mandioca às raças 1 e 3 de *Meloidogyne incognita*, a *M. paranaensis* e a *M. javanica*. *Nematologia Brasileira*, 30 (3): 275-279.
- CARNEIRO, R.G., A.P.A. MÔNACO, A.C.C. LIMA, K.C. NAKAMURA, M.P. MORITZ, A. SHERER & D.C. SANTIAGO. 2006c. Reação de gramíneas a *Meloidogyne incognita*, a *M. paranaensis* e a *M. javanica*. *Nematologia Brasileira*, 30 (3): 287-291.
- CARNEIRO, R.M.D.G. & M.R.A. ALMEIDA. 2001. Técnica de eletroforese usada no estudo de enzimas dos nematóides de galhas para identificação de espécies. *Nematologia Brasileira*, 25 (1): 35-44.
- CARNEIRO, R.M.D.G., R.G. CARNEIRO, I.M.O. ABRANTES, M.S.N.A. SANTOS & M.R.A. ALMEIDA. 1996. *Meloidogyne paranaensis* sp. (Nemata: *Meloidogynidae*), a root-knot nematode parasitizing coffee in Brazil. *Journal of Nematology*, 28 (2): 177-189.
- CASTRO, J.M.C., V.P. CAMPOS & R.L. NAVES. 2003. Ocorrência de *Meloidogyne paranaensis* em cafeeiro na região do Alto Paranaíba em Minas Gerais. *Fitopatologia Brasileira*, 28 (5): 565.
- INSTITUTO DE BOTÂNICA. 1989. Pteridófitas e fanerógamas. In: INSTITUTO DE BOTÂNICA. *Técnicas de Coleta, Preservação e Herborização de Material Botânico*. São Paulo, Governo do Estado de SP - Secretaria do Meio Ambiente, Instituto de Botânica. p. 32-55.

- KARAM, D. Plantas daninhas na cultura do sorgo. <<http://www.portaldoagronegocio.com.br>> acesso em 20 de março de 2006.
- LIMA, R.D., V.P. CAMPOS, S.P. HUANG & C.C.A. MELLES. 1985. Reprodutividade e parasitismo de *Meloidogyne exigua* em ervas daninhas que ocorrem em cafezais. *Nematologia Brasileira*, 9: 63-72.
- MORITZ, M.P.M., G. SIMÃO & R.G. CARNEIRO. 2003. Reação de aveia a *Meloidogyne incognita* raças 1 e 3, e a *M. paranaensis*. *Nematologia Brasileira*, 27 (2): 207-210.
- MORITZ, M.P., G. SIMÃO & R.G. CARNEIRO. 2003. Reação de genótipos de milho às raças 1 e 3 de *Meloidogyne incognita* e a *M. paranaensis*. *Nematologia Brasileira*, 27 (2): 211-214.
- MORITZ, M.P., A.C.C. LIMA, K.C. NAKAMURA, A. SCHERER & R.G. CARNEIRO. 2006. Reação de cultivares de sorgo (*Sorghum bicolor*) às raças 1 e 3 de *Meloidogyne incognita* e a *M. paranaensis*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, XXVI, Campos dos Goytacazes RJ. Resumos, p. 99.
- OOSTENBRINK, M. 1966. Major characteristic of the relation between nematodes and plant. *Mededelingen Landbouwhogeschool, Wageningen (Holanda)*, 46 p.
- ROESE, A.D. & R.D.L. OLIVEIRA. 2004. Capacidade reprodutiva de *Meloidogyne paranaensis* em espécies de plantas daninhas. *Nematologia Brasileira*, 28 (2): 137-141.
- SANTIAGO, D.C., A.A. KRZYZANOWSKI & M. HOMECHIN. 2000. Behavior of *Ilex paraguariensis* St. Hilaire, 1822 to *Meloidogyne incognita* and *M. paranaensis* and their influence on development of plantlets. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 43 (2): 139-142.
- SCHERER, A., A.P.A. MÔNACO, A.C.C. LIMA, K.C. NAKAMURA, M.P. MORITZ & R.G. CARNEIRO. 2006. Reação de cultivares de trigo às raças 1 e 3 de *Meloidogyne incognita*, a *Meloidogyne paranaensis* e a *Meloidogyne javanica*. In: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, XXIX, Botucatu. Anais, p. S61.
- TAYLOR, A.L. & J.N. SASSER. 1978. Biology, identification and control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). North Carolina State University Graphics, Raleigh (NC) EUA, 111 p.
- TIHOHOD, D. 1993. *Nematologia Agrícola Aplicada*. FUNEP, Jaboticabal SP.

## Reaction of Different Banana (*Musa* spp.) Cultivars to *Meloidogyne incognita* Races 1 and 4

Renata C.V. Tenente<sup>1\*</sup>, Marcos B. Fôñseca<sup>2</sup>, Antonia I.M. Sousa-Vilardi<sup>3</sup>, Sebastião O. Silva<sup>4</sup>, Sebastião P. da Silva Neto<sup>5</sup>, Ernany G. Silva<sup>3</sup>, Osmar A. Carrijo<sup>6</sup> & Mario Araya<sup>7</sup>

<sup>1</sup>Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, C. Postal 02372, 70770-900 Brasília (DF) Brasil.

<sup>2</sup>Bolsista do CNPq.

<sup>3</sup>Bolsista da Embrapa.

<sup>4</sup>Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, Cruz Almas (BA) Brasil.

<sup>5</sup>Campo Biotecnologia, Paracatu (MG) Brasil.

<sup>6</sup>Embrapa Hortaliças, Brasília (DF) Brasil

<sup>7</sup>Costa Rican National Banana Corporation, Apdo 390-7210, Guápiles, Costa Rica.

\*Corresponding author: renatatenente@bol.com.br

Received for publication on May 25, 2007. Accepted on August 14, 2008

Edited by Claudio Marcelo Oliveira

**Summary** - Tenente, R.C.V., M.B. Fôñseca, A.I.M. Sousa-Vilardi, S.O. Silva, S.P. Silva Neto, E.G. Silva, O.A. Carrijo & M. Araya. 2008. Reaction of different banana (*Musa* spp.) cultivars to *Meloidogyne incognita* races 1 and 4.

The host response of 20 *Musa* spp. cultivars to *Meloidogyne incognita* race 1 and 4 was tested in 5-/pots under greenhouse conditions. The *Musa* cultivars examined belong to the AAA, AAAA, AAB, and AAAB genomic groups. *In vitro* propagated plantlets were potted in sterilized substrate in greenhouse and inoculated two weeks after planting with approximately 15,000 ± 1,150 eggs and juveniles of *M. incognita* race 1 or 4. For *M. incognita* race 1, the reproduction in Preciosa, Prata Anã, ST-4231 and Bucaneiro was lower than in the susceptible cultivar (Tropical), therefore they were classified as low resistant. Preciosa, Prata Anã, Maçã and PA-4219 showed lower nematode reproduction than the Tropical cultivar for *M. incognita* race 4; the reaction of Preciosa and Prata Anã was classified as moderate resistant and Maçã and PA-4219 as low resistant. The use of these moderate and low resistant cultivars to *M. incognita* race 1 and 4 to manage this species races in Brazilian conditions deserves further investigation.

**Key words:** host response, reproduction index, resistance, screening, susceptibility.

**Resumo** – Tenente, R.C.V., M.B. Fôñseca, A.I.M. Sousa-Vilardi, S.O. Silva, S.P. Silva Neto, E.G. Silva, O.A. Carrijo & M. Araya. 2008. Reação de diferentes cultivares de banana (*Musa* spp.) a *Meloidogyne incognita* raças 1 e 4.

A reação de 20 cultivares de *Musa* spp. a *Meloidogyne incognita* raças 1 e 4 foi testada em sacos plásticos de 5 litros sob condições de casa de vegetação. As cultivares testadas encontram-se dentro dos grupos genômicos AAA, AAAA, AAB e AAAB. As plântulas foram produzidas *in vitro* e transferidas para solo esterilizado em casa de vegetação e inoculadas duas semanas após o transplante com 15.000 ± 1.150 ovos e juvenis de *M. incognita* raça 1 ou 4. Para *M. incognita* raça 1, a reprodução foi menor em Preciosa, Prata Anã, ST-4231 e Bucaneiro em relação à cultivar padrão (Tropical), portanto a reação foi classificada como baixa resistência. As cultivares Preciosa, Prata Anã, Maçã e PA-4219 mostraram reprodução baixa em relação à cultivar Tropical para a raça 4 do nematóide; a reação das cultivares Preciosa e Prata Anã foi de moderada resistência e a de Maçã e PA-4219 foi de baixa resistência. A predominância de cultivares de bananeira com moderada e baixa resistência a *M. incognita* raças 1 e 4 para em condições brasileiras mostram que mais estudos precisam ser realizados.

**Palavras-chaves:** reação do hospedeiro, índice de reprodução, resistência, seleção, suscetibilidade.

## Introduction

Banana (*Musa* spp.) is an important nutrient source and cash crop in Brazil, which alternate with India the position of world main producer (Borborema, 2003). Brazilian production is about 5 millions tonnes per year, on 518,018 ha cultivated in all states (Manica, 1998). Among the biotic factors that can damage the banana plants, nematodes are estimated to cause around 8 % losses to banana yield in Brazil (Ferraz & Mendes, Costa *et al.*, 1997; Costa *et al.*, 2000; Tenente, 2003). The main nematode species parasiting banana roots are *Radopholus similis*, *Pratylenchus coffeae*, *Helicotylenchus multicinctus* and *Meloidogyne* (Gowen, 1995; Gowen *et al.*, 2005), all of them occurring in Brazil (Tenente *et al.*, 1981; 2004; Costa-Manso *et al.*, 1994; Ferreira *et al.*, 2006; Pereira *et al.*, 2006). Among the *Meloidogyne* species, banana roots can be attacked by *M. incognita*, *M. arenaria*, *M. javanica* and *M. hapla* (Gowen *et al.*, 2005; Cofcewicz, 2003; De Waele, 2000; De Waele & Davide, 1998). In Brazil, *M. incognita* and *M. javanica* have occurred more frequently, with considerable economic damage and each year the losses increase (Cares, 2003; Tenente *et al.*, 2000). In some places, the losses induced by *Meloidogyne* infection in bananas from the Cavendish subgroup can reach up to 100 % (Costa *et al.*, 1998; Zem & Alves, 1981).

Field inoculation of *Musa* AAA 'Giant Cavendish' with *M. incognita* resulted in yield losses that ranged from 26 to 57 % in the Philippines (Davide & Marasigan, 1985) and a 32 % reduction in bunch weight was observed when Grande Naine (*Musa* AAA Cavendish subgroup) plants were inoculated with 1,000 *M. incognita* in nursery stage and later cultivated in 200-l plastic drums until harvest (Moens & Araya, 2002). Reduction in banana yield due to *Meloidogyne* spp. was also observed in Malaysia (Karin, 1994), Taiwan (Chau *et al.*, 1997), Egypt (Youssef & Aboul-Eid, 1996; Aboul-Eid & Ameen, 1991), Crete (Vovlas *et al.*, 1994), Lebanon (Sikora & Schlosser, 1973), South Africa (Jones, 1979), Venezuela (Crozzoli *et al.*, 1995), Canary Islands (Pinochet *et al.*, 1998), while in Cameroon *Meloidogyne* spp. is considered a serious threat to banana production (Fogain, 1999).

The increasing need for banana growers to improve environmental and food safety makes essential to seek for alternatives to the applications of chemical

nematicidas to the soil. Different types of *Musa* including the plantain (AAB), cooking (ABB), and dessert (AAA) bananas are cultivated in different states of Brazil. There is a range of susceptibility and resistance of banana cultivars to *Meloidogyne* spp. (Cofcewicz, 2003; Costa *et al.*, 1998; Patel *et al.*, 1996). Genetic resources are a necessary starting point for plant improvement (Berthaud, 1997). Due to the size of the plant and the time it takes to develop, field evaluation of the host response to nematodes of *Musa* cultivars is expensive and time consuming (Price, 1994). Also the concomitant presence of several nematode species in most fields (Pereira *et al.*, 2006; Ferreira *et al.*, 2006; Costa Manso *et al.*, 1994; Tenente *et al.*, 1981; 2004) complicates the field screening of plant cultivars for their resistance to a single nematode species. In contrast, screening in pots speeds up the selection of cultivars with resistance. The objective of this study was to determine the resistance of *Musa* spp. cultivars to *Meloidogyne incognita* races 1 and 4 occurring in Brazil in greenhouse conditions, and to determine the cultivars with the best potential to manage this root-knot nematode in commercial banana plantations.

## Materials and Methods

The reaction of 26 *Musa* cultivars from four genotypes (Table 1) to *M. incognita* races 1 and 4 was evaluated under greenhouse conditions, comparing with the standard susceptible cultivar Tropical. Grande Naine and Williams were included as they are worldwide known susceptible export cultivars for both *R. similis* and *Meloidogyne* spp (Lordello, 1984). The tested *Musa* cultivars were propagated *in vitro* (Israeli *et al.*, 1995). After deflasking and transferring the plants to a high humidity room in the greenhouse, the roots had time to adapt to a sterilized substrate. After 2 months of hardening, plants were passed to 5-l plastic pots, filled with sterilized local substrate. Sterilization was done by steam at 100 °C for 3 hours. The substrate had a pH of 6.5 composed of 3 parts of sand + 10 parts of a coarse texture of an oxisol + 3 parts of plantimax (mineral organic substrate inert) + 2.5 kg of superphosphate + 1 kg of dolomite (32 % Ca) + 300 g of ammonium sulphate.

Plants grew in a natural day / night light rhythm,

**Table 1** - *Musa* cultivars tested against *Meloidogyne incognita* race 1 and 4.

Cultivar	Genome	Subgroup	Main use
Ambrosia	AAAA	Hybrid	Dessert
Bucaneiro	AAAA	Hybrid	Dessert
Caipira	AAA	Ibota Bota	Dessert
FHIA-18	AAAB	Synthetic hybrid	Dessert
FHIA-2	AAAA	Synthetic hybrid	Dessert
Grande Naine	AAA	Cavendish	Dessert
Maçã	AAB	Silk	Dessert
Nanicão	AAA	Cavendish	Dessert
Prata Zulu	AAB	-	Cooking
PA-4219	AAAB	Hybrid	Dessert
PA-4244	AAAB	Hybrid	Dessert
Pacovan	AAB	Pome	Dessert
Prata Anã	AAB	Pome	Dessert
Preciosa	AAAB	Hybrid	Dessert
ST-4208	AAAB	Hybrid	Dessert
ST-4231	AAAB	Hybrid	Dessert
Thap Maceo	AAB	-	Dessert
Tropical	AAAB	Hybrid	Dessert
Williams	AAA	Cavendish	Dessert
YB-4207	AAAB	Hybrid	Dessert

with temperatures ranging between 22 and 29 °C, and were watered daily by a dripping system. During visual inspections, damaged leaf parts were removed. Two weeks after transplanting, plants of uniform height within each cultivar were selected to set up the experiment. For each *M. incognita* race, there was a group of plants from each tested cultivar without inoculation. Ten replicates were used with *M. incognita* race 4 and five for race 1, with one plant per pot. FHIA-2 and Pacovan were absent in the race 1 evaluation due to lack of plants. Plants of the different cultivars were distributed following a complete randomized design.

*Meloidogyne incognita* races 1 or 4, originally isolated from banana roots from Minas Gerais state, were reproduced on tomato (*Lycopersicon esculentum* ‘Santa Cruz’) plants and used as inoculum. *M. incognita* species identification was done by isoenzymes (Carneiro *et al.*, 1996) and the races were identified based on the differential host test. Eggs and juveniles were extracted from the tomatoes roots using Hussey & Barker (1973). Fifteen days after planting 15,000 ( $\pm$  1,150) eggs and juveniles of *M. incognita* races 1 or 4 were separately pipetted in approximately equal volumes into the substrate surface around 2 cm from the plant pseudostem. During the inoculation process,

the nematode suspension was homogenized by air injection, and 3 aliquots were taken to control the effective inoculated nematode numbers. Before and after inoculation, plants were watered by the dripping system to assure sufficient soil moisture so that nematodes could reach and penetrate the roots.

At harvest, 120 days after inoculation, plant height was recorded. Roots were washed with tap water, drained and weighed. Nematodes were extracted using a modified Baermann funnel method (Hooper, 1990) as follows: after cutting the total roots into 2-3 cm length pieces they were mixed in a blender during 20 seconds at low and 20 seconds at high speed. Hereafter, the solution was put onto tissue paper and placed on a metal screen on top of a funnel filled with tap water. A flexible rubber tube was attached to this funnel, which was closed with a clamp. After 24 hours, tap water in the funnel was released over a 0.025 mm sieve. The recovered nematodes were resuspended in a known volume of tap water, homogenized by injecting air and a 4 ml aliquot was taken. Number of juveniles was counted under the stereoscopic microscope. Substrate nematode extraction was done from 250 cm<sup>3</sup> of soil by centrifugation at 1,750 rpm for one min following the method of Jenkins (1964).

Nematode number per root system was added with the number per substrate pot (final nematode population). The reproductive index was calculated dividing the final nematode population by the initial population inoculated. Data of all variables were subjected to ANOVA and mean separation by lower tail Dunnett's t-test for plant height and reproductive index and upper for root weight. The host reaction was estimated following the classification used by Taylor & Sasser (1978) and Moura & Regis (1987), where the cultivar with the highest final nematode population is the reference (100 %) and from it a percentage of reduction is calculated. Then a classification was done based on the percentage of reduction as follows: 0-25 % = highly susceptible, 26-50 = susceptible, 51-75 = low resistant, 76-95 = resistant and 100 % reduction = highly resistant or immune.

## Results

Comparing inoculated *M. incognita* race 1 plants with non-inoculated ones there was no difference in root weight ( $P > 0.0892$ ) and plant height ( $P > 0.0723$ )

among cultivars (Table 2). As expected, differences among cultivars were observed for plant height ( $P < 0.0001$ ) and root weight ( $P < 0.0001$ ) when plants were inoculated with *M. incognita* race 1. Comparing against the standard cultivar (Tropical), the plant height was lower in the cultivars PA-4244, Grande Naine, Williams, Maçã, Caipira, ST-4231, and Nanicão. In root weight, none of the tested cultivars differed from the Tropical cultivar (Table 2). The reproductive index in Preciosa, Prata Anã, ST-4231, and Bucaneiro was lower than in the Tropical cultivar (Table 3). The estimated percentage of *M. incognita* race 1 reduction with respect to the Tropical cultivar indicates that Preciosa, Prata Anã, ST-4231, Bucaneiro, Williams, ST-4208, FHIA-18, and Maçã were low resistant (Table 3).

Comparing inoculated *M. incognita* race 4 plants with non-inoculated ones a significant reduction in root weight was observed for Ambrosia, Bucaneiro, Grande Naine, Thap Maceo, PA-4219, Prata Zulu, and YB-4207 (Table 2). In plant height there was no difference between inoculated and non-inoculated plants for every cultivar. Differences among cultivars

**Table 2** - Average plant height and root weight of *Musa* spp. cultivars inoculated or no with *Meloidogyne incognita* race 1 and 4.

Cultivar	<i>M. incognita</i> race 1		<i>M. incognita</i> race 4		Control (non-inoculated)	
	Height (cm)	Root weight (g)	Height (cm)	Root weight (g)	Height (cm)	Root weight (g)
Ambrosia	68.6	180.2	61.5	157.3	68.4	210.4
Bucaneiro	56.2	190.2	52.7*	126.3	54.8	195.0
Caipira	50.4*	140.8	56.7	123.1	51	116.8
FHIA-18	55.8	151	53.9*	119.5	58.8	140.4
FHIA-2	-	-	57.7	133.4	61	156.1
Grande Naine	47.2*	128.8	50.2*	106.0	47.2	145.4
Maçã	48.2*	119.0	55.8	114.7	47.2	122.2
Nanicão	54.4*	122.0	55.6	130.5	54.8	107.4
Prata Zulu	56	130.0	61.5	144.5	62.6	168.6
PA-4219	54.8	167.2	52.2*	129.1	55	175.8
PA-4244	45.4*	168.8	44.3*	158.8	44	145.6
Pacovan	-	-	74.3	157.9	79.6	194.8
Prata Anã	62.8	187.8	58.4	159.8	60	173.4
Preciosa	61.2	148.4	55.2	106.4	36	68
ST-4208	67.2	175.8	60.2	176.7	62.8	174.6
ST-4231	54.4*	120.6	65.2	165.9	65.4	149.2
Thap Maceo	56.2	134.0	53.8*	92.0	59.8	133.0
Tropical	65	131.7	65.2	146.2	59	169.4
Williams	48*	101.0	49.2*	121.4	52.4	147.6
YB-4207	65.2	156.4	62.4	111.7	68.2	193.8

Data are means of five replicates for race 1 and ten replicates for race 4.

\*Different from the standard cultivar (Tropical) according to the Dunnett one-tailed test 5 %.



were observed for plant height ( $P < 0.0001$ ) and root weight ( $P < 0.0001$ ) when plants were inoculated with *M. incognita* race 4. When comparing against the standard control cultivar (Tropical) the plant height was lower in the cultivars PA-4244, Williams, Grande Naine, PA-4219, Bucaneiro, Thap Maceo, and FHIA-18. In root weight none of the tested cultivars differed from the Tropical cultivar (Table 2). The reproductive index in Preciosa, Prata Anã, Maçã and PA-4219 was lower than in the Tropical cultivar (Table 3). The estimated percentage of *M. incognita* race 4 reduction with respect to the Tropical cultivar indicates that Preciosa and Prata Anã were moderate resistant and Maçã PA-4219 low resistant (Table 3).

## Discussion

No differences in root weight and plant height between inoculated and non-inoculated plants were observed for race 1 and also in plant height for race 4. However, a significant reduction in root weight was found for Ambrosia, Bucaneiro, Grande Naine, Thap

Maceo, PA-4219, Prata Zulu, and YB-4207 for race 4. This suggests that race 4 is more aggressive than race 1 since the same cultivars, substrate, inoculum level and exposure time was used for both races. The variation in root weight and plant height of inoculated plants among cultivars, for both races, depended on the host suitability of the cultivars, because all of them were inoculated with the same population level.

The numbers of the *M. incognita* races 1 and 4 recovered from the reference cultivar (Tropical) and from the susceptible cultivars for *R. similis* (*Musa* AAA ‘Grande Naine’ and ‘Williams’), confirmed the effectiveness of the used inoculum sources. The susceptible reaction of Grande Naine and Williams agrees with previous research where those cultivars allowed the multiplication of *M. incognita* (Moens *et al.*, 2005; Van den Bergh *et al.*, 2000a; 2002b; Stoffelen *et al.*, 1999b) and *M. javanica* (Pinochet *et al.*, 1998). The high *M. incognita* numbers observed in Grande Naine and Williams in this experiment is similar with those reported by Moens *et al.* (2005). Tropical,

**Table 3** - Final nematode population (Pf), reproductive index (Pf/Pi) and cultivar reaction of different *Musa spp.* to *Meloidogyne incognita* races 1 and 4.

Cultivar	<i>M. incognita</i> race 1			<i>M. incognita</i> race 4		
	Pf	Pf / Pi	% reduction and cultivar reaction**	Pf	Pf / Pi	% reduction and cultivar reaction**
Ambrosia	55,460	3.70	50 S	68,766	4.58	39 S
Bucaneiro	38,421	2.56*	66 LR	76,598	5.11	32 S
Caipira	68,428	4.56	39 S	67,767	4.52	40 S
FHIA-18	51,126	3.41	54 LR	81,024	5.40	28 S
FHIA-2	-	-	-	95,042	6.34	15 HS
Grande Naine	67,913	4.53	39 S	81,967	5.46	27 S
Maçã	52,917	3.53	52 LR	39,690	2.65*	65 LR
Nanicão	57,645	3.84	48 S	60,921	4.06	46 S
Prata Zulu	63,736	4.25	43 S	109,556	7.30	3 HS
PA-4219	64,253	4.28	42 S	44,827	2.99*	60 LR
PA-4244	98,705	6.58	11 HS	79,468	5.30	29 S
Pacovan	-	-	-	58,299	3.89	48 S
Prata Ana	35,505	2.37*	68 LR	20,757	1.38*	82 MR
Preciosa	32,848	2.19*	71 LR	16,399	1.09*	85 MR
ST-4208	47,980	3.20	57 LR	74,008	4.93	34 S
ST-4231	36,621	2.44*	67 LR	65,933	4.40	41 S
Thap Maceo	59,926	3.80	49 S	96,468	6.43	14 HS
Tropical	111,417	7.43	0 HS	112,364	7.49	0 HS
Williams	47,420	3.16	57 LR	82,632	5.51	26 S
YB-4207	56,233	3.75	50 S	64,460	4.30	43 S

Data are means of five replicates for race 1 and ten replicates for race 4.

\*Different from the standard cultivar (Tropical) according to the Dunnett one-tailed test 5 %.

\*\*HS= highly susceptible, S= susceptible, LR= low resistant, MR= moderate resistant, R= resistant, and HR= highly resistant or immune.

Grande Naine and Williams were either highly susceptible to *M. incognita* race 1 or 4.

The *M. incognita* reproduction index varied among cultivars due to differences in their root suitability. Preciosa, Prata Anã, Maçã, and PA-4219 showed the lowest *M. incognita* race 1 numbers. According to the estimated percentage of *M. incognita* race 1 reduction with respect to the Tropical cultivar, Preciosa and Prata Anã are moderate resistant (76-95 % reduction) and Maçã and PA-4219 low resistant (51-75 % reduction). For *M. incognita* race 4, Preciosa, Prata Anã, ST-4231, and Bucaneiro supported the lowest numbers. However, according to the estimated percentage of *M. incognita* race 4 reduction with respect to the Tropical cultivar, those are low resistant, because they still allowed high reproduction rates. Both Preciosa and Prata Anã cultivars supported the lowest numbers of either *M. incognita* races. The host suitability of these cultivars should be confirmed in further experiments, because they were included only in one screening. The classification of cultivars reaction by the percentage of nematode reduction compared to the known susceptible cultivar suggested by Taylor & Sasser (1978) and Moura & Regis (1987) appear to be a more practical indicator than the reproductive index for the selection of less susceptible host plants.

Reports about sources of resistance to *Meloidogyne* spp. in *Musa* are scarce. A screening of a series of *Musa* genotypes in India and Brazil did not result in cultivars resistant to *M. javanica* or *M. incognita* (Patel *et al.*, 1996; Zem & Lordello, 1981). Davide & Marasigan (1985) screened 90 *Musa* cultivars on their reaction to *M. incognita*. Based on the mean gall index and nematode number per 5 g of roots, nine cultivars (Alaswe, Dakdakan, Maia Maioli, Paa Dalaga, Pastilan, Pugpugon, Sinkor and Viente Cohol) showed indications of resistance. Their gall index ranged between 1 and 2.5, and low  $J_2$  numbers were recovered from the roots. Stoffelen *et al.* (1999a), using *Meloidogyne* spp. as inoculum, did not observe significant differences in egg laying females per root system and per 5 g of roots among six Malayan *Eumusa* cultivars, and seven Vietnamese *Eumusa* cultivars were not less susceptible than Grande Naine. Van den Bergh *et al.* (2000, 2002a) observed only one out of 19 screened Vietnamese cultivars, Ngu Thoc, with indication of

possible resistance to *Meloidogyne* spp. In a comparative study including eight Vietnamese *Musa* accessions, FHIA-1, FHIA-2 and Yangambi km5, the same authors found FHIA-1 to be less susceptible for a mixture of *Meloidogyne* spp. (Van den Bergh *et al.*, 2002b) under field conditions. However, Stoffelen (1999b) did not report resistance to *Meloidogyne* spp. among the seven tested Fe'I (*Australimusa*) cultivars, originating from Papua New Guinea. Also in Indonesia, none of the 30 banana cultivars were resistant to *Meloidogyne* spp. (Hadisoeganda, 1994). Pinochet *et al.* (1998) did not find any material resistant to *M. incognita* or *M. javanica* among the 15 tested *Musa* cultivars on the Canary Islands. Moens *et al.* (2005) found in Costa Rica differences in susceptibility comparing 20 cultivars that belong to the AA, AAA, AAAA, AB, AAB, ABB, AAAB, AABB and balbisiana genomic groups, but no resistance was reported.

In commercial banana plantations usually multi-species nematode communities occur. Hence, Preciosa and Prata Anã must be evaluated to the other nematodes frequently present in Brazilian banana plantations. Additionally, in a breeding program looking for nematode resistance all the nematode genera present in Brazilian soil conditions that cause damage to the crop should be considered. In this respect, no cultivar with resistance to wide range of nematodes has been reported in previous literature. Moens *et al.* (2005) found that Yangambi km5 and Tjau Lagada showed some resistance to *P. coffeae*, and *R. similis* which are frequently present in Brazil. Yangambi km5 (Fouré *et al.*, 2002) and *Musa acuminata* ssp. *microcarpa* 'Tjau Lagada' show some resistant to Black Sigatoka (Tenkouano *et al.*, 2003) which is the main production constraint in many banana producing countries and reported in Brazil (Cordeiro *et al.*, 1998; Pereira *et al.*, 1998). Thus, it is interesting to evaluate the reaction of these two *Musa* cultivars to the *M. incognita* races commonly present in banana plantations in Brazil and also to *P. coffeae* and *R. similis* nematodes.

The identification and use of nematode-resistance genes from *Musa* cultivars to genetically transform other *Musa* cultivars with high production and consumer potential is a promising way to prevent in the progeny deterioration of the commercial performance of the targeted *Musa* cultivars. The use

of *Musa* resistance genes to transform *Musa* cultivars might change the negative opinion of the public in general towards this technology.

### Literature Cited

- ABOUL-EID, H.Z.; H.H. AMEEN. 1991. Distribution and population densities of root-knot, reniform and spiral nematodes on different banana cultivars in Egypt. Bulletin Faculty of Agriculture, Cairo, University 42 (S): 919-928.
- BERTHAUD, J. 1997. Strategies for conservation of genetic resources in relation with their utilization. Euphytica, 96 (1): 1-12.
- BORBOREMA, M.D. 2003. Comercialização e mercado bananeiro atual e perspectivas. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE BANANICULTURA E WORKSHOP DO GENOMA *MUSA*, V, Paracatu MG. Anais, p. 48-56.
- BRENTU, C.F., P.R. SPEIJER, K.R. GREEN, B.M.S. HEMENG, D. DE WAELE & D.L. COYNE. 2004. Micro-plot evaluation of the yield reduction potential of *Pratylenchus coffeae*, *Helicotylenchus multicinctus* and *Meloidogyne javanica* on plantain cv. Apantu-pa (*Musa* spp., AAB-group) in Ghana. Nematology, 6(3): 455-462.
- CARES, J.E. 2003. Pragas e nematóides da bananeira: manejo integrado. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE BANANICULTURA - I WORKSHOP DO GENOMA *Musa*, V, Paracatu MG. Anais, p. 112-113.
- CARNEIRO, R.M.D.G., A.R.A. ALMEIDA & R.G. CARNEIRO. 1996. Enzyme phenotypes of Brazilian isolates of *Meloidogyne* spp. Fundamental Applied Nematology, 19 (4): 555-560.
- CHAU, N.N., V.T. THANH, D. DE WAELE & E. GERAERT. 1997. Plant-parasitic nematodes associated with banana in Vietnam. International Journal of Nematology 7 (1): 122-126.
- COFCEWICZ, E.T. 2003. Diversidade de populações de *Meloidogyne* spp. em bananeiras no Brasil e nas Antilhas e sua patogenicidade a cultivares de *Musa* spp. (Tese de Doutorado). Universidade de Pelotas, Pelotas, 97 p.
- CORDEIRO, Z.J.M.; A. PIRES de MATOS & S. DE OLIVEIRA; SILVA. 1998. La Sigatoka negra en Brasil. Infomusa, 7 (1): 30-31.
- COSTA, D.C., S.O. SILVA & M.C. ROCHA. 2000. Reprodução de *Radopholus similis* e *Meloidogyne javanica* em diplóides de bananeira (AA). Fitopatologia Brasileira, 25 (S): 335.
- COSTA, D.C., O.S. SILVA, F.R. ALVES & A.C. SANTOS. 1997. Avaliação de danos e perdas à bananeira cv. Nanica causadas por *Meloidogyne incognita* na região de Petrolândia- PE. Nematologia Brasileira, 21 (1): 21.
- COSTA, D.C., S.O. SILVA & F.R. ALVES. 1998. Reação de genótipos de bananeiras (*Musa* spp.) a *Radopholus similis* e *Meloidogyne incognita*. Nematologia Brasileira, 22 (2): 49-57.
- COSTA-MANSO, E.S.B.G., R.C.V. TENENTE, L.C.B. FERRAZ, R.S. OLIVEIRA & R. MESQUITA. 1994. Catálogo de Nematóides Fitoparasitos Encontrados Associados a Diferentes Tipos de Plantas no Brasil. Editora Embrapa, Brasília DF, 488 p.
- CROZZOLI, R.; G. MARTÍNEZ & D. RIVAS. 1995. Manejo y fluctuaciones poblacionales de *Helicotylenchus multicinctus* y *Meloidogyne incognita* en banano en Venezuela. Nematologica, 25 (1): 61-66.
- DAVIDE, R.G. & L.Q. MARASIGAN. 1985. Yield loss assessment and evaluation of resistance of banana cultivars to the nematodes *Radopholus similis* Thorne and *Meloidogyne incognita* Chitwood. The Philippine Agriculturist, 68 (2): 335-349.
- DE WAELE, D. 2000. Root-knot nematodes. In JONES, D.R. (ed). Diseases of Banana, Abaca and Enset. CABI Publishing, Wallingford, p. 307-314.
- DE WAELE, D. & R.G. DAVIDE. 1998. The root-knot nematodes of bananas. *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1949, *Meloidogyne javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949. *Musa* Pest Factsheet n°. 2. INIBAP, Montpellier (France), 4 p.
- FERRAZ, S. & M.L. MENDES. 1992. O nematóide das galhas. Informe Agropecuário, 16 (172): 37-42.
- FERREIRA, R.R.C., A. APARECIDA, M.E. HYIDU, F.R. PEREIRA, H.B. RIBEIRO, A.A.A. POZZA & S. FERRAZ. 2006. Influencia de fatores edáficos sobre a população de *Meloidogyne javanica*, *Helicotylenchus multicinctus* e *Radopholus similis* em bananeira. In: REUNIAO INTERNATIONAL ACORBAT, XVII, Joinville SC. Anais, p. 813-817.
- FOGAIN, R. 1999. Root knot nematodes: a serious threat to banana production in Cameroon. MusAfrica, 4 (3): 3.
- FOURÉ, E.O., X.O. MOURICHON & D.R. JONES, 2002. Host reaction. In: JONES, D.R. (ed). Diseases of Banana, Abacá and Enset. CAB International, Wallingford UK, p. 62-72.
- GOWEN, S.R., P. QUÉNÉHERVÉ, R. FOGAIN. 2005. Nematodes parasites of bananas and plantains. In: LUC, M., R.A. SIKORA & J. BRIDGE (ed). Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture. CABI publishing, Wallingford, p. 611-643.
- GOWEN, S.R. 1995. Pests. In: GOWEN S. (ed). Bananas and Plantains. Chapman & Hall, London, p. 382-402.
- HADISOEGANDA, W.W. 1994. Status of nematode problems affecting banana in Indonesia. In: VALMAYOR, R.V., R.G. DAVIDE, J.M. STANTON, N.L. TREVERROW & V.N. ROA (ed). Banana Nematodes and Weevil Borers in Asia and the Pacific. CONFERENCE - WORKSHOP ON NEMATODES AND WEEVIL BORERS AFFECTING BANANAS IN ASIA AND THE PACIFIC. Serdang, Selangor, Malaysia, 18-22 April 1994. INIBAP/ASPNET, Los Baños, Philippines. Proceedings, p. 63-73.
- HOOPER, D.J. 1990. Extraction and processing of plant and soil nematodes. In: LUC, M.; R.A. SIKORA & J.

- BRIDGE (ed). Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture. CAB International, Wallingford UK, p. 45-68.
- HUSSEY, R.S.; BARKER, K.R. 1973. A comparison of methods of collecting inocula for *Meloidogyne* spp., including a new technique. Plant Disease Reporter, 57: 1.025-1.028.
- ISRAELÍ, Y, E. LAHAV & E. REUVENI. 1995. In vitro culture of bananas. In: GOWEN, S.R. (ed). Bananas and Plantains. Chapman & Hall, London UK, p. 147-178.
- JENKINS, W.R. 1964. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. Plant Disease Report, 48 (2): 692.
- JONATHAN, E.I. 1994. Studies on the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* on banana cv. Poovan. (Tese de Doutorado). Tamil Nadu Agricultural University, Coimbatore, Índia, 185 p.
- JONES, R.K. 1979. Nematodes associated with bananas in South Africa. Phytophylactica, 11 (1): 79-81.
- KARIN, S.A. 1994. Status of nematode problems affecting banana in Malaysia. In: VALMAYOR, V.R., R.G. DAVIDE, J.M. STANTON, N.L. TREVERROW & V.N. RAO (ed). CONFERENCE - WORKSHOP ON NEMATODES AND WEEVIL BORERS AFFECTING BANANAS IN ASIA AND THE PACIFIC. Serdang, Selangor, Malaysia, 18-22 April 1994. INIBAP/ASPNET, Los Baños, Philippines. Proceedings, p. 74-78.
- LORDELLO, L.G.E. 1984. Nematóides das Plantas Cultivadas. Editora Nobel, São Paulo, 314 p.
- MANICA, I. 1998. Bananas: do Plantio ao Amadurecimento. Editora Cinco Continentes, Porto Alegre, 99 p.
- MOENS, T., M. ARAYA, R. SWENNEN & D. DE WAELE. 2005. Screening of *Musa* cultivars for resistance to *Helicotylenchus multicinctus*, *Meloidogyne incognita*, *Pratylenchus coffeae* and *Radopholus similis*. Australasian Plant Pathology, 34 (1): 299-309.
- MOENS, T. & M. ARAYA. 2002. Efecto de *Radopholus similis*, *Meloidogyne incognita*, *Pratylenchus coffeae* y *Helicotylenchus multicinctus* en la producción de *Musa* AAA cv. Grande Naine. Corbana, 28 (55): 43-56.
- MOURA, R.M. & E.M.O. REGIS. 1987. Reação de cultivares de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) em relação ao parasitismo de *Meloidogyne javanica* e *M. incognita* (Nematoda: Heteroderidae). Nematologia Brasileira, 11 (1): 215-225.
- PATEL, B.A., R.V. BYAS D.J. PATEL & R.S. PATEL. 1996. Susceptibility of banana cultivars to root-knot nematodes. InfoMusa, 5 (1): 26-27.
- PEREIRA, A.M., A. MACEDA, C.R. DIAS-ARIEIRA & A. PELISSARI. 2006. Nematóides fitoparasitos associados a cultura da bananeira (*Musa* spp.) no estado do Paraná. In: SOPRANO, E., F.A. TCACENCO, L.A. LICHTENBERG & M.C. SILVA. (ed). REUNIÃO INTERNACIONAL ACORBAT, XVII, Joinville SC, p. 818-825.
- PEREIRA, J.C.R., L. GASPAROTTO, A.F.S. COELHO & S.M. VERAS. 1998. Doenças da Bananeira no Estado do Amazonas. Embrapa – CPAA, 5 p. (Circular Técnica 10).
- PINOCHET, J., M.C. JAIZME, C. FERNÁNDEZ, M. JAUMOT, & D. DE WAELE. 1998. Screening bananas for root-knot (*Meloidogyne* spp.) and lesion nematode (*Pratylenchus goodeyi*) resistance for the Canary Islands. Fundamental and Applied Nematology, 21 (1): 17-23.
- PRICE, N.S. 1994. Field trial evaluation of nematode susceptibility within *Musa*. Fundamental and Applied Nematology, 17 (2): 391-396.
- SIKORA, R.A. & E. SCHLOSSER. 1973. Nematodes and fungi associated with root systems of bananas in a state of decline in Lebanon. Plant Disease Reporter, 57 (3): 615-618.
- STOFFELEN, R., V.T.T. TAM, R.L. SWENNEN & D. DE WAELE. 1999a. Host plant response of banana (*Musa* spp.) cultivars from Southeast Asia to nematodes. International Journal of Nematology, 9 (1): 130-136.
- STOFFELEN, R., R. VERLINDEN, N. THI XUYEN, R. SWENNEN & D. DE WAELE. 1999b. Screening of Papua New Guinea bananas to root-lesion and root-knot nematodes. InfoMusa, 8 (1): 12-15.
- TAYLOR, A.L. & J.N. SASSER. 1978. Biology, Identification and Control of Root-Knot Nematodes (*Meloidogyne* species). International *Meloidogyne* Project, North Carolina State University Graphics, Raleigh (NC) EUA, 111 p.
- TENENTE, R.C.V. 2003. Interação entre nematóides e *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. ANAIS. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE BANANICULTURA E WORKSHOP DO GENOMA *Musa*, V, Paracatu MG. p. 122-126.
- TENENTE, R.C.V., E.M. BETTIOL & E.R. CARVALHO. 1981. Bibliografia Brasileira de Nematóides. Brasília. Embrapa, Brasília, 379 p.
- TENENTE, R.C.V., L.V. BOAS, V. GONZAGA & G.F. SANTANA. 2000. Resistência de clones de bananeira ao nematóide *Meloidogyne incognita*. Nematologia Brasileira, 24 (1): 121-122.
- TENENTE, R.C.V., V. GONZAGA, L.A.M.P. de MELO & M.S.M. TENENTE. 2004. Bibliografia Brasileira de Nematóides. vol. II. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília DF, 400 p.
- TENKOUANO, A., D. VUYLSTEKE, J. OKORO, D. MAKUMBI, R. SWENNEN & R. ORTIZ. 2003. Diploid banana hybrids TMB × 5105-1 and TMB × 9128-3 with good combining ability, resistance to black sigatoka and nematodes. HortScience, 38 (2): 468-472.
- VAN den BERGH, I., D. DE WAELE, H.H. NHI, D.T.M. MINGH, N.T. TUYET & D.T. THANH. 2000. Screening of Vietnamese *Musa* germplasm for resistance and tolerance to root-knot and root-lesion nematodes in the greenhouse. InfoMusa, 9 (10): 8-11.
- VAN den BERGH, I., NGUYET, D.T.M., TUYET, N.T., NHI, H.H., DE WAELE, D. 2002a. Screening of

- Vietnamese *Musa* germplasm for resistance to root-knot and lesion nematodes in the greenhouse. Australasian Plant Pathology 31: 363-371.
- VAN den BERGH, I., D.T.M. NGUYET, N.T. TUYET, N.T., H.H. NHI & D. DE WAELE, 2002b. Responses of Vietnamese *Musa* genotypes to *Meloidogyne* spp. under field conditions. Nematology, 4 (4): 917-923.
- VOVLAS, N., A. AVGELIS, D. GOUMAS & S. FRISULO. 1994. A survey of banana diseases in sucker propagated plantation in Crete. Nematologia Mediterranea, 22 (1): 101-107.
- VYAS, R.V., N.B. PATEL & D.J. PATEL. 2001. Management of root-knot nematodes in banana. Indian Journal of Nematology, 3 (1): 86-87.
- YOUSSEF, M.M.A. & H.Z. ABOUL-EID. 1996. Fluctuation of root-knot and spiral nematode populations on banana in relation to soil temperature. Afro-Asian Journal of Nematology, 6 (1): 67-69.
- ZEM, A.C. & E.J. ALVES. 1981. Observações sobre perdas provocadas por nematóides em bananeira (*Musa acuminata* Simm. & Sherp.) cv. Nanicão. Embrapa CNPMP, Cruz das Almas BA, 5 p. (Boletim de Pesquisa 6)
- ZEM, A.C. & L.G.E. LORDELLO. 1981. Behaviour of banana cultivars exposed to infestation by *M. incognita* and *M. javanica*. Anais de Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 38 (3): 875-883.

## Migração de *Meloidogyne incognita* para as Raízes de Soja *In Vitro*\*

Fernando S. Rocha<sup>1,2\*\*</sup>, Vicente P. Campos<sup>2</sup>, Esdras H. Silva<sup>2</sup>, Silvânia P.S. Rocha<sup>3</sup>,  
 Maria C. Carli<sup>2</sup> & Lilian S. A. S. Costa<sup>2</sup>

\*Parte da Tese de Doutorado do primeiro autor, apresentada à Universidade Federal de Lavras (MG) Brasil, para a obtenção do título de Doutor.

<sup>1</sup>Bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

<sup>2</sup>Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, 37200-000 Lavras (MG) Brasil.

<sup>3</sup>Centro Universitário de Lavras (Unilavras), 37200-000 Lavras (MG) Brasil.

\*\*Autor para correspondência: rochafsplant@yahoo.com.br

Recebido para publicação em 04 / 10 / 2007. Aceito em 29 / 05 / 2008

Editado por Mário Inomoto

**Resumo** – Rocha, F.S., V.P. Campos, E.H. Silva, S.P.S. Rocha, M.C. Carli & L.S.A.S. Costa. 2008. Migração de *Meloidogyne incognita* para as raízes de soja *in vitro*.

Estudaram-se os efeitos da época do plantio da soja e do armazenamento de juvenis do segundo estágio (J<sub>2</sub>) de *M. incognita* na migração e na perda da reserva energética corporal dos J<sub>2</sub> colocados a 0, 2, 4 e 6 cm de profundidade da raiz. Os J<sub>2</sub> foram colocados em tubos de vidro contendo areia quartizífera e separados da raiz por tela de 0,36 mm de diâmetro de poro antes do plantio da soja, os quais foram armazenados por 5, 10, 15 e 20 dias a 27 ± 2°C. Noutro ensaio, os J<sub>2</sub> foram colocados nos tubos nas diferentes distâncias e armazenados na areia por 5, 10, 15 e 20 dias; a soja foi plantada após o período de estocagem dos J<sub>2</sub> e a avaliação feita cinco dias após cada período de estocagem. A interação entre as distâncias do inóculo e os períodos de avaliação, e entre as distâncias e o teor de lipídio dos J<sub>2</sub> não foram significativas. No entanto, o teor de lipídios neutros dos J<sub>2</sub> não infectivos decresceu com o período de avaliação, reduzindo a penetração de *M. incognita*. A partir de dez dias após a inoculação até o final do ensaio, o número de *M. incognita* na raiz foi semelhante quando os J<sub>2</sub> foram colocados a 4 e 6 cm de profundidade, porém 40 a 50 % inferiores àqueles colocados em contato (0 cm) ou a 2 cm da raiz. Quando os J<sub>2</sub> foram armazenados antes do plantio da soja ocorreu redução drástica na penetração já aos cinco dias de armazenamento, chegando a ser nula a partir de 10 dias até o final do ensaio. Aos cinco dias de estocagem, o teor de lipídio corporal dos J<sub>2</sub> estava em 23 %, os quais não tiveram mais capacidade infectiva. Portanto, para avaliar a migração de J<sub>2</sub> de *Meloidogyne*, o hospedeiro deve estar presente no momento da infestação do substrato.

**Palavras-chaves:** lipídios neutros, migração, penetração, nematóides das galhas, soja.

**Summary** - Rocha, F.S., V.P. Campos, E.H. Silva, S.P.S. Rocha, M.C. Carli & L.S.A.S. Costa. 2008. *In vitro* migration of *Meloidogyne incognita* toward soybean roots.

The effects of timing of soybean seeding and the storage of second stage juveniles (J<sub>2</sub>) of *M. incognita* on the migration and losses of body energy when J<sub>2</sub> were placed at the depth of 0, 2, 4 and 6 cm from soybean roots were studied. The J<sub>2</sub> were placed in glass tubes with sand and separated from the root by screen of 0.36 mm pore diameter before the soybean seeding. The tubes were stored for 5, 10, 15 or 20 days at 27 ± 2 °C. In another assay, the J<sub>2</sub> were placed in glass tubes at different distances and stored in sand for 5, 10, 15 or 20 days. The soybean was seeded after the storage period and the penetration assessment was done five days after the seeding. The interaction between inoculum distances and the evaluation periods and, also, between distances and the amount of J<sub>2</sub> lipids were not significant. However, the lipid amount of the non-infective J<sub>2</sub> decreased with the period of evaluation, reducing penetration of *M. incognita*. After 10 days from inoculation until the end

of the assay, the number of *M. incognita* in the root was alike when the J<sub>2</sub> was placed at 4 or 6 cm from the soybean root, but 40 to 50 % lower than those placed at the soybean surface (0 cm) or at 2 cm from the root. When the J<sub>2</sub> were stored before seeding, penetration was reduced drastically after five days of storage, reducing to null after 10 days until the end of the assay. After five days of storage, the J<sub>2</sub> body lipid amount was 23 % of the original content, with lost of the infectiveness. Therefore, to evaluate migration of *Meloidogyne* J<sub>2</sub>, the host must be present at the moment of the substract infestation.

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

## Introdução

O processo de movimentação do juvenil do segundo estágio (J<sub>2</sub>) de *Meloidogyne* spp. em direção à raiz é resultante da resposta à atração pelo local de penetração (Endo, 1975; Young, 1992), a qual é proporcionada pelo exsudato produzido pela raiz, de composição e concentração diferentes (Rovira, 1969). Um gradiente de concentração de compostos químicos exsudados pelas raízes da planta hospedeira se forma na rizosfera e no solo, constituindo o principal fator responsável pelo direcionamento do nematóide (Klingler, 1965; Griffin & Waite, 1971; Zhao *et al.*, 2000). No entanto, a distância do nematóide em relação à fonte de estímulo e a concentração das substâncias emanadas pela raiz pode influenciar a percepção do nematóide, causando mudanças 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, 1979; Prot & Van Gundy, 1981a,b).

A penetração de *Meloidogyne* spp. ocorre nas raízes novas, especificamente na coifa da raiz (Wallace, 1973; Hussey & Williamson, 1998; Campos, 2003). A distância que algumas espécies de nematóide movem-se à procura deste local da raiz tem sido relatada por alguns pesquisadores (Virglierchio, 1961; Lavalley & Rohde, 1962; Prot, 1980). No solo, os J<sub>2</sub> podem migrar verticalmente em direção ao sistema radicular a uma distância entre 5 a 75 cm (Prot, 1978; Prot & Van Gundy, 1979; Prot & Van Gundy, 1981a,b), em proporções diferentes, variando com a espécie do nematóide.

Logo após a eclosão, o J<sub>2</sub> se torna mais sensível às alterações das condições ambientais (Bergenson, 1959), podendo perder sua infectividade devido ao gasto de suas reservas lipídicas (Reversat, 1981; Christophers

*et al.*, 1997). Campos (2003) observou que a perda de 39 % do teor de lipídio em J<sub>2</sub> de *M. javanica* representa redução de 74 e 61 % no número de fêmeas e massas de ovos respectivamente, nas raízes parasitadas. A intensa atividade muscular do J<sub>2</sub> em resposta ao estímulo da raiz ou o retardamento na penetração levam à queda rápida do teor de lipídio, constituindo os principais drenos da energia acumulada. Entretanto, detalhes desse 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. 'Doko') foram distribuídas em bandejas plásticas previamente desinfestadas com álcool 95 %, as quais continham areia passada em peneira de abertura de malha 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 ± 2 °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 (J<sub>2</sub>) de *Meloidogyne incognita*.** Raízes de tomateiros (*Lycopersicon esculentum* Mill. '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 %, segundo 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 extração 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 J<sub>2</sub>, 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 2,4 cm de diâmetro por 14,5 cm de altura, contendo areia fina quartizífera umedecida a 0,5 cm de profundidade, colocou-se 0,7 ml de suspensão contendo 150 J<sub>2</sub> 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 cm<sup>3</sup> 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 J<sub>2</sub> foram colocados na superfície da areia após o plantio da soja, sem tela excludora. Os tubos foram vedados e incubados em sala climatizada a 27 ± 2°C com fotoperíodo de 14 h de luz por 5, 10, 15 e 20 dias. Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado, com fatorial 5 × 4, sendo cinco distâncias do inóculo em relação à tela excludora de raízes e quatro períodos de avaliação, com seis 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 M em tubos de centrífuga 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 J<sub>2</sub> de *M. incognita* recuperados do substrato e fez-se a coloração de lipídios neutros com o corante "Oil Red O" (Storey, 1983; Christophers *et al.*, 1997; Campos, 2003). A partir das fotografias dos J<sub>2</sub>, utilizou-se o programa "Image Tool for Windows", para estimar a área total do corpo do J<sub>2</sub> 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 J<sub>2</sub> 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 J<sub>2</sub> de *M. incognita* nas raízes.

Os dados relativos ao número de J<sub>2</sub> no interior da raiz e no substrato 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 variáveis significativas pelo teste F, referente ao teor de lipídios neutros dos J<sub>2</sub>, 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 J<sub>2</sub> de *M. incognita*, sobre o qual se adicionou 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 ± 2°C, fotoperíodo de 14 horas, por 0, 5, 10, 15 e 20 dias. Após cada período de armazenamento, quantificou-se o teor de lipídios neutros dos J<sub>2</sub> extraídos da areia de dois tubos. Em seguida, colocou-se a tela excludora de raízes e, sobre ela, 20 cm<sup>3</sup> de areia umedecida, realizando-se logo após o plantio da



plântula de soja nos tubos, os quais foram mantidos por 5 dias em sala climatizada nas mesmas condições do ensaio anterior, para o crescimento e infestação das raízes de soja. Na testemunha, os J<sub>2</sub> 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 J<sub>2</sub> no interior da raiz, de J<sub>2</sub> 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 (J<sub>2</sub>) de *Meloidogyne incognita*.

A interação entre as distâncias do inóculo e os períodos de avaliação não foi significativa. O número de juvenis e/ou adultos de *M. incognita* dentro da raiz decresceu ( $P \leq 0,05$ ) a cada distância em que o inóculo foi colocado em relação à raiz da soja, aos cinco dias após a inoculação. Neste período migraram verticalmente 63, 42 e 18 % dos J<sub>2</sub> colocados a 2, 4 e 6 cm de distância da raiz, respectivamente (Tabela 1). A partir dos 10 dias após a inoculação até o final do ensaio, o número de juvenis e/ou adultos de *M. incognita* na soja foi semelhante quando os J<sub>2</sub> foram colocados a 4 e 6 cm de distância da raiz, porém 40 a 50 % inferior ao número de juvenis e/ou adultos encontrados dentro da raiz, quando o inóculo foi colocado em contato (0 cm) ou a 2 cm da raiz da soja (Tabela 1).

A colocação do J<sub>2</sub> na superfície de plantio da soja (testemunha) ou sob a tela (0 cm de distância) não

afetou ( $P \leq 0,05$ ) o número de juvenis e/ou adultos de *M. incognita*. Entretanto, o inóculo colocado a 2 cm de distância, apesar de reduzir o número total de *M. incognita* dentro da raiz em comparação com o inóculo colocado em contato (0 cm), apenas foi significativamente menor aos 5 e 20 dias após a inoculação (Tabela 1).

O número de J<sub>2</sub> encontrado no substrato, isto é, provavelmente não infectivos, aumentou com a distância em que o inóculo foi colocado em relação à raiz. Entretanto, aos 15 e 20 dias após a inoculação, o número de J<sub>2</sub> não infectivos foi semelhante estatisticamente, em qualquer distância em que o inóculo foi colocado, porém diferente ( $P \leq 0,05$ ) do número encontrado na areia quando o inóculo foi colocado em contato com a raiz (0 cm) ou na testemunha (Tabela 2).

A interação entre a distância em que o inóculo foi colocado e o teor de lipídio do J<sub>2</sub> não foi significativa. Também não houve diferença significativa no teor de lipídio dos J<sub>2</sub> encontrados na areia oriundos da colocação a diferentes distâncias da raiz. Entretanto, o teor de lipídio do J<sub>2</sub> decresceu com o período de avaliação, com maior redução entre o quinto (61 %) e décimo dias (87 %) (Figura 1). No mesmo período, não houve aumento do número de juvenis e/ou adultos de *M. incognita* dentro da raiz, em qualquer distância da colocação do inóculo e mesmo na testemunha (Tabela 1). Portanto, após dez dias da inoculação, os J<sub>2</sub> não têm mais condições fisiológicas para a penetração e desenvolvimento dentro do hospedeiro.

A menor penetração nas raízes e o maior número

**Tabela 1** - Número total de *Meloidogyne incognita* no interior de raízes de soja após 5, 10, 15 e 20 dias da infestação do substrato com juvenis do segundo estágio (J<sub>2</sub>), a diferentes distâncias do sistema radicular.

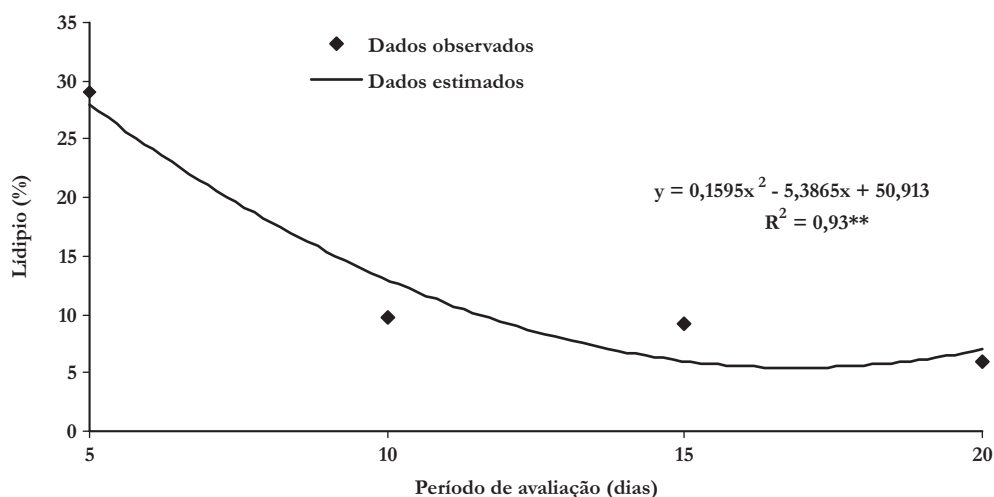
Distâncias	Períodos de avaliação (dias)			
	5	10	15	20
Testemunha	88 a	81 a	80 a	72 a
0 cm	73 a	75 a	68 b	66 a
2 cm	55 b	60 a	51 b	52 b
4 cm	37 c	33 b	30 c	32 c
6 cm	16 d	32 b	29 c	28 c
CV(%)	16,03	17,02	20,79	9,64

Testemunha: J<sub>2</sub> colocados na superfície da areia após o plantio da soja, sem tela excludora. 0 cm: J<sub>2</sub> colocados sob a tela excludora da raiz de soja; 2 cm: J<sub>2</sub> colocados a 2 cm de profundidade da raiz; 4 cm: J<sub>2</sub> colocados a 4 cm da raiz; 6 cm: J<sub>2</sub> colocados a 6 cm da raiz. 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 (J<sub>2</sub>) de *Meloidogyne incognita* recuperados do substrato, aos 5, 10, 15 e 20 dias da infestação, a diferentes distâncias do sistema radicular.

Distâncias	Períodos 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: J<sub>2</sub> colocados na superfície da areia após o plantio da soja, sem tela excludora. 0 cm: J<sub>2</sub> colocados sob a tela excludora da raiz de soja; 2 cm: J<sub>2</sub> colocados a 2 cm de profundidade da raiz; 4 cm: J<sub>2</sub> colocados a 4 cm da raiz; 6 cm: J<sub>2</sub> colocados a 6 cm da raiz. 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 em juvenis do segundo estágio (J<sub>2</sub>) de *Meloidogyne incognita* recuperados da areia aos 5, 10, 15 e 20 dias, após colocação dos J<sub>2</sub> a diferentes distâncias do sistema radicular da soja.

de J<sub>2</sub> de *M. incognita* no substrato com o aumento da distância (Tabelas 1 e 2) estão relacionados com a quantidade e/ou qualidade das substâncias atrativas exsudadas pelas raízes, já que os J<sub>2</sub> colocados a diferentes distâncias do sistema radicular continuam reserva energética corporal suficiente para mobilidade e infectividade, com média de 74 % de lipídios neutros. Portanto, o reconhecimento do gradiente destas substâncias atrativas é dificultado à medida que o J<sub>2</sub> está distanciado da raiz (Tabela 1), o que resulta sempre no aumento do número de J<sub>2</sub> encontrado no substrato (Tabela 2). Mesmo quando o inóculo foi colocado na superfície do substrato (testemunha) ou em contato com a raiz (0 cm), parte do inóculo não encontrou a raiz (Tabela 2), indicando que esses J<sub>2</sub> foram atraídos por outros fatores, perdendo o

gradiente direcional das substâncias atrativas, além de apresentarem movimentação excessiva, pois com cinco dias após a inoculação os J<sub>2</sub> não infectivos só tinham 29 % de lipídio, enquanto que aos 10 dias após a inoculação tinham 10 % de lipídios. Prot (1978) verificou que as percentagens de J<sub>2</sub> de *M. javanica* capazes de migrar verticalmente a 25, 50 e 75 cm de distância da raiz de tomateiro, aos nove dias, foram de 66, 50 e 25 %, respectivamente. Prot & Van Gundy (1981b) verificaram que aproximadamente 33 % dos J<sub>2</sub> de *M. incognita* migraram verticalmente 20 cm em 7 dias, quando colocados sob 12 horas de luz e 12 horas de escuro.

A infectividade só ocorre no hospedeiro quando o teor de lipídio corporal do J<sub>2</sub> está acima de 50 % (Christophers *et al.*, 1997). Segundo Van Gundy *et al.*

(1967), durante o processo de penetração, a perda do teor lipídico dos J<sub>2</sub> de *M. javanica* não é significativa, sendo a maior parte da reserva energética corporal gasta rapidamente quando o J<sub>2</sub> permanece no solo, com presença de raiz da planta hospedeira, que em solo sem raiz. Neste trabalho, aos cinco dias de avaliação ocorreram 42 e 18 % de penetração do J<sub>2</sub> quando colocado a 4 e 6 cm da raiz, respectivamente, e 83 e 63 % quando colocados a 0 e 2 cm da raiz, o que comprova a transmissão do estímulo na areia utilizada. Contudo, Viglierchio (1961) relata repelência da raiz de centeio ao J<sub>2</sub> de *M. hapla* colocado a 2 cm de distância. Também Prot & Van Gundy (1981a) constataram inibição total da migração vertical, quando o J<sub>2</sub> de *M. incognita* foi colocado a 20 cm da raiz do tomateiro em areia silicatada.

Prot (1978) constatou que J<sub>2</sub> de *M. incognita* e *M. javanica* colocados a 5 e 10 cm da raiz de tomateiro, por nove dias, penetraram e desenvolveram dentro da raiz de forma similar, em comparação com aqueles colocados a 0 cm. A distância máxima testada neste trabalho, que foi de 6 cm, já causou 82 % de redução na migração direcional para a raiz (Tabela 1). As maiores distâncias, ao que tudo indica, são raros os J<sub>2</sub> que alcançam o local de infecção. Possivelmente, à medida que aumenta a distância do inóculo em relação à raiz, aumentam também as chances da influência de outros fatores atrativos, competidores com o gradiente de substâncias atrativas emanadas da raiz. Além disso, não se pode considerar que 100 % dos indivíduos no inóculo empregado tenham energia corporal suficiente para o trajeto até o local de

penetração.

**Efeito do período de armazenamento de juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne incognita* colocados a diferentes distâncias do sistema radicular.** A interação entre as distâncias do inóculo e o período de armazenamento não foi significativa. O armazenamento do J<sub>2</sub> de *M. incognita* em água parada (testemunha) causou queda de 75, 90 e 100 % na infectividade aos cinco, dez e 15 dias de armazenamento, respectivamente (Tabela 3). Queda maior ( $P \leq 0,05$ ), chegando a 100 % em comparação com a testemunha sem armazenamento, ocorreu em areia aos cinco e dez dias de armazenamento, porém sem diferença ( $P \leq 0,05$ ) entre as distâncias em que o inóculo foi colocado da raiz da soja. O efeito da distância se manifestou apenas quando não houve armazenamento (0 dia), decrescendo ( $P \leq 0,05$ ) o número de juvenis e/ou adultos de *M. incognita* dentro da raiz em cada distância testada (Tabela 3).

Sem armazenamento (0 dia), o número de J<sub>2</sub> no substrato foi maior ( $P \leq 0,05$ ) nas distâncias de 2, 4 e 6 cm, em comparação com a colocação do J<sub>2</sub> a 0 cm e com os nematóides na água (testemunha), porém menor (média de 40 a 50 %) que em qualquer período de armazenamento (Tabela 4). O número de J<sub>2</sub> no substrato foi maior após cinco dias de armazenamento na areia, em comparação à testemunha; porém nos demais períodos de armazenamento não houve efeito ( $P \leq 0,05$ ) do armazenamento nem das profundidades (Tabela 4).

Quanto ao teor de lipídio corporal do J<sub>2</sub>, não houve interação entre a distância e o período de

**Tabela 3** - Número de juvenis de *Meloidogyne incognita* encontrados no interior da raiz de soja, aos 5 dias após o transplante da soja em substrato com juvenis do segundo estágio (J<sub>2</sub>), armazenados em areia ou água (testemunha), por diferentes períodos e distâncias do sistema radicular.

Distâncias	Períodos 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: J<sub>2</sub> armazenados em água e colocados na superfície da areia após o plantio da soja, sem tela excludora. 0 cm: J<sub>2</sub> colocados sob a tela excludora da raiz; 2 cm: J<sub>2</sub> colocados a 2 cm de profundidade da raiz; 4 cm: J<sub>2</sub> colocados a 4 cm da raiz; 6 cm: J<sub>2</sub> colocados a 6 cm da raiz. 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 (J<sub>2</sub>) de *Meloidogyne incognita* recuperados no substrato, após 5 dias do plantio da soja.

Distâncias	Períodos 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: J<sub>2</sub> armazenados em água e colocados na superfície da areia após o plantio da soja, sem tela excludora. 0 cm: J<sub>2</sub> colocados sob a tela excludora da raiz; 2 cm: J<sub>2</sub> colocados a 2 cm da raiz; 4 cm: J<sub>2</sub> colocados a 4 cm da raiz; 6 cm: J<sub>2</sub> colocados a 6 cm da raiz. 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.

armazenamento. Também não houve significância com relação à distância e o teor lipídico. O teor de lipídio corporal dos J<sub>2</sub> não infectivos e armazenados em água decresceu com o aumento do período de armazenamento, com queda expressiva até os dez dias (Figura 2). O armazenamento por 10, 15 e 20 dias causou expressiva queda do teor de lipídio dos J<sub>2</sub> recuperados no substrato, cinco dias após o plantio da soja (Figura 3). Os dois ensaios realizados diferenciam-se quanto ao tempo de plantio da soja, isto é, no momento da colocação do inóculo ou após o período de estocagem dos J<sub>2</sub>, o que afetou os resultados alcançados (Tabelas 1, 2, 3 e 4). Quando a soja foi plantada após a estocagem (2º. ensaio), os J<sub>2</sub> ficaram no solo sem o hospedeiro, por conseguinte, sem organização direcional para o movimento. Por exemplo, cinco dias após o armazenamento na areia, quando a soja foi plantada, a infectividade dos J<sub>2</sub> já estava muito baixa, resultando na grande redução no número de juvenis e/ou adultos dentro da raiz (Tabela 3). Portanto, apenas cinco dias de estocagem de J<sub>2</sub> na areia sem o hospedeiro determinaram a perda de 94 e 91 % da infectividade dos J<sub>2</sub> de *M. incognita*, na superfície da areia (0 cm) e a 2 cm da raiz, respectivamente.

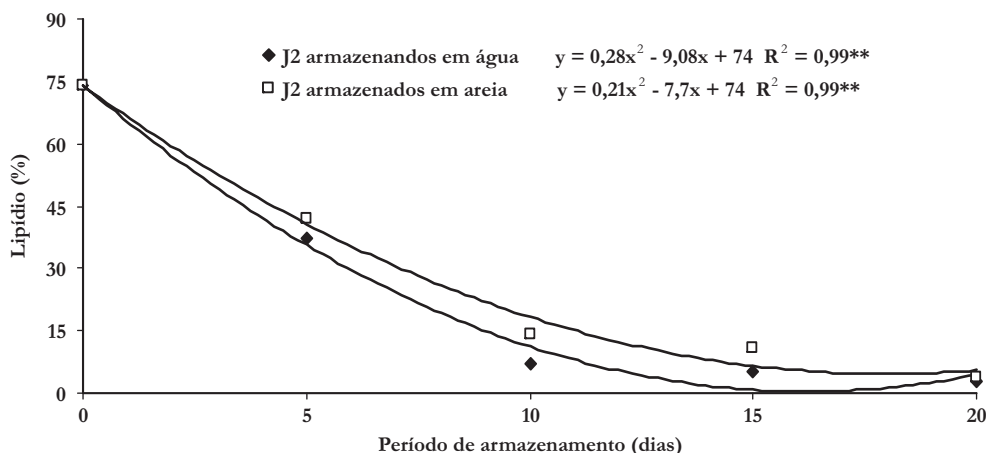
Observou-se também que, aos cinco dias de estocagem, o teor de lipídio corporal dos J<sub>2</sub> reduziu-se para 23 %, os quais, segundo Christophers *et al.* (1997) e Van Gundy *et al.* (1967) não possibilitariam mais a capacidade infectiva. Portanto, a soja colocada na areia após o armazenamento, forneceu um gradiente de substâncias atrativas ao nematóide, quando os J<sub>2</sub> continham reduzida energia corporal e com baixa infectividade (Tabela 3). Campos (2003)

verificou perda de 39 e 56 % no lipídio corporal de J<sub>2</sub> de *M. javanica*, a partir do segundo e quarto dia de armazenamento dos J<sub>2</sub> em água parada, a 28 °C, respectivamente. Robinson *et al.* (1987) observaram redução significativa na mobilidade e na infectividade de J<sub>2</sub> de *Globodera rostochiensis* e *G. pallida* após perdas superiores de 65 % do lipídio original. Van Gundy *et al.* (1967) verificaram que o armazenamento de J<sub>2</sub> de *M. incognita*, a 25 °C, por 16 dias, causou perda de 95 % no teor de lipídios neutros, o que resultou na perda de 73 e 62 % da mobilidade e infectividade, respectivamente.

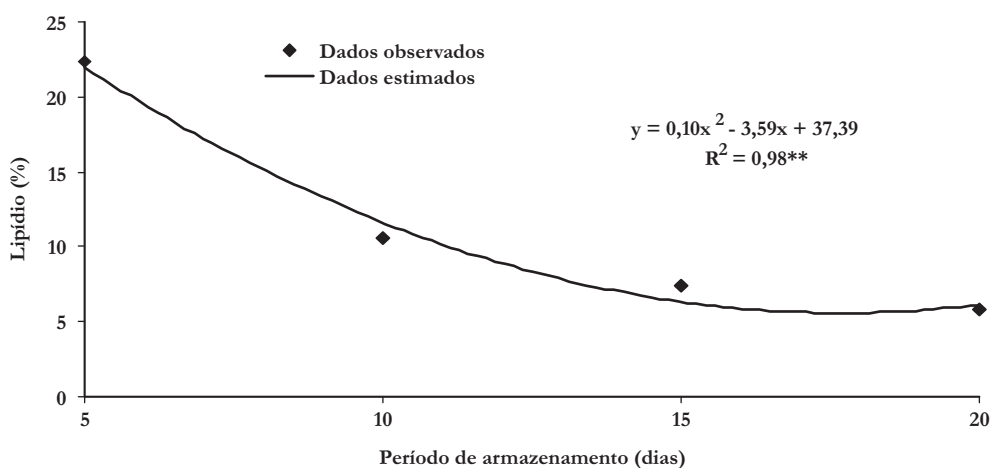
Portanto, a avaliação do efeito da distância entre o local de inoculação a raiz só é possível quando o hospedeiro está presente no momento da infestação do substrato, pois os J<sub>2</sub> perdem rapidamente os lipídios corporais e sua infectividade na ausência do hospedeiro.

### Literatura Citada

- BERGERSON, G.B. 1959. The influence of temperature on the survival of some species of the genus *Meloidogyne*, in the absence of a host. *Nematologica*, 4: 344-354.
- BONETI, J.I.S. & S. FERRAZ, 1981. Modificação do método de Hussey e Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de cafeeiro. *Fitopatologia Brasileira*, 6 (3): 553.
- CAMPOS, H.D. 2003. Aspectos do parasitismo e da privação alimentar do nematóide de galhas (*Meloidogyne javanica*) e do cisto (*Heterodera glycines*) em soja. (Tese de Doutorado). Universidade Federal de Lavras (MG), 203 P.
- CHRISTOPHERS, A.E.P., M.N. PATEL, J.A. BENSON, V.W. SAKA, A.A.F. EVANS & D.J. WRIGHT. 1997. A rapid field-laboratory bioassay to assess the infectivity of *Meloidogyne* spp. second stage juveniles. *Nematologica*, 43 (1): 117-120.



**Figura 2** - Percentagem de lipídios neutros dos juvenis do segundo estágio ( $J_2$ ) de *Meloidogyne incognita*, após armazenamento em água parada e em areia umedecida, a  $27 \pm 2$  °C, por diferentes períodos.



**Figura 3** - Percentagem de lipídios neutros dos juvenis do segundo estágio ( $J_2$ ) de *Meloidogyne incognita* estocados em areia por 5, 10, 15 e 20 dias antes do plantio da soja e recuperados no substrato após 5 dias do plantio da soja.

- COOLEN, W.A. & C.J.D'HERDE. 1972. A Method for the Quantitative Extraction of Nematodes from Plant Tissue. State Agriculture Research Centre, Ghent, 77 p.
- ENDO, B.Y. 1975. Pathogenesis of nematode-infected plants. Annual Review of Phytopathology, 13: 213-238.
- GRIFFIN, G.D. & W.W. WAITE. 1971. Attraction of *Ditylenchus dipsaci* and *Meloidogyne hapla* by resistant and susceptible alfalfa seedling. Journal of Nematology, 3 (3): 215-219.
- HUSSEY, R.S. & K.R. BARKER. 1973. A comparison of methods for collecting inocula of *Meloidogyne* spp including a new technique. Plant Disease Reporter, 57 (12): 1025-1028.
- HUSSEY, R.S. & V.M. WILLIAMSON. 1998. Physiological and molecular aspects of nematode parasitism. In: BARKER, K.R., G.A. PEDERSON & G.L. WINDHAM (ed) Plant and Nematode Interactions. American Society of Agronomy, Hardcover, p. 87-108.
- KLINGLER, J. 1965. On the orientation of plant nematodes and of some other soil animals. Nematologica, 11 (1): 4-18.
- LAVALLEE, W.H. & R.A. ROHDE. 1962. Attractiveness of plant roots to *Pratylenchus penetrans* (Cobb). Nematologica, 8: 252-260.
- PROT, J.C. 1980. Migration of plant-parasitic nematodes towards plant roots. Revue de Nématologie, 3 (2): 305-318.
- PROT, J.C. 1978. Vertical migration of four natural populations of *Meloidogyne*. Revue de Nématologie, 1 (1): 109-112.
- PROT, J.C. & S.D. VAN GUNDY. 1979. The effect of clay particles on the migration of *Meloidogyne incognita* toward and into tomato roots. Journal of Nematology, 11 (4): 312.
- PROT, J.C. & S.D. VAN GUNDY. 1981a. Effect of soil texture

- and the clay component on migration of *Meloidogyne incognita* second-stage juveniles. *Journal of Nematology*, 13 (2): 213-217.
- PROT, J.C. & S.D. VAN GUNDY. 1981b. Influence of photoperiod and temperature on migration of *Meloidogyne* juveniles. *Journal of Nematology*, 13 (2): 218-220.
- ROCHA, F.S., M.F.S. MUNIZ & V.P. CAMPOS. 2005. Coloração de fitonematóides com corantes usados na indústria alimentícia brasileira. *Nematologia Brasileira*, 29 (2): 293-297.
- RODGER, S., A.G. BENGOUGH, B.S. GRIFFITHS, V. STUBBS & I.M. YOUNG. 2003. Does the presence of detached root border cell of *Zea mays* alter the activity of the pathogenic nematode *Meloidogyne incognita*? *Phytopathology*, 93 (9): 1111-1114.
- ROVIRA, A.D. 1969. Plant root exudates. *The Botanical Review*, 35 (1):35-57.
- ROBINSON, M.P., H.J. ATKINSON & R.N. PERRY. 1987. 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*, 10 (3): 343-348.
- SCOTT, A.J. & M. KNOTT. 1974. Cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. *Biometrics*, 30 (3): 507-512.
- STOREY, R.M.J. 1983. The initial neutral lipid reserves of juveniles of *Globodera* spp. *Nematologica*, 29 (2): 144-150.
- VAN GUNDY, S.D., A.F. BIRD & H.R. WALLACE. 1967. Aging and starvation in juvenile of *Meloidogyne javanica* and *Tylenchulus semipenetrans*. *Phytopathology*, 57 (6): 559-571.
- VIGLIERCHIO, D.R. 1961. Attraction of parasitic nematodes by plant root emanations. *Phytopathology*, 51 (2): 136-142.
- WALLACE, H.R. 1973. *Nematode Ecology and Plant Disease*. Crane, Russak & Company, New York, 228 p.
- YOUNG, L.D. 1992. Epiphytology and life cycle. In: RIGGS, E.D. & J.A. WRATHER (ed). *Biology and Management of the Soybean Cyst Nematode*, p. 27-36.
- ZHAO, X., M. SCHMITT & C. M. HAWES. 2000. Species-dependent effects of border cell and root tip exudates on nematodes behavior. *Phytopathology*, 90 (11): 1239-1245.

## Pathogenicity and Genetic Variability of *Radopholus similis* Populations in Bananas (*Musa acuminata* AAA and AA) based on RAPD Analysis\*

Dilson C. Costa<sup>1</sup>, Fabio G. Faleiro<sup>2</sup>, Juvenil E. Cares<sup>3\*\*</sup> & Antonio C. Gomes<sup>2</sup>

\*This article is part of the DSc. thesis of senior author - Graduate Program in Plant Pathology, University of Brasília, with scholarship and financial support provided by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) - Edital Universal (019 / 2003)

<sup>1</sup>Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, C. Postal 02372, 70770-900 Brasília (DF) Brasil.

<sup>2</sup>Embrapa Cerrados, C. Postal 08223, 73301-970, Planaltina (DF) Brasil.

<sup>3</sup>Universidade de Brasília, C. Postal 4457, 70910-900 Brasília (DF) Brasil.

\*\*Corresponding author: cares@unb.br

Received for publication on April 6, 2006. Accepted on July 29, 2008

Edited by Claudio Marcelo Oliveira and Regina Carneiro

**Summary** - Costa, D.C., F.G. Faleiro, J.E. Cares & A.C. Gomes. 2008. Pathogenicity and genetic variability of *Radopholus similis* populations in bananas (*Musa acuminata* AAA and AA) based on RAPD analysis.

The burrowing nematode (*Radopholus similis*) is considered the most economically important nematode to banana production worldwide. In Brazil, yield losses can reach up to 100 % among Cavendish bananas. Although no information is available on genetic and biological variability of the nematode in Brazil in bananas and other plants, observations have suggested the occurrence of several biotypes of the nematode. The objective of this study was to observe genetic variability of 12 populations of *R. similis* using RAPD markers, in relation to geographic origin and aggressiveness on diploid (AA) and triploid (AAA) banana genotypes. This study showed that all populations of *R. similis* reproduced in all banana genotypes, and higher values for the reproduction factor occurred on Grand Naine, Pisang Jari Buaya, and Yangambi km 5. Differences in aggressiveness were reflected on plant height and root weight. Populations from Bahia (BA<sub>1</sub> and BA<sub>2</sub>), Minas Gerais (MG<sub>1</sub> and MG<sub>2</sub>), Pernambuco (PE), Cuba (CUB), and Costa Rica (CR) were more aggressive on banana plants, in particular those from Pernambuco and Bahia. By contrast, populations from Rio de Janeiro (RJ), São Paulo (SP<sub>1</sub> and SP<sub>2</sub>), Santa Catarina (SC), and Australia (AUS) were less aggressive. Through RAPD markers at the relative genetic distance of 0.45, the populations of *R. similis* were separated in five similarity groups. No correlation between geographic proximity and genetic similarity was observed among *R. similis* populations, except for the populations from Bahia (BA<sub>1</sub> and BA<sub>2</sub>). In this study it was evidenced a close association between the level of aggressiveness on bananas and a short genetic distance, except for the populations from Rio de Janeiro (RJ) and Australia (AUS).

**Key words:** pathogenicity, aggressiveness, genetic variability, burrowing nematode, banana, Brazil.

**Resumo** - Costa, D.C., F.G. Faleiro, J.E. Cares & A.C. Gomes. 2008. Variabilidade patogênica e genética de populações de *Radopholus similis* em bananeiras (*Musa acuminata* AAA e AA.) baseada em marcadores RAPD. O nematóide cavernícola (*Radopholus similis*) é o nematóide de maior importância econômica em bananeiras em todo mundo. No Brasil as perdas na produção atingem 100 % entre as bananeiras do subgrupo Cavendish. Embora nenhuma informação tenha sido divulgada quanto à variabilidade genética e biológica das populações de *R. similis* associadas com bananeiras e a outras hospedeiras no Brasil, observações têm sugerido a existência de vários biótipos do nematóide. O objetivo desse estudo foi observar a variabilidade genética de 12 populações de *R. similis* usando marcadores RAPD, em relação à origem geográfica e agressividade sobre genótipos diplóides (AA) e triplóides (AAA) de banana. Este estudo mostrou que todas as populações reproduziram-se

em todas as cultivares de banana e, que valores elevados de fator de reprodução ocorreram nas cultivares Grande Naine, Pisang Jari Buaya e Yangambi km 5. Diferenças de agressividade foram refletidas na altura das plantas e massa das raízes. As populações da Bahia (BA<sub>1</sub> e BA<sub>2</sub>), de Minas Gerais (MG<sub>1</sub> e MG<sub>2</sub>), de Pernambuco (PE), de Cuba (CUB) e da Costa Rica (CR) foram mais agressivas sobre as bananeiras, especialmente a de Pernambuco e as da Bahia. Ao contrário, as populações do Rio de Janeiro (RJ), de São Paulo (SP<sub>1</sub> e SP<sub>2</sub>), de Santa Catarina (SC), e da Austrália (AUS) foram menos agressivas. Através de marcadores RAPD, a uma distância genética relativa de 0,45, as populações de *R. similis* foram separadas em cinco grupos. Não houve correlação entre proximidade geográfica e similaridade genética entre as populações, exceto para as populações da Bahia (BA<sub>1</sub> e BA<sub>2</sub>). No presente estudo, foi evidenciada uma associação entre o grau de agressividade em bananeiras e menor distância genética entre as populações de *R. similis*, exceto para as populações do Rio de Janeiro (RJ) e da Austrália (AUS).

**Palavras-chaves:** patogenicidade, agressividade, variabilidade genética, nematóide cavernícola, banana, Brasil.

## Introduction

The nematode *Radopholus similis* has been known since 1890, when Cobb detected it parasitizing banana roots in the Fiji Islands. The nematode was described as *Tylenchus similis* Cobb, 1893. In 1949, Thorne transferred it to the genus *Radopholus*, with this species renamed as *R. similis* (Cobb, 1893) Thorne, 1949. This nematode has a worldwide distribution, and is able to cause extensive root necroses, and is therefore commonly named as the burrowing nematode. Lesions are progressive towards the point of root emission, reaching the rhizome, where extensive dark lesions surround the rhizome. The decay of anchoring roots is responsible for plant uprooting. In addition to reduction in plant stand, parasitism by this nematode reflects negatively on fruit yield, due to late flowering, lack of uniformity in bunch development at harvest time, and reduction in bunch weight (Jaehn, 1993).

This species probably is originated from Australia and New Zealand (Sher, 1968), then disseminated to banana plantations throughout the world due to frequent exchange of infected rhizomes. *Radopholus similis* was first reported in Brazil in banana plantations of Juquiá, State of São Paulo by Carvalho (1959). Thereafter, the nematode was reported in other municipalities in the region of Vale do Ribeira, State of São Paulo, including Registro, Eldorado Paulista, Miracatu, Pedro de Toledo, Itariri, Pariquera-Açu, Iguape, Peruibe and Itanhaem. Zem & Lordello (1983) and Lima & Goulart (1986) reported the occurrence of *R. similis* in banana plantations in the states of Bahia,

Ceará, Espírito Santo, Goiás, Distrito Federal, Maranhão, Mato Grosso do Sul, Paraíba, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Rio de Janeiro, São Paulo, Santa Catarina and Minas Gerais. There were additional reports on other hosts in the State of Rio Grande do Sul (Sperandio & Monteiro, 1993).

Several factors may affect taxonomic identification of nematodes. Identification is mainly based on the analysis of morphologic and morphometric characteristics. However, for closely related species, morphology of individuals is not sufficient for a precise distinction. Therefore, physiological, cytogenetic, serological and molecular characteristics can establish complementary means for the identification of morphologically similar taxa. Molecular techniques based on PCR (RFLP, RAPD and sequencing of the ITS regions) have been used to identify and to differentiate among plant-parasitic nematodes, as well as for establishing phylogenetic relationships, to evaluate intraspecific genetic variation, and to associate biological profile with nematode virulence (Allen *et al.*, 1997; Thiéry *et al.*, 1997; Blaxter *et al.*, 1998; Subbotin *et al.*, 1999; Elbadri *et al.*, 2002; Wishart *et al.*, 2002; Handoo *et al.*, 2004; 2005).

Du Charme & Birchfield (1956) demonstrated the existence of two races in *R. similis*: one attacking bananas and the other banana and citrus plants. Afterwards, studies of behavior, sexual attraction (Huettel *et al.*, 1982), biochemical (Huettel *et al.*, 1983a,b), and kariological (Huettel & Dickson, 1981; Huettel *et al.*, 1984a), separated both races into two species, *R. similis* and *R. citrophilus*, the latter restricted



to the State of Florida (Huettel *et al.*, 1984b). Later, Siddiqui (1996) suggested *R. citrophilus* as a sub-species of *R. similis* (*R. similis citrophilus* and *R. similis similis*). The possibility of the existence physiological races or biotypes in *R. similis* has increased interest in genetic variation at the intraspecific level (Kaplan & Gottwald, 1992; Hahn *et al.*, 1994) since knowledge of genetic variation within the species *R. similis* is essential for breeding programs to resistance to this nematode.

In Brazil, banana plantations have been expanding into different regions, contributing for making the country the second largest banana producer worldwide (FAO, 2007). No information is available on the biology and genetic variability among populations of *R. similis* associated with bananas in Brazil. The objective of this study was to observe genetic variability of 12 populations of *R. similis* using RAPD markers, in relation to geographic origin and aggressiveness on diploid (AA) and triploid (AAA) banana genotypes.

## Materials and Methods

**Pathogenicity of *Radopholus similis* populations on bananas.** The experiment was conducted from October to December, 2002 at the Biological Station of the University of Brasilia. The experiment design was completely randomized, with four replications, in a factorial arrangement (12 × 3) of twelve populations of *R. similis* (Table 1) and three banana cultivars with different levels of resistance to the

nematode (Table 2). These banana cultivars were selected taking in account the importance of Grand Naine to the Brazilian banana market, as well as a standard of susceptibility to *R. similis*; Yangambi km 5 as a recently released cultivar, named as Caipira by Embrapa Mandioca e Fruticultura to the Brazilian growers; while Pisang Jari Buaya had been chosen based on previous information assuring resistance of this genotype to *R. similis*. The populations of *R. similis* for this study were extracted from roots and rhizomes of banana (*Musa* AAB), collected in different banana plantations from Brazil. For comparison, three foreign populations of *R. similis* from Cuba (Villa Clara), Costa Rica (Talamanca) and Australia (Queensland) were also included. These populations were introduced from CIRAD (Montpellier, France), considering that similar studies on aggressiveness had been accomplished with them (Fallas *et al.*, 1995; Stoffelen *et al.*, 1999; Elbadri, 2000). Micro-propagated banana plantlets, approximately 10 cm high, were inoculated with 100 nematodes (adults and juveniles) from one of the populations of *R. similis* multiplied on tissue culture of carrot (*Daucus carota* L.) discs (O'Bannon & Taylor, 1968; Fallas & Sarah, 1994). Non inoculated plants of each cultivar served as control. After inoculation, plants were maintained for 120 days in a growth chamber at approx. 28 °C and 12 h daily light. Plants were uprooted and differences of the aggressiveness of *R. similis* populations were compared on the basis of plant height, fresh root weight, percentage of

**Table 1** - *Radopholus similis* populations evaluated in the present study.

Code	Host plant	Locality, state, country
MG <sub>1</sub>	<i>Musa</i> AAB 'Prata Anã'	<sup>1</sup> Janaúba, Minas Gerais, Brazil
MG <sub>2</sub>	<i>Musa</i> AAB 'Prata Anã'	<sup>1</sup> Jaíba, Minas Gerais, Brazil
BA <sub>1</sub>	<i>Musa</i> AAA 'Yangambi km 5'	<sup>1</sup> Cruz das Almas, Bahia, Brazil
BA <sub>2</sub>	<i>Musa</i> AAA 'Nanicão'	<sup>1</sup> Bom Jesus da Lapa, Bahia, Brazil
PE	<i>Musa</i> AAB 'Pacovan'	<sup>1</sup> Petrolina, Pernambuco, Brazil
RJ	<i>Musa</i> AA 'Ouro'	<sup>1</sup> Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil
SP <sub>1</sub>	<i>Musa</i> AAA 'Grande Naine'	<sup>1</sup> Jacupiranga, São Paulo, Brazil
SP <sub>2</sub>	<i>Musa</i> AAA 'Grande Naine'	<sup>1</sup> Cajati, São Paulo, Brazil
SC	<i>Musa</i> AAA 'Nanicão'	<sup>1</sup> Luis Alves, Santa Catarina, Brazil
AUS	<i>Musa</i> AAA	<sup>2</sup> Queensland, Australia
CUB	<i>Musa</i> sp.	<sup>2</sup> Villa Clara, Cuba
CR	<i>Musa</i> AAA 'Valery'	<sup>2</sup> Talamanca, Costa Rica

<sup>1</sup>Roots and rhizomes collected in banana plantations from Brazil.

<sup>2</sup>Culture on carrot disk maintained at CIRAD, Montpellier, France.

**Table 2** - Banana cultivars used in pathogenicity experiment with different levels of resistance to *Radopholus similis*.

Cultivar	Genome	Host status	Reference
Grand Naine	AAA	Highly susceptible	Elsen <i>et al.</i> 2002
Yangambi km 5	AAA	Partially resistant	Fogain & Gowen (1998) and Fallas & Marbán- Mendonza (1994)
Pisang Jari Buaya	AA	Resistant	Wehunt <i>et al.</i> (1978), Pinochet & Rowe (1979) and Elsen <i>et al.</i> (2002)

healthy and dead roots, and percentage of root and rhizome necrosis according to a score scale in Figure 1 (modified from Bridge, 1988; Speijer & De Waele, 1997). The population levels of *R. similis* in roots, rhizome and in soil, and the reproduction factor (RF) were evaluated after nematode extraction, through the methods modified from Coolen & D'Herde (1972) and from Jenkins (1964), respectively.

For analysis of variance, original data (from percentages of lesions in roots and in rhizomes, number of nematodes per gram of root, and final population of nematodes) were converted into log ( $x+1$ ). For all variables the means were compared by Tukey's test ( $P \leq 0.05$ ).

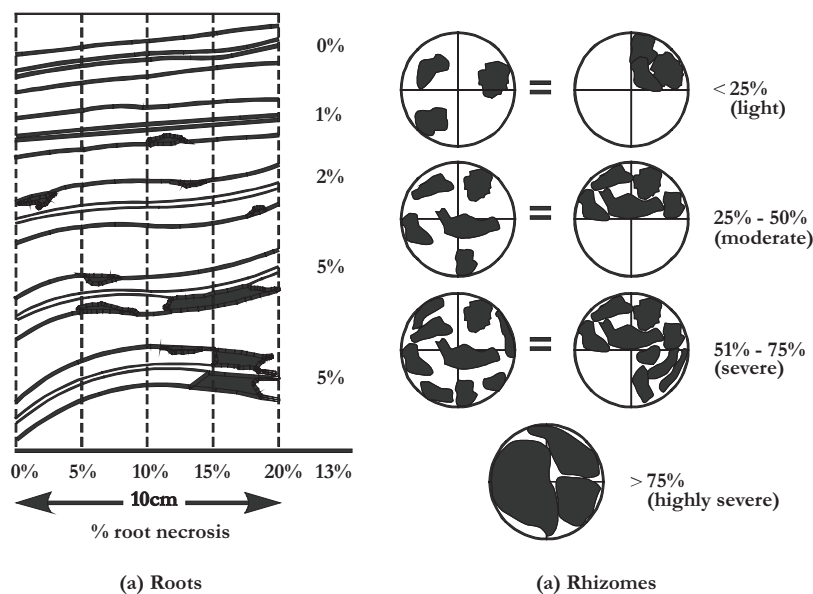
**Genetic variability based on RAPD markers.** The twelve populations of *R. similis* obtained from different banana plantations from Brazil, Australia, Costa Rica and Cuba (Table 1) were analyzed for genetic differences based upon RAPD markers. *Scutellonema bradys* (Steiner & Le Hew, 1933) Andrassy, 1958, obtained from yam tubers cultivated in Cruz das Almas, Bahia, Brazil was included as an outgroup. The populations of *R. similis* were multiplied in carrot disks in tissue culture.

**DNA extraction.** A pre-selection test was performed to determine the number of nematodes (1,000; 2,000; 3,000 or 4,000) necessary to extract a satisfactory amount of DNA for use in PCR. Based on this test, a suspension of 1,000 nematodes (juveniles and adults) of each population was placed, into a 0.5 ml microcentrifuge tube and centrifuged at 2,000 g for 3 minutes. Afterwards, the supernatant was discarded and the precipitate used for DNA extraction. An extraction buffer (Blacke *et al.*, 1992) containing Tris-HCl 10 mM (pH 8.0), EDTA 1 mM, Nonidet P-40 1% and Proteinase K (0,1 µg / µl) was prepared. Aliquots of 7 µl of the buffer were added to each of the tubes containing juveniles and adults of the populations of *R. similis* and *S. bradys*.

Maceration and DNA extraction were carried out according to Fallas *et al.* (1996) with minor modifications. The amount of DNA extracted from each sample was estimated by spectrophotometry at 260 nm (Sambrook *et al.*, 1989). The  $A_{260} / A_{280}$  ratio was used to evaluate DNA purity. After quantification, DNA samples from each population were diluted to 5 ng / µl and stored at - 80 °C.

**RAPD primers selection.** For the selection of decameron primers that generated clear and polymorphic products, DNA from five *R. similis* populations collected from Bahia and from Minas Gerais (Brazil), Cuba and Costa Rica, and the population of *S. bradys* (Sb) (outgroup), were amplified by PCR. Selected primers were used in 13 µl/volume reactions, containing Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, 100 µM of each of the desoxyribonucleotides, 0.4 µM of primer, one unit of *Taq* polimerase enzyme (BRL / Life Technologies) and approximately 15 ng of DNA. Amplifications were carried out on an MJ Research thermocycler with 40 cycles at 94 °C for 15 seconds, 35 °C for 30 seconds and 72 °C for 90 seconds, after an initial DNA denaturation step at 94 °C for 2 minutes. After 40 cycles, an extension step of the amplified chains was carried out at 72 °C for 6 minutes. These samples were applied in agarose gel (1.2%), stained with ethidium bromide and immersed in TBE buffer (Tris-Borate 90 mM, EDTA 1 mM). The electrophoretic separation was conducted for four hours at 90 volts. Following migration, gels were photographed under ultraviolet light.

A total of 44 primers belonging to the OPD, OPE, OPF, OPG e OPH (Operon Technologies Inc., Alameda, CA, EUA) kits were tested, and 18 that generated clear polymorphic bands were selected (Table 3). Although the RAPD technique is relatively simple and requires a small amount of DNA for sharp band visualization, in some cases it carries the



**Figure 1** - Scales for evaluation of the percentage necrosis in roots - according to Speijer & De Waele, 1997 (a), and rhizomes - modified from Bridge (1988) (b), applied to quantify damage caused by 12 populations of *Radopholus similis* on three banana genotypes under growth chamber conditions.

**Table 3** - Oligonucleotide primers utilized in generation of RAPD markers in 12 populations of *Radopholus similis* and one population of *Scutellonema bradys*.

Primers	5' → 3' sequence
OPD-04	TCTGGTGAGG
OPD-05	TGAGCGGACA
OPD-07	TTGGCACGGG
OPD-08	GTGTGCCCA
OPD-16	AGGGCGTAAG
OPD-20	ACCCGGTCAC
OPE-18	GGACTGCAGA
OPF-04	GGTGATCAGG
OPF-05	CCGAATTCCC
OPF-06	GGGAATTCCG
OPF-10	GGAAGCTTGG
OPF-12	ACGGTACCAG
OPG-02	GGCACTGAGG
OPG-03	GAGCCCTCCA
OPG-04	AGCGTGTCTG
OPG-13	CTCTCCGCCA
OPG-16	AGCGTCTTCC
OPG-17	ACGACCGACA

disadvantage of not allowing band reproducibility. Taking into account the possibility of variations in band patterns, two replicates of each population were compared during the phase of primer pre-selection, with no significant variation observed.

**RAPD marker analysis.** The RAPD markers generated were converted into binary data matrices.

Genetic distances between different populations were generated from this matrix based on the Nei & Li (1979) similarity coefficient using the Genes software (Cruz, 1997). A matrix of genetic distance was used for cluster analysis using the hierarchic method (dendrogram) using the UPGMA (Unweighted pair-group arithmetic average) clustering method and the

Statistica software (Statsoft, 1999). Cluster stability was measured by bootstrap analysis with 1,000 replications using the Winboot software (Yap & Nelson, 1996).

## Results

**Pathogenicity of *Radopholus similis* populations on bananas.** Twelve populations of *R. similis* reproduced in different ratios on the banana genotypes in this study (Table 4). Lower values of the nematode RF were observed on Yangambi km 5 (1.5 – 39.7), followed by Pisang Jari Buaya (12.0 – 73.5), while higher reproduction factors were on Grand Naine (32.7 – 98.5).

The populations PE, BA<sub>2</sub>, BA<sub>1</sub>, MG<sub>2</sub>, MG<sub>1</sub> and CUB were more aggressive as compared with CR, RJ, SP<sub>2</sub>, SC, SP<sub>1</sub> and AUS on Grand Naine, with respect to plant height and root weight (Table 4). A positive correlation was detected between higher numbers of nematodes per gram of roots with more severe effects on the reduction of plant growth and on the root weight, when compared with control plants. Pernambuco (PE) population was the most aggressive one on Grand Naine, with the highest number of nematodes leading to the lowest root weight.

On Yangambi km 5, the populations CUB, MG<sub>1</sub>,

SP<sub>2</sub>, BA<sub>2</sub>, BA<sub>1</sub> and PE expressed higher aggressiveness for the variable root weight. With the exception of SP<sub>1</sub> population, no difference in damages to plant height was observed, when compared with control plants (Table 4). The population BA<sub>2</sub> was responsible for the poorest plant growth. Generally, lower values of root weight matched with higher numbers of nematodes per gram of roots, except for plants inoculated with the BA<sub>1</sub> population. The populations CUB, MG<sub>1</sub> and SP<sub>2</sub> were the most aggressive on Yangambi km 5, with the lowest root weight and a positive correlation with higher number of nematodes.

The cultivar Pisang Jari Buaya, considered as resistant to *R. similis*, did not behave in such a way. This cultivar allowed reproduction of all populations of *R. similis* in this study (Table 4). The populations PE, CR, BA<sub>2</sub> and BA<sub>1</sub> expressed higher aggressiveness towards root weight, and except for CR, these populations greatly reduced plant height. Mostly, there was a negative correlation between values of root weight and numbers of nematodes per gram of roots. Except for the populations CR and PE, lowest values of root weight matched with higher numbers of nematodes. For the populations SP<sub>1</sub>, MG<sub>1</sub>, MG<sub>2</sub>, CUB and SC, higher numbers of nematodes per gram of roots were associated with higher values of root

**Table 4** - Variables evaluated 120 days after inoculation of three banana cultivars with 100 nematodes of 12 populations of *Radopholus similis* [Pernambuco (PE), Bahia (BA<sub>1</sub> e BA<sub>2</sub>), Minas Gerais (MG<sub>1</sub> e MG<sub>2</sub>), Rio de Janeiro (RJ), São Paulo (SP<sub>1</sub> e SP<sub>2</sub>), Santa Catarina (SC), Cuba (CUB), Costa Rica (CR) and Australia (AUS)], under growth chamber conditions. Control = plants non inoculated, N/G = nematodes per g root, RF = reproduction factor, PH = plant height, RW = root weight.

Populations	Grand Naine				Yangambi km 5				Pisang Jari Buaya			
	N/G	RF	PH (cm)	RW (g)	N/G	RF	PH (cm)	RW (g)	N/G	RF	PH (cm)	RW (g)
Control	-	-	23.0 a	19.7 a	-	-	31.7 a	25.2 a	-	-	31.0 a	15.6 a
SP <sub>1</sub>	360 bc	48.5 b	19.2 bc	8.4 bc	69 bcd	9.0 bc	29.2 ab	12.7 bc	905 a	73.5 a	26.7 b	7.8 bcd
SP <sub>2</sub>	457 bc	48.0 b	19.6 ab	8.1 bcd	764 a	24.0ab	26.2 bc	3.1 g	48 bcd	13.3 b	26.0 b	8.7 bcd
SC	287 c	47.7 b	19.0 bcd	8.6 bc	8 d	1.5 c	26.2 bc	9.2 cdef	444 a	45.0 ab	25.7 b	10.6 abc
RJ	285 c	49.0 b	18.8 bcd	8.1 bcd	74 bcd	11.2 b	25.9 bc	15.2 b	28 d	10.4 b	25.5 bc	11.1 ab
AUS	317 c	32.7 b	18.6 bcd	8.9 b	313 a	29.5 ab	25.2 cd	9.4 cde	39 cd	12.0 b	25.2 bc	10.1 bcd
CR	337 bc	48.0 b	17.8 bcd	6.7 bcd	39 cd	3.7 c	25.7 bc	9.6 cde	749 a	44.2 ab	25.2 bc	5.2 de
CUB	1256 abc	65.0 ab	16.5 bcde	4.7 bcde	551 ab	15.0 b	25.2 cd	2.5 g	387 ab	37.8 ab	25.1 bcd	9.7 bcd
MG <sub>2</sub>	965 abc	42.6 b	16.0 bcde	3.7 cde	26 cd	6.0 bc	25.2 cd	10.0 cd	295 abc	30.7 b	24.5 bcd	8.8 bcd
MG <sub>1</sub>	1,137 abc	63.0 ab	15.8 cde	5.4 bcde	453 ab	15.0 b	24.2 cd	3.0 g	548 a	39.0 ab	24.2 bcd	8.0 bcd
PE	3,207 a	53.5 b	15.8 cde	1.1 e	680 a	38.0 a	23.7 cd	5.6 defg	716 a	19.5 b	22.0 cde	2.0 e
BA <sub>1</sub>	1,224 abc	44.2 b	15.3 de	3.2 de	210 abc	10.0 b	23.2 cd	4.8 efg	311 abc	18.0 b	20.5 e	5.8 cde
BA <sub>2</sub>	2,780 ab	98.5 a	15.0 e	3.1 de	945 a	39.7 a	22.0 d	4.1 fg	356 ab	22.5 b	19.5 e	5.7 cde
CV (%)	15.7	17.8	6.9	17.4	15.7	17.8	6.9	17.4	15.7	17.8	6.9	17.4

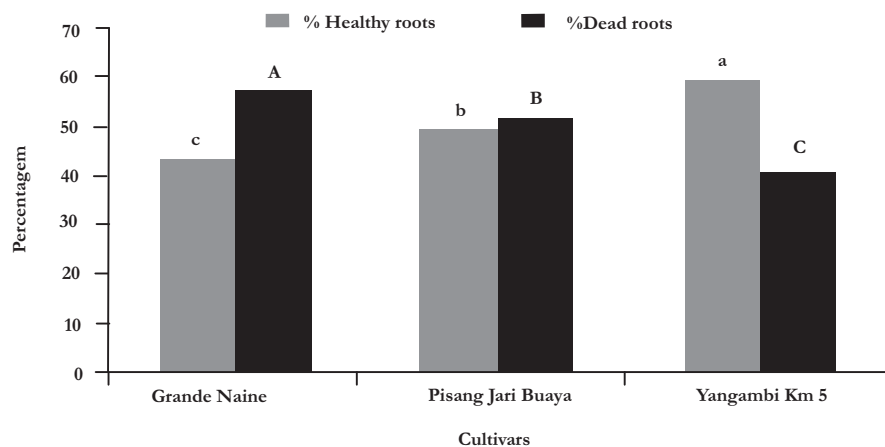
Means of four replications, means followed by the same letter in the column did not differ by Tukey's test ( $P \leq 0.05$ ), original data were converted into  $\log(x + 1)$ .

weight, especially in plants inoculated with SP<sub>1</sub>. Regardless of the nematode population, the numbers of *R. similis* on Pisang Jari Buaya were higher than on Yangambi km 5, and lower than on Grand Naine.

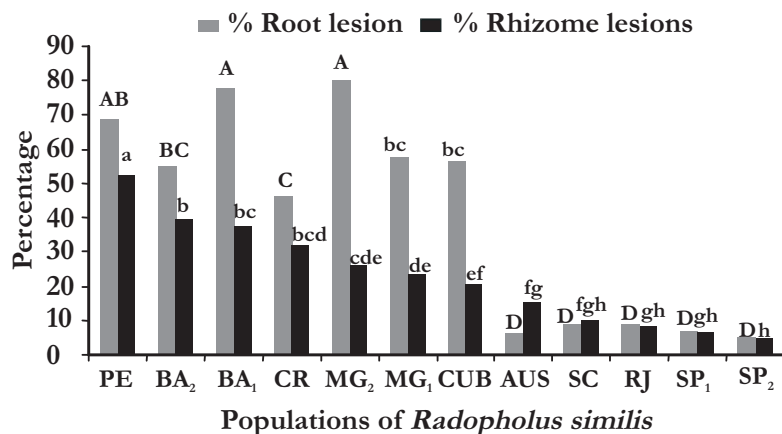
The differences between cultivars with respect to percentage of healthy and dead roots confirm Grand Naine as the most susceptible to *R. similis*, with higher percentage of dead roots as compared with Yangambi km 5, whereas Pisang Jari Buaya remained in an intermediary position (Figure 2). In addition, regardless of banana genotype, according to Tukey's test ( $P \leq 0.05$ ), the percentage of necrotic area in banana roots, the populations MG<sub>2</sub>, BA<sub>1</sub> and PE were the most aggressive, followed by CUB, MG<sub>1</sub>, BA<sub>2</sub> and CR (Figure 3), whereas AUS, SC, RJ, SP<sub>1</sub>, and SP<sub>2</sub>

were responsible for lower percentages of root necrotics. For the percentage of necrotic area on the rhizome surface, PE was the most damaging population, followed by BA<sub>2</sub>, BA<sub>1</sub>, CR, MG<sub>2</sub>, MG<sub>1</sub> and CUB. The rhizomes were less affected by SP<sub>2</sub>, SP<sub>1</sub>, RJ, SC and AUS populations (Figure 3 and 4).

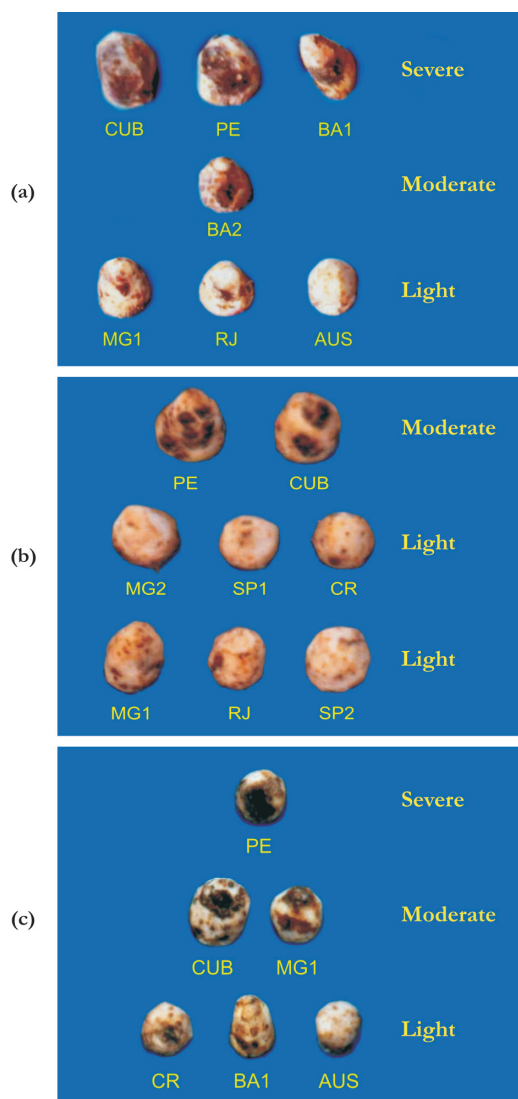
**Genetic variability *Radopholus similis* based on RAPD markers.** A total of 341 markers were obtained, with 314 (92 %) polymorphic and 27 (8 %) monomorphic. The average number of observed markers per primer was 18.9. The shortest genetic distance (0.219) was obtained between the two *R. similis* populations from Bahia (BA<sub>1</sub> and BA<sub>2</sub>) and between those from Pernambuco and Costa Rica. The largest distance between populations of *R. similis*



**Figure 2** - Percentages of healthy and dead roots in three banana genotypes by 12 populations of *Radopholus similis*, 120 days after inoculation with 100 nematodes per plant, under growth chamber conditions.



**Figure 3** - Percentages of necrotic area in roots and in rhizomes of plants of banana 'Grand Naine', 'Pisang Jari Buaya' and 'Yangambi km 5' by 12 populations of *Radopholus similis* [Pernambuco (PE), Bahia (BA<sub>1</sub> e BA<sub>2</sub>) Minas Gerais (MG<sub>1</sub> e MG<sub>2</sub>), Rio de Janeiro (RJ), São Paulo (SP<sub>1</sub> e SP<sub>2</sub>), Santa Catarina (SC), Cuba (CUB), Costa Rica (CR) and Australia (AUS)], 120 days after inoculation with 100 nematodes per plant, under growth chamber conditions.



**Figure 4** - Rhizome necrosis caused by 12 populations of *Radopholus similis* [Pernambuco(PE), Bahia (BA<sub>1</sub> e BA<sub>2</sub>), Minas Gerais (MG<sub>1</sub> e MG<sub>2</sub>), Rio de Janeiro (RJ), São Paulo (SP<sub>1</sub> e SP<sub>2</sub>), Santa Catarina (SC), Cuba (CUB), Costa Rica (CR) and Australia (AUS)], 120 days after inoculation of 100 nematodes per banana plant, under growth chamber conditions: **(a)** Grand Naïne, **(b)** Yangambi km 5, **(c)** Pisang Jari Buaya.

(0.404) was obtained between those from Costa Rica and Minas Gerais (MG<sub>1</sub>) (Table 5).

Cluster analysis enabled the separation between *R. similis* and the outgroup *S. bradys* populations (Figure 5). The 12 populations of *R. similis* were divided into 5 groups at a relative genetic distance of 0.45. The three foreign populations and the one from Pernambuco were clustered in the first group; both populations from Bahia (BA<sub>1</sub> and BA<sub>2</sub>), one from Minas Gerais (MG<sub>2</sub>), and the one from Rio de Janeiro (RJ) were clustered in a second group; the third group was

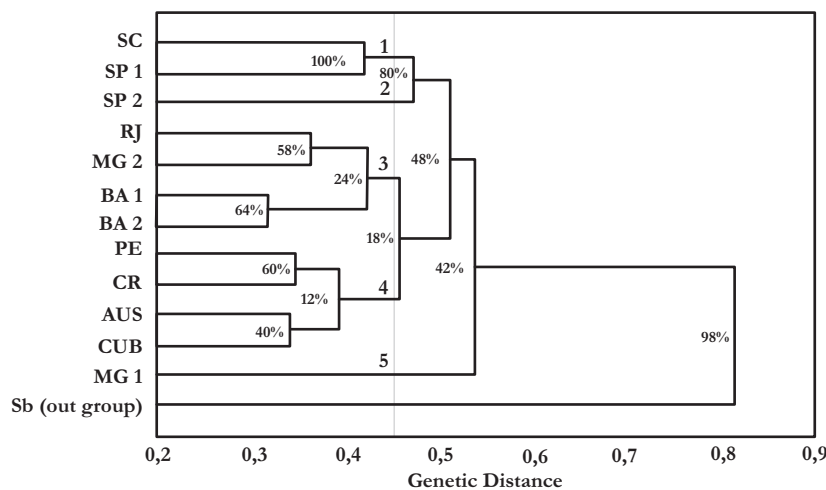
formed by Santa Catarina (SC) and São Paulo (SP<sub>1</sub>) populations, closely related to SP<sub>2</sub>, whereas MG<sub>1</sub> populations did not cluster with any other populations. Repeatability (%) of clustering above 50 % for 1,000 bootstrap cycles occurred in only four groups [SC, SP<sub>1</sub> and SP<sub>2</sub> (80 %); RJ and MG<sub>2</sub> (58 %); BA<sub>1</sub> and BA<sub>2</sub> (64 %); PE and CR (60 %)], revealing that such clusters are the most consistent (Figure 5).

## Discussion

Present results show remarkable differences

**Table 5** - Distance matrix between 12 populations of *Radopholus similis* [Pernambuco (PE), Bahia (BA1 e BA2), Minas Gerais (MG1 e MG2), Rio de Janeiro (RJ), São Paulo (SP1 e SP2), Santa Catarina (SC), Cuba (CUB), Costa Rica (CR) and Australia (AUS)] and one population of *Scutellonema bradys* (Sb), calculated using the Nei & Li (1979) coefficient based on 341 RAPD markers.

Populations	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1 SC	0												
2 SP 1	0.269	0											
3 SP 2	0.321	0.313	0										
4 RJ	0.339	0.283	0.282	0									
5 MG 1	0.379	0.290	0.382	0.318	0								
6 MG 2	0.358	0.333	0.304	0.245	0.340	0							
7 BA 1	0.336	0.367	0.324	0.311	0.349	0.242	0						
8 BA 2	0.304	0.341	0.312	0.297	0.349	0.274	0.219	0					
9 PE	0.331	0.279	0.336	0.292	0.289	0.278	0.301	0.273	0				
10 CR	0.352	0.314	0.387	0.291	0.404	0.272	0.308	0.315	0.219	0			
11 AUS	0.382	0.326	0.383	0.286	0.367	0.252	0.331	0.347	0.291	0.252	0		
12 CUB	0.365	0.273	0.357	0.294	0.348	0.285	0.331	0.331	0.271	0.248	0.232	0	
13 Sb	0.481	0.453	0.471	0.447	0.532	0.438	0.460	0.452	0.445	0.409	0.452	0.425	0



**Figure 5** - UPGMA derived dendrogram for 341 RAPD markers from 12 populations of *Radopholus similis* [Pernambuco (PE), Bahia (BA<sub>1</sub> e BA<sub>2</sub>), Minas Gerais (MG<sub>1</sub> e MG<sub>2</sub>), Rio de Janeiro (RJ), São Paulo (SP<sub>1</sub> e SP<sub>2</sub>), Santa Catarina (SC), Cuba (CUB), Costa Rica (CR) and Australia (AUS)] and one of *Scutellonema bradys* (Sb). Genetic distances were calculated using the Nei & Li (1979) coefficient.

between *R. similis* populations in relation to capacity for reproduction and level of damage towards the three banana genotypes. Among the variables evaluated, the highest level of significance was observed for reduction in root weight, which indicates this variable as the most reliable to evaluate degrees of aggressiveness between populations of *R. similis* on banana plants. Population density has been demonstrated as a suitable variable for determining relations between reduction in plant growth and nematode aggressiveness (Sarah *et al.*, 1993; Fallas &

Marbán-Mendoza, 1994; Hahn *et al.*, 1996). In this study, 120 days after nematode inoculation, there were some cases where severe damage on banana plants did not correlated with high nematode densities, which can be explained by population dynamics. Costa *et al.* (2003) observed that the Cuban population of *R. similis* reached a high population density in 'Grand Naine' banana roots 60 days after inoculation, whereas the Brazilian and the Costa Rican populations of the nematode reached equivalent levels, 90 and 120 days after inoculation, respectively. Similar results, with the

same Cuban population (Villa Clara) used in this study, were obtained on carrot tissue culture by Stoffelen *et al.* (1999) over an eight week period of evaluation. This Cuban population reached high levels of nematode density four weeks before two other *R. similis* populations reached equivalent levels. This information confirms that faster growing populations initiate greater damage earlier than slow growing populations. Generally there was a positive correlation between final nematode density and reduction in plant growth and root weight. Decreases in plant height and root weight, and higher percentages of roots and rhizome necrosis were attributed to higher nematode densities per gram of roots, mainly in the cultivars Grand Naine and Yangambi km 5.

In this work, differences in aggressiveness were significant between nematode populations. The population from Costa Rica, with intermediate aggressiveness on Grand Naine, was responsible for a significant decrease in plant height and root weight in Pisang Jari Buaya. Similarly, the population from São Paulo (SP<sub>2</sub>), with low aggressiveness on Grande Naine, reduced drastically root weight on Yangambi km 5. The partially resistant reaction of Yangambi km 5 to *R. similis* reported in previous studies (Fallas & Marbán-Mendoza, 1994; Fogain & Gowen, 1998) was confirmed for some *R. similis* populations. Only minor plant damage was attributed to the populations from Rio de Janeiro, São Paulo (SP<sub>1</sub>), Minas Gerais (MG<sub>2</sub>), Costa Rica, Australia, and Santa Catarina on this cultivar. These results indicate that Yangambi km 5, although allowing fast multiplication of some populations of *R. similis*, leading to severe plant damages, is able to reduce reproduction in other populations to levels such that they are unable to cause significant damage. Another point to consider is that although there were roots and rhizome necrosis, they were of moderate extension, indicating that these variables are not suitable for resistance evaluation under field conditions. The results presented showed that the levels of damage due to *R. similis* on banana plants, depend not only on the size of nematode population, but also on the nematodes capacity to elicit defense reactions.

Costa *et al.* (1998) observed that Pisang Jari Buaya behaved as susceptible to BA<sub>1</sub> population. The present

results also confirm Pisang Jari Buaya as susceptible to *R. similis*, comparably to Grand Naine. Similar results were reported by Elbadri (2000) in relation to five populations of *R. similis* on Pisang Jari Buaya. Differences in the levels of resistance observed in propagative materials of Pisang Jari Buaya multiplied from tissue culture, suggest that these differences are due to somaclonal variations and to environmental influences. Banana 'FHIA-3' plants were less susceptible to *R. similis* when produced from culture tissue. In contrast, FHIA-1, FHIA-18 and FHIA-23 became more susceptible when propagated from tissue culture (Viaene *et al.*, 1998). The susceptibility of Pisang Jari Buaya observed in this work may be attributed to the fact that the plants used in this experiment came from a tissue culture selection, such as that obtained by Nguyet (1999) in Costa Rica, when the author selected the clone Pisang Jari Buaya ITC-312, susceptible to *R. similis*, from the same origin as Pisang Jari Buaya III-116 resistant to *R. similis* in Honduras (Pinochet & Rowe, 1979).

The different levels of aggressiveness observed between *R. similis* populations from Cuba, Costa Rica and Australia in this work were consistent with the findings by Fallas *et al.* (1995) and by Elbadri (2000) with the same populations on Grand Naine. The distinction between the Brazilian populations with different levels of aggressiveness did not reflect the pathogenic variability of *R. similis* in the geographic regions represented in this work, since the populations in this study did not represent the entire area of banana production in the country. More detailed studies on different *R. similis* populations are needed for a better understanding of the nematode behavior across the country. More aggressive populations collected in the states of Bahia, Pernambuco and Minas Gerais, justify high population densities in banana plantations, and yield losses up to 100 % in such localities. The twelve populations of *R. similis* in this study failed to reproduce on *Citrus latifolia* (data not shown), what make to believe that all populations evaluated belong to the banana race of the burrowing nematode.

The genetic similarity encountered in this work with respect to the foreign populations are in agreement with the results obtained by Fallas *et*



al.(1996) and by Elbadri (2002), considering RAPD and RFLP analyses of the populations from Australia (Queensland), Cuba (Villa Clara) and Costa Rica (Talamanca).

Present results demonstrated to certain point correlation between genetic distance and pathogenicity of *R. similis* populations on bananas, since the populations with low reproductive capacity and low aggressiveness on the three banana cultivars evaluated, clustered in the same similarity group, for example SC and SP<sub>1</sub> populations. Other cluster groups included populations of greater aggressiveness, such as Bahia (BA<sub>1</sub> and BA<sub>2</sub>) and Minas Gerais (MG<sub>2</sub>) and the populations from Pernambuco, Costa Rica and Cuba. By contrast, the populations from Rio de Janeiro and Australia, of low aggressiveness, demonstrated short genetic distances compared to more aggressive populations, such as the ones from Bahia (Ba<sub>1</sub> and BA<sub>2</sub>), Minas Gerais (MG<sub>2</sub>), Pernambuco, Cuba and Costa Rica. These results are in agreement with those by Fallas *et al.* (1996), which clustered in the same group populations of *R. similis* with different levels of aggressiveness on bananas. Additionally, Elbadri *et al.* (2002) observed that populations of *R. similis* with low capacity of reproduction on Grand Naine grouped in the same cluster based on RFLP analysis. Kaplan *et al.* (1996) reported the presence of RAPD bands associated with parasitism of some *R. similis* populations on citrus plants in Florida.

With the exception of the populations from Bahia (BA<sub>1</sub> e BA<sub>2</sub>), an interesting fact was the absence of correlation between geographic proximity and genetic similarity. For example, PE population was genetically closer to the foreign populations compared with other Brazilian populations. Another example was the greater genetic distance between the populations from Minas Gerais. Similar results were reported by Hahn *et al.* (1994) based on RAPD markers that distinguished one genetically different population of *R. similis* from two other populations, although these three populations had been collected from tea plants in Sri Lanka. The fact that MG<sub>1</sub> and MG<sub>2</sub> populations, with different molecular phenotypes, were collected in banana plantations in Minas Gerais, confirms the possibility of occurrence of genetic variability of the pathogen in a same agricultural region. The genetic

divergence of the MG<sub>1</sub> population to the other *R. similis* populations can be hypothesized as reflecting the level of pathogenicity and / or host range. Nematode populations that differ in molecular markers, host range and on this basis of morphology, can be interpreted as races, physiological races, biotypes and pathotypes (Du Charme & Birchfield, 1956; Pinochet, 1979; Gnanapragasan *et al.*, 1991). Therefore, studies on the virulence in different hosts would be important to complement the characterization of MG<sub>1</sub> population.

Amphimitic reproduction is important to the diversity of natural populations. DNA polymorphism within nematode species has been frequently detected, and polymorphic DNA bands can be related to parasitism capacity or to biochemical differences (Huettel *et al.*, 1983a;b), however, it seems more probable that dissemination at long and short distances of *R. similis* in propagative material contributes for the apparent similarity, since there is evidence that worldwide dispersion of *R. similis* is relatively recent (early 19<sup>th</sup> Century) (Gowen & Quénehervé, 1990). Therefore, knowledge on the geographic origin can contribute to the understanding of the relationship between genetic similarity and dissemination of nematodes through propagative material. Although only one population from Santa Catarina State was evaluated, the genetic proximity of this population with those from São Paulo supports the hypothesis of the dissemination of *R. similis* from the State of São Paulo through infected plantlets to Santa Catarina and other states. With the expansion of the banana growing area along the irrigated valley of the São Francisco river, trading of banana planting materials, without adequate observation of their origin and sanitary conditions, has contributed to the dissemination of *R. similis* to regions with different types of soils and climatic conditions. The genetic proximity of MG<sub>2</sub>, RJ, BA<sub>1</sub> and BA<sub>2</sub> populations may possibly be justified by the intense flow of planting materials from the State of Rio de Janeiro to the regions of Janaúba (northern Minas Gerais) and Bom Jesus da Lapa (western Bahia).

The genetic variability observed among the Brazilian populations indicates this may be the result of more than one introduction of *R. similis* in Brazil.

Historically, according to Zem (1982), *R. similis* was probably introduced into Brazil through imported plantlets from Central America, or from Africa to the coast of the State of São Paulo, from where it quickly disseminated to the State of Rio de Janeiro. Its occurrence in other regions of the country could be mostly limited to collections of banana cultivars introduced for research in experimental areas of several research centers (Sharma, 1974). Kaplan *et al.* (1996) commented that the variability of *R. similis* can be greater in Africa than in Hawaii, Florida and Central America. According to Fallas *et al.* (1996) greater genetic variability and aggressiveness occur among African populations. These reports strongly support the hypothesis proposed by Zem (1982) considering that the introduction of *R. similis* into Brazil occurred through propagative material from Africa, which consequently resulted in greater genetic variability and aggressiveness among the Brazilian populations of the burrowing nematode as demonstrated in this study.

#### Literature Cited

- ALLEN, L.S., S. DEZHI, T. S. HARRIS & O.P. THOMAS. 1997. Identification of cyst nematodes of agronomic and regulatory concern with PCR-RFLP of ITS1. *Journal of Nematology* 29: 255-267.
- BLACKE, M.C., N.M. DUREAU, G.J. PUTERKA, J.R. NECHOLS & J.M. PETTORINI. 1992. Use of the random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) to detect DNA polymorphisms in aphids (Homoptera:Aphididae). *Bulletin of Entomological Research* 82: 151-159.
- BLAXTER, M.L., P. DE LEY, J.R.R. GAREY, L.X. LIU, P. SCHELDAMAN, A. VIERSTRAETE, R.J. VANFLETERN, L.Y. MACKEY, M. DORRIS, L.M. FRISSE, J.T. VIDA & W.K. THOMAS, 1998. A molecular evolutionary framework for the Phylum Nematoda. *Nature* 392: 71-75.
- BRIDGE, J. 1988. Plant nematode pests of banana in East Africa with particular reference to Tanzania. Nematodes and the borer weevil in bananas: present status of research and outlook. Proceedings of a Workshop Held in Bujumbura, INIBAP. Anais, INIBAP, p. 35-39.
- CARVALHO, J.C. 1959. O nematóide cavernícola e seu aparecimento em São Paulo. *Biológico*, 25: 195-198.
- COOLEN, W.A. & C.J. D'HERDE. 1972. A Method for the Quantitative Extraction of Nematodes from Plant Tissue. State Agriculture Research Centre, Merelbeke (Belgium).
- COSTA D.C., S. de O. e SILVA & F.R. ALVES. 1998. Reação de genótipos de bananeira (*Musa* sp.) a *Radopholus similis* e *Meloidogyne incognita*. *Nematologia Brasileira* 22: 49-56.
- COSTA, D.C., J.E. CARES, A.C. GOMES & R.D. SHARMA. 2003. Variabilidade da reprodução de *Radopholus similis* em bananeira cv. Grande Naine (AAA). *Nematologia Brasileira* 27: 251-252.
- CRUZ, C.D. 1997. Programa Genes: aplicativo computacional em genética e estatística. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa MG, 442 p.
- DU CHARME, E.P. & W. BIRCHFIELD. 1956. Physiologic races of the burrowing nematode. *Phytopathology* 46: 615-616.
- ELBADRI, G.A. 2000. Diversity of *Radopholus similis* (Cobb, 1893) (Nematoda: Tylenchida). Faculty of Sciences-University of Gent, 146 p.
- ELBADRI, G.A., P. DE LEY, L. WAEYENBERGE, A. VIERSTRAETE, M. MOENS & J. VANFLETEREN. 2002. Intraspecific variation in *Radopholus similis* isolates assessed with restriction fragment length polymorphism and DNA sequencing of the internal transcribed spacer region of the ribosomal RNA cistron. *International Journal for Parasitology* 32: 199-205.
- ELSEN, A., R. STOFFELEN, N.T. TUYET, H. BAIMEY, H.D. BOULOIS & D. DE WAELE. 2002. In vitro screening for resistance to *Radopholus similis* in *Musa* spp. *Plant Science* 163: 407-416.
- FALLAS, G.A. & J.L. SARAH. 1994. Efecto de la temperatura de almacenamiento sobre la reproducción in vitro de *Radopholus similis*. *Nematropica* 24: 175-177.
- FALLAS, G.A., J.L. SARAH & M. FARGETTE. 1995. Reproductive fitness and pathogenicity of eight *Radopholus similis* isolates on banana plants (*Musa* AAA, cv. Poyo). *Nematropica* 25: 135-141.
- FALLAS, G.A., M.L. HAHN, M. FARGETTE, P.R. BURROWS & J.L. SARAH. 1996. Molecular and biochemical diversity among isolates of *Radopholus spp.* from different areas of the world. *Journal of Nematology* 28: 422-430.
- FALLAS, G.A. & N. MARBÁN-MENDOZA. 1994. Respuesta de tres cultivares y um híbrido de *Musa* a *Radopholus similis* em Costa Rica. *Nematropica* 24: 161-177.
- FAO. 2007. FAOSTAT <<http://apps.fao.org>> acesso em 26 de março de 2007.
- FOGAIN, R. & S. R. GOWEN. 1998. "Yangambi km 5" (*Musa* AAA, Iboya subgroup): a possible source of resistance to *R. similis* and *Pratylenchus goodeyi*. *Fundamental and Applied Nematology* 21: 75-80.
- GNANAPRAGASAN, N.C., A.K. PREMATUNGA & U.B. HERATH. 1991. Preliminary survey for alternative hosts of the burrowing nematode *Radopholus similis* in the tea areas of Sri Lanka. Afro-Asian. *Journal of Nematology* 1: 114-115.
- GOWEN, S. & P. QUÉNÉHERVÉ. 1990. Nematodes parasites of bananas, plantains and abaca. In: LUC, M., R.A. SIKORA AND J. BRIDGE (ed). *Plant Parasitic Nematodes in Subtropical & Tropical Agriculture*. CAB International, Wallingford, p. 431-460.
- HAHN, M.L., P.R. BURROWS, N.C. GNANAPRAGASAM,

- J. BRIDGE, N.J. VINES & D.J. WRIGHT. 1994. Molecular diversity amongst *Radopholus similis* populations from Sri Lanka detected by RAPD analysis. *Fundamental and Applied Nematology* 17: 275-281.
- HAHN, M.L., J.L. SARAH, M. BOISSEAU, N.J. VINES, J. BRIDGE, D.J. WRIGHT & P.R. BURROWS. 1996. Reproductive fitness and pathogenic potential of selected *Radopholus* populations on two banana cultivars. *Plant Pathology* 45: 223-231.
- HANDOO, Z.A., A.P. NYCZEPIR, D. ESMENJAUD, J.G. VAN DER BEEK, P. CASTAGNONE-SERENO, L.K. CARTA, A.M. SKANTAR & J.A. HIGGINS. 2004. Morphological, molecular and differential-host characterization of *Meloidogyne floridensis* n. sp. (Nematoda: Meloidogynidae), a root-knot nematode parasitizing peach in Florida. *Journal of Nematology* 36: 20-35.
- HANDOO, Z.A., L.K. CARTA, A.M. SKANTAR, W. YE, R.T. ROBBINS, S.A. SUBBOTIN, S.W. FRAEDRICH & M.M. CRAM. 2005. Morphological and molecular characterization of *Longidorus americanum* n. sp. (Nematode: Longidoridae), a needle nematode parasitizing pine in Georgia. *Journal of Nematology* 37: 94-104.
- HUETTEL, R.N. & D.W. DICKSON. 1981. Karyology and oogenesis of *Radopholus similis* (Cobb) Thorne. *Journal of Nematology* 13: 16-20.
- HUETTEL, R.N., D.W. DICKSON & D.T. KAPLAN. 1982. Sex attraction and behaviour in two races of *Radopholus similis*. *Nematologica* 28: 360-369.
- HUETTEL, R.N., D.W. DICKSON & D.T. KAPLAN. 1983a. Biochemical identification of the two races of *Radopholus similis* by polycrylamide gel electrophoresis. *Journal of Nematology* 15: 345-348.
- HUETTEL, R.N., D.W. DICKSON & D.T. KAPLAN. 1983b. Biochemical identification of two races of *Radopholus similis* by starch gel electrophoresis. *Journal of Nematology* 15: 338-344.
- HUETTEL, R.N., D.W. DICKSON & D.T. KAPLAN. 1984a. Chromosome number of populations of *Radopholus similis* from North Central and South America, Hawaii and Indonesia. *Revue de Nematologie* 7: 113-116.
- HUETTEL, R.N., D.W. DICKSON & D.T. KAPLAN. 1984b. *Radopholus citrophilus* n. sp., a sibling species of *Radopholus similis*. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington* 51: 32-35.
- JAEHN, A. 1993. Controle de *Radopholus similis* em bananeira cv. Nanicão através de nematicidas In: Palestras Encontro de Bananicultores de Registro, 3Q, Registro SP, p. 21.
- JENKINS, W. R. 1964. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. *Plant Disease Reporter* 48: 692.
- KAPLAN, D.T. & T.R. GOTTFELD. 1992. Lectin binding of *Radopholus citrophilus* and *R. similis* proteins. *Journal of Nematology* 24: 281-288.
- KAPLAN, D.T., M.C. VANDERSPOOL, C. GARRETT, S. CHANG & C.H. OPPERMAN. 1996. Molecular polymorphisms associated with host range in the highly conserved genomes of burrowing nematodes, *Radopholus* spp. *Molecular and Plant Microbe Interactions* 9: 32-38.
- LIMA, R.D. & A.C.P. GOULART. 1986. Nota sobre a ocorrência de *Radopholus similis* em Minas Gerais. *Nematologia Brasileira* 10: 29-30.
- NEI, M. & W. H. LI. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 5269-5273.
- NGUYET, D.T.M. 1999. In Vivo and In Vitro Studies of *Radopholus similis* and *Pratylenchus coffeae* Associated with Banana. University of Gent - Faculty of Science, 130 p. (International Nematology Course).
- O'BANNON, J.H. & A.L. TAYLOR. 1968. Migratory endoparasitic nematodes reared on carrot discs. *Phytopathology* 58: 385.
- PINOCHET, J. 1979. Comparison of four isolates of *Radopholus similis* from Central America no Vallery banana. *Nematropica* 9: 40-43.
- PINOCHET, J. & P. ROWE. 1979. Progress in breeding for resistance to *Radopholus similis* on bananas. *Nematropica* 16: 76-78.
- SAMBROOK, J., E.F. FRITSCH & T. MANIATIS. 1989. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. 2 ed. Cold Spring Harbor Laboratory, 101 p.
- SARAH, J.L., C. SABATINI & M. BOISSEAU. 1993. Differences in pathogenicity to banana (*Musa* sp., cv. Poyo) among isolates of *Radopholus similis* from different production areas of the world. *Nematropica* 23: 74-79.
- SHARMA, R.D. 1974. Nematóide cavernícola atacando bananeira na Bahia. *Cacau Atualidades* 11: 4-6.
- SHER, S.A. 1968. Revision of the genus *Radopholus* Thorne, 1949 (Nematoda: Tylenchida). *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, Lawrence, 35: 219-237.
- SIDDIQI, M. R. 1996. *Tylenchida Parasites of Plants and Insects*. CAB, London, 645 p.
- SPEIJER, P.R. & D. DE WAELE. 1997. Screening of *Musa* germplasm for resistance and tolerance to nematodes. *Inibap Technical Guidelines* 1: 47.
- SPERANDIO, C.A. & A.R. MONTEIRO. 1993. Novos registros de nematóides da superfamília *Tylenchoidea* no Rio Grande do Sul. *Nematologia Brasileira* 17: 28-29.
- STATSOFT. 1999. *STATISTICA for Windows* (Computer program manual). StatSoft, Inc., Tulsa (OK) EUA.
- STOFFELEN, R., M.L. JIMENEZ, C. DIERCKXSENS, V.T.T. TAM, R. SWENNEM & D. DE WAELE. 1999. Effect of time and inoculum on the reproductive fitness of *Pratylenchus coffeae* and *Radopholus similis* populations on carrot disc. *Nematology* 1: 243-250.
- SUBBOTIN, S.A., L. WAEYENBERGE, I.A. MOLOKANOVA & M. MOENS. 1999. Identification of *Heterodera avenae* group species by morphometrics and rDNA-RFLPs. *Nematology* 1: 195-207.
- THIÈRY, M., D. FOUVILLE & D. MUGNIÉRY. 1997. Intra

- and interspecific variability in *Globodera*, parasites of *Solanaceous* plants, revealed by random amplified polymorphic DNA (RAPD) and correlation with biological features. *Fundamental and Applied Nematology* 20: 495-504.
- VIAENE, N., J. DUEÑAS & D. DE WAELE. 1998. Screening for resistance and tolerance to *Radopholus similis* and *Pratylenchus coffeae* in banana and plantain. *Nematologica* 44: 599- 600.
- WEHUNT, E.J., D.J. HUTCHINSON, D.J. EDWARDS. 1978 Reaction of banana cultivars to the burrowing nematode (*Radopholus similis*). *Journal of Nematology*, 10: 368-370.
- WISHART, J., M.S. PHILLIPS & V.C. BLOK. 2002. Ribosomal intergenic spacer: a polymerase chain reaction diagnostic for *Meloidogyne chitwoodi*, *M. fallax* and *M. hapla*. *Nematology* 92: 884- 892.
- YAP, I. V. & NELSON, R.J. 1996. Winboot: a program for perform bootstrap analysis of binary data to determine the confidence limits of UPGMA based dendrograms. IRRI, Manila, 22 p.
- ZEM, A.C. 1982. Problemas nematológicos em bananeiras no Brasil (*Musa* spp.). (Tese de Doutorado). Universidade de São Paulo - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba SP, 140 p.
- ZEM, A.C. & L.G.E. LORDELLO. 1983. Distribuição geográfica de *Radopholus similis* no Brasil. *Sociedade Brasileira de Nematologia* 7: 209-214.

## Influência da Dose de Juvenis Infectantes e da Massa de Larvas de *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) na Produção *in Vivo* de *Heterorhabditis baujardi* LPP7 (Rhabditida: Heterorhabditidae)

Paulo V.C. Dias, Claudia Dolinski\* & Juan P. Molina A.

LEF / CCTA / Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Av. Alberto Lamego 2000, 28015-620  
Campos dos Goytacazes (RJ) Brasil.

\*Autora para correspondência: Claudia.dolinski@censanet.com.br

Recebido para publicação em 07 / 01 / 2008. Aceito em 11 / 04 / 2008

Editado por Luiz Carlos Ferraz

**Resumo** – Dias, P.V.C., C. Dolinski & J.P. Molina A. 2008. Influência da dose de juvenis infectantes e da massa de larvas de *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) na produção *in vivo* de *Heterorhabditis baujardi* LPP7 (Rhabditida: Heterorhabditidae).

*Heterorhabditis baujardi* LPP7 é um nematóide entomopatogênico (NEP) com parâmetros biológicos específicos que precisam ser bem conhecidos e estabelecidos para que possa ter a sua produção em larga escala *in vivo* incrementada. Neste trabalho, avaliaram-se as influências da dose de juvenis infectantes (JIs) e da massa de larvas de *Galleria mellonella* na produção *in vivo* de *Heterorhabditis baujardi* LPP7. No primeiro bioensaio, foram aplicadas diferentes doses de JIs (10, 100, 300 e 3.000) do nematóide e selecionada aquela que concorreu à produção de maior número de JIs / ml. No segundo bioensaio, 200 JIs / ml foram aplicados a larvas de *G. mellonella* com diferentes massas (150, 200 e 300 mg) e também computada a produção de JIs / ml. No primeiro bioensaio, as maiores produções de JIs / ml foram obtidas com as doses intermediárias testadas, de 100 e 300 JIs. No segundo bioensaio, a produção sobre larvas de 200 mg foi maior do que nas demais massas. Assim, a produção de JIs de *H. baujardi* LPP7 mostrou-se dependente da dose do nematóide e da massa das larvas do inseto utilizados, parâmetros que devem ser considerados na produção *in vivo*, em larga escala, desse NEP.

**Palavras-chaves:** competição intra-específica, inseto hospedeiro, controle biológico, produção de juvenis infectantes.

**Summary** - Dias, P.V.C., C. Dolinski & J.P. Molina A. 2008. Influence of infective juvenile doses and *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae weight in the *in vivo* production of *Heterorhabditis baujardi* LPP7 (Rhabditida: Heterorhabditidae).

*Heterorhabditis baujardi* LPP7 is an entomopathogenic nematode (EPN) with specific biological requirements, which should be known in order to improve its *in vivo* mass production. This work dealt with the influence of the nematode infective juvenile dose (IJs) and the weight of *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae on the *in vivo* production of *H. baujardi* LPP7, as expressed in IJs / ml. In the first (of two) bioassay, different doses of IJs were applied (10; 100; 300 or 3,000) to provide the dose that yielded the highest production of IJs / ml. In the second bioassay, 200 IJs were applied on *G. mellonella* larvae with different weights (150, 200 and 300 mg). In the first bioassay, the intermediate doses of 100 and 300 IJs yielded the highest production values. In the second bioassay, the highest production values were obtained when larvae with 200 mg were infected. We concluded that *H. baujardi* LPP7 *in vivo* mass production is dependant on the nematode (IJs) initial dose and the insect-host weight and, therefore, these parameters should be adequately considered when such production is intended.

**Key words:** intra-specific competition, insect host, biological control, infective nematode yields.

## Conteúdo

Nematóides entomopatogênicos (NEPs) das famílias Heterorhabditidae e Steinernematidae têm sido encontrados em diversas regiões do mundo (Adams & Nguyen, 2002). Estes nematóides possuem atributos que os fazem agentes controladores de pragas de sucesso: **i)** infectam seletivamente grande diversidade de insetos, sem causar danos às plantas e aos outros animais, inclusive ao homem (Akhurst & Smith, 2002); **ii)** provocam morte rápida dos insetos-pragas que lhes servem de hospedeiros (24 a 48 horas); **iii)** têm boa eficiência contra pragas do solo e de ambientes crípticos; e **iv)** podem ser aplicados de diversas formas (Capinera & Epsky, 1992).

Os NEPs possuem seis estádios de desenvolvimento, contudo somente no estádio J<sub>3</sub> os juvenis são infectantes (JIs) e carregam consigo bactérias simbiotes específicas. Após a penetração dos nematóides, estas bactérias são liberadas na hemolinfa do inseto-hospedeiro. Na hemolinfa, as bactérias causam septicemia e morte do inseto em 24-48 horas. Os nematóides alimentam-se da bactéria simbiote, desenvolvem-se a adultos e reproduzem, completando dois a três ciclos dentro do cadáver do inseto. Quando o alimento é exaurido, os JIs vão para o solo em busca de novos insetos hospedeiros (Woodring & Kaya, 1988). Para serem utilizados como agentes do biocontrole e aplicados a campo, esses nematóides precisam ser multiplicados em larga escala. Uma maneira simples e barata de multiplicá-los é a produção *in vivo* em larvas de *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae). A média de produção nesse hospedeiro é de 30.000 a 50.000 JIs por larva (Poinar, 1979), podendo chegar até 200.000 (Dutky *et al.*, 1964).

Segundo Molina *et al.* (2004), um problema enfrentado em relação à produção *in vivo* é a falta de padronização nas técnicas utilizadas. Para uma alta produção de JIs de boa qualidade e alta infectividade, faz-se necessário conhecer a quantidade ideal de JIs para infectar o hospedeiro sem que haja competição intra-específica (Boff *et al.*, 2000). Outro ponto importante é a quantidade de material disponível no cadáver para o melhor desenvolvimento dos nematóides, que está relacionada com o tamanho das larvas. *Heterorhabditis baujardi* Phan, Subbotin, Nguyen & Moens, 2003, isolado LPP7, vem sendo utilizado

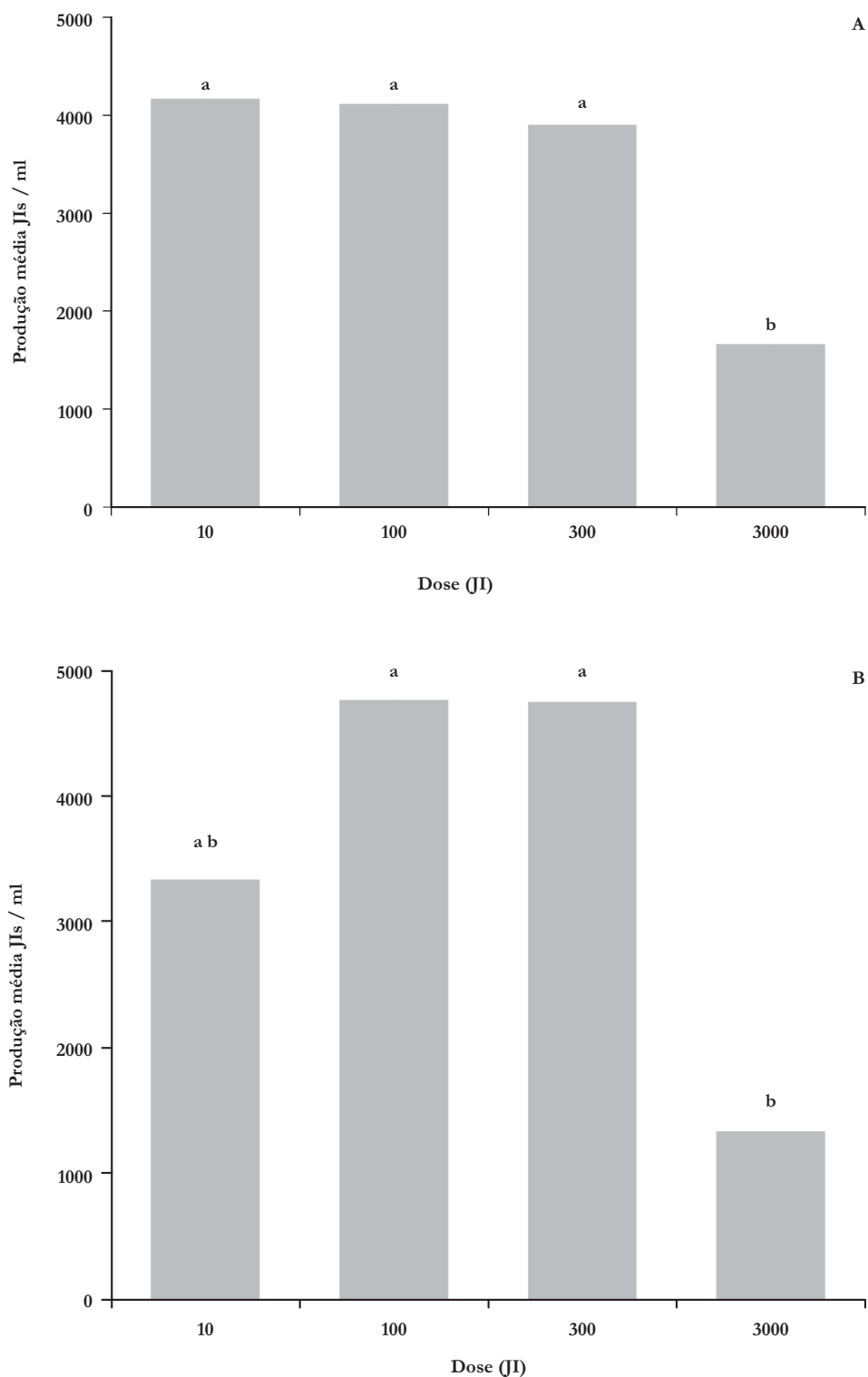
no controle de diferentes pragas da goiabeira e possui características biológicas intrínsecas que precisam ser bem conhecidas e estabelecidas, visando à sua produção *in vivo* em larga escala (Dolinski *et al.*, 2006). Portanto, o objetivo deste trabalho foi o de avaliar as influências da dose inicial do nematóide (JIs) e da massa das larvas de *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) utilizados sobre a produção de *H. baujardi* LPP7, expressa em termos de JIs / ml obtidos.

O experimento foi desenvolvido no laboratório de Nematologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense em Campos dos Goytacazes RJ. Foram realizados dois bioensaios, sendo estes repetidos para confirmar os resultados obtidos. Para o primeiro bioensaio, foram utilizados tubos Falcon® de 50 ml preenchidos com 50 g de areia autoclavada mantidos a 8 % de umidade (4 ml de água). Cada tubo recebeu uma larva no 7º. ínstar de *G. mellonella* e 0, 10, 100, 300 ou 3.000 JIs de *H. baujardi* LPP7, sendo utilizadas 10 repetições por tratamento. Os tubos foram fechados e mantidos em uma câmara de germinação a 25 ± 1 °C, 80 % UR, durante 18 horas. Após este tempo, as larvas foram colocadas em placas de Petri com papel filtro umedecido e deixadas por 4 dias a 25 ± 1 °C, para então serem colocadas em armadilhas modificadas de White (White, 1927), para a obtenção dos JIs. Estes foram coletados a cada 24 horas e colocados em garrafas de cultura de células de 500 ml por 144 horas. Após esse tempo, foram contados pelo método volumétrico e a produção tabulada como número de JIs / ml. Para o segundo bioensaio, 200 JIs de *H. baujardi* LPP7 foram adicionados a tubos Falcon® com areia da mesma forma que no primeiro experimento, juntamente com larvas de *G. mellonella* pesando 150 ± 10, 200 ± 10 ou 300 ± 10 mg (dez repetições para cada tratamento). Para ambos os bioensaios, foram feitas análises de variância dos resultados (ANOVA) com Sistema de Análises Estatísticas (Universidade Federal de Viçosa, 1997). Diferenças nas médias foram separadas usando teste Tukey a 5 % de significância. Ambos os bioensaios foram repetidos no tempo.

No estudo com diferentes doses, quando se aplicaram 10, 100 e 300 JIs, obtiveram-se as maiores produções, que não diferiram entre si (3.330, 4.759 e 4.749 JIs / ml, respectivamente). A dose de 3.000 JIs

concorreu à produção, em média, de 1.328 JIs e foi diferente das demais ( $F = 4,29$ ;  $GL = 3$ ;  $P = 0,0109$ ) (Figura 1A). Na réplica (Figura 1B), em geral as produções foram maiores do que no primeiro

experimento, contudo a tendência manteve-se e as doses de 10, 100 e 300 JIs foram novamente semelhantes entre si ( $P > 0,05$ ); apenas os tratamentos 100 e 300 JIs foram diferentes de 3.000 JIs ( $F = 3,48$ ;



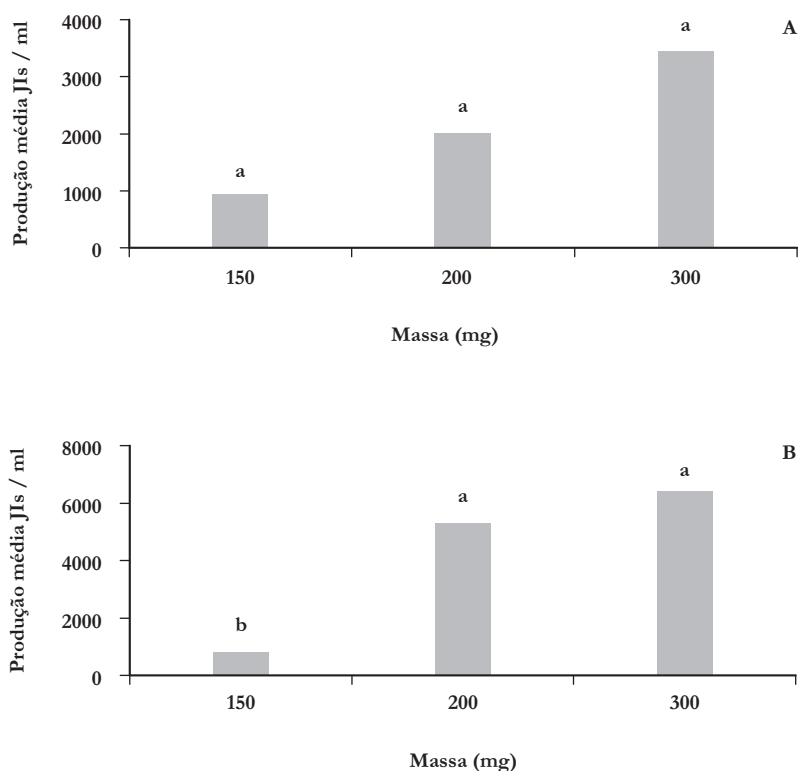
**Figura 1** - Produção média de juvenis infectantes (JIs) de *Heterorhabditis baujardi* LPP7 por ml/ mediante aplicação de diferentes doses de JIs em larvas de *Galleria mellonella*. Letras semelhantes não diferem pelo teste Tukey a 5 %. (A e B indicam repetições do ensaio ao longo do tempo)

GL = 3; P = 0,0216).

Molina & Lopez (2002), testando diferentes espécies de NEPs em diferentes hospedeiros, concluíram que, para uma produção máxima diária, cada espécie de nematóide, em um dado hospedeiro, apresenta características particulares. As produções de JIs obtidas pela influência das menores doses aplicadas são elevadas e estão de acordo com o padrão de produção de *H. baujardi* LPP7 em *G. mellonella* (Dolinski *et al.*, 2007). Boff *et al.* (2002), estudando *H. megidis* Poinar, Jackson & Klein, 1987, isolado NLH-E 87.3, encontraram que a maior produção de JIs em larvas de *G. mellonella* ocorreu com a aplicação da dose de 300 JIs por larva; constataram também que a produção decresceu significativamente nas maiores doses utilizadas no estudo. Flanders *et al.* (1996), utilizando *H. bacteriophora* Poinar, 1975, isolado Oswego, obtiveram produções semelhantes com aplicação de doses entre 20 e 500 JIs também em *G. mellonella*, o que reforça a importância de se conhecer

a melhor dose de infecção para as diferentes espécies de NEPs e confirma como mais adequado o intervalo de 100 a 300 JIs para a maior produção de JIs de *H. baujardi* LPP7. Esses resultados reforçam a presença do efeito negativo da competição intra-específica, também observado em trabalho anterior (Boff *et al.*, 2002).

No segundo bioensaio, quando se testaram diferentes massas das larvas de *G. mellonella*, foi observado (Figura 2A) que as produções de JIs / ml das massas 150, 200 e 300 mg não diferiram entre si (939, 2.009 e 3.455, respectivamente). Na réplica (Figura 2B), as produções em larvas com massas de 200 e 300 mg foram maiores e não diferiram entre si, contudo diferiram da massa 150 mg (5.305, 6.407 e 810, respectivamente) (F = 3,21; GL = 3; P < 0,05). Como esperado, a maior produção foi nas larvas de maior massa (300 mg), provavelmente devido ao maior conteúdo celomático e disponibilidade de nutrientes, e portanto menor competição intra-



**Figura 2** - Produção média de juvenis infectantes (JIs) de *Heterorhabditis baujardi* LPP7 por ml obtida pela aplicação do nematóide em larvas de *Galleria mellonella* com diferentes massas. Letras semelhantes não diferem pelo teste Tukey a 5 %. (A e B indicam repetições do ensaio ao longo do tempo)



específica. Segundo Molina & Lopez (2002), a produção de JIs é diretamente proporcional ao tamanho do hospedeiro. Flanders *et al.* (1996) trabalhando com *H. bacteriophora* Oswego, obtiveram o dobro da produção de JIs em larvas maiores (300-400 g), comparada às produções obtidas em larvas menores (100 - 200 g). Molina *et al.* (2004) demonstraram que não só o tamanho, mas também as espécies de nematóides entomopatogênicos afetam a produção de JIs. Os presentes resultados vêm dar suporte adicional a essas assertivas e permitem afirmar que, para *H. baujardi* LPP7, doses de 200 a 300 JIs aplicadas sobre larvas de *G. mellonella* com 200 a 300 mg são adequadas para a maior produção de JIs / ml.

### Literatura Citada

- ADAMS, B.J. & K.B. NGUYEN. 2002. Taxonomy and systematics. In: GAUGLER, R. (ed) Entomopathogenic Nematology. CABI Publishing, New York, p. 1-35.
- AKHUST, R.J. & K. SMITH. 2002. Regulation and safety. In: GAUGLER, R. (ed). Entomopathogenic Nematology. CABI Publishing, New York, p. 311-332.
- BOFF, M.I.C., G.L. WIEGERS, L.J.M. GERRITSEN & P.H. SMITS. 2000. Development of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis megidis* strain NLH-E 87.3 in *Galleria mellonella*. Nematology, 2: 303-308.
- CAPINERA, J.L. & N.D. EPSKY. 1992. Potential for biological control of soil insects in the Caribbean basin using entomopathogenic nematodes. Florida Entomologist, 75: 525-532.
- DOLINSKI, C. 2003. Development and establishment of integrated pest management strategies on guava orchards in the North / Northeast of Rio de Janeiro State, Brazil. In: SAUL, J. (ed). Memoria Primer Simposio Internacional de la Guayaba. Aguascalientes, México, p. 230-232.
- DOLINSKI, C., E.E. DEL VALLE & R.J. STUART. 2006. Virulence of entomopathogenic nematodes to larvae of the guava weevil, *Conotrachelus psidii* (Coleoptera: Curculionidae), in laboratory and greenhouse experiments. Biological Control, 38: 422-427.
- DOLINSKI, C., E.E. DEL VALLE, R.S. BURLA & I.R. MACHADO. 2007. Biological traits of two native Brazilian entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Heterorhabditidae). Nematologia Brasileira, 31: 180-185.
- DUTKY, S.R., J.V. THOMPSON & G.E. CANTWE. 1964. A technique for the mass propagation of the DD-136 nematode. Journal of Insect Pathology, 6: 417-422.
- FLANDERS K.L., J.M. MILLER, E.J. SHIELDS. 1996. *In vivo* production of *Heterorhabditis bacteriophora* Oswego (Rhabditida: Heterorhabditidae), a potential biological control agent for soil-inhabiting insects in temperate regions. Journal of Economic Entomology, 89: 373-380.
- MOLINA, J.P.A., A. MOINO Jr. & R.S. CAVALCANTI. 2004. Produção *in vivo* de nematóides entomopatogênicos em diferentes insetos hospedeiros. Arquivos do Instituto Biológico, 71: 347-354.
- MOLINA, A.J.P. & N.J.C. LÓPEZ. 2002. Producción *in vivo* de tres entomonematodos con dos sistemas de infección en dos hospedantes. Revista Colombiana Entomológica, 27: 73-78.
- POINAR, G.O. 1979. Nematodes for Biological Control of Insects. CRC Press, Boca Ratón, 277 p.
- UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA. 1997. SAEG Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas: Versão 9.0. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa MG, 150 p.
- WHITE, C.F. 1927. A method for obtaining larvae from culture. Science, 66: 302-303.
- WOODRING, L. & H.K. KAYA. 1988. Steinernematid and Heterorhabditid Nematodes: a Handbook of Techniques. Arkansas Agricultural Experiment Station, Fayetteville (AR) EUA, 30 p. (Series Bulletin 331)

## Minimum and Optimum Temperatures for Penetration of *Meloidogyne chitwoodi* Races 1 and 2 and *M. hapla* on 'Russet Burbank' Potato Roots

João M. Charchar<sup>1\*</sup> & Gerald S. Santo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Embrapa Hortaliças, C. Postal 218, 70359-970 Brasília (DF) Brazil.

<sup>2</sup>Department of Plant Pathology, Washington State University, Irrigated Agriculture Research and Extension Center (IAREC), 99350, Prosser (WA) USA.

\*Corresponding author: charchar@cnph.embrapa.br

Received for publication on August 30, 2007. Accepted on June 4, 2008

Edited by Claudio Marcelo Oliveira

**Summary** – Charchar, J.M. & G.S. Santo. 2008. Minimum and optimum temperatures for penetration of *Meloidogyne chitwoodi* races 1 and 2 and *M. hapla* on 'Russet Burbank' potato roots.

Experiments were conducted in controlled temperature tanks and growth chambers to determine the minimum and optimum soil temperature required for penetration of 'Russet Burbank' potato roots by *M. chitwoodi* races 1 (MC1) and 2 (MC2) and *M. hapla* (MH). Second stage juvenile ( $J_2$ ) of MC1 had a wider optimal temperature range for root penetration on 'Russet Burbank' potato than MC2 or MH. MC1 penetrated potato roots best at 18, 24, and 30 °C; MC2 at 24 and 30 °C; and MH at 30 °C. The minimum temperature for penetration by  $J_2$  of MC1 and MC2 was between 3 and 6 °C, whereas the minimum temperature for penetration by MH in potato roots was around 6 °C.

**Key words:** *Solanum tuberosum*, Columbia root-knot nematode, northern root-knot nematode, root infection.

**Resumo** – Charchar, J.M. & G.S. Santo. 2008. Temperaturas mínima e ótima para penetração de *Meloidogyne chitwoodi* raças 1 e 2 e de *M. hapla* em raízes de batata 'Russet Burbank'.

Experimentos foram conduzidos em condições de temperaturas controladas em tanques com água e em câmaras de crescimento para determinar as temperaturas mínima e ótima para a penetração de *Meloidogyne chitwoodi* raças 1 (MC1) e 2 (MC2) e *M. hapla* (MH) em raízes de batata cultivar Russet Burbank. Juvenis do segundo estágio ( $J_2$ ) de MC1 penetraram as raízes de batata 'Russet Burbank' em maior faixa de temperaturas que MC2 ou MH. Mais  $J_2$  de MC1 penetraram em raízes de batata nas temperaturas de 18, 24 e 30 °C; MC2 em 24 e 30 °C; e MH em 30 °C. A temperatura mínima para ocorrer penetração por  $J_2$  de MC1 e MC2 em raízes de batata 'Russet Burbank' foi em torno de 3 a 6 °C, enquanto que a penetração por  $J_2$  de MH foi em torno de 6 °C.

**Palavras chaves:** *Solanum tuberosum*, nematóides das galhas de Colúmbia, nematóides de galhas do Norte, infecção de raízes.

### Content

Potatoes (*Solanum tuberosum* L.) are an important crop of the Pacific Northwest in USA. Washington State annually grows about 44,500 ha of potatoes and approximately 40 % of this hectareage is infested with two species of *Meloidogyne*, the Columbia (*Meloidogyne chitwoodi* Golden, 1980) and Northern root-knot nematode (*M. hapla* Chitwood, 1949) (Anonymous,

1985). Both species cause serious problems in potato production because they reduce the quality of the potato tubers (Santo & O'Bannon, 1981a). *Meloidogyne chitwoodi* races 1 (MC1) and 2 (MC2) are of greater economic importance to potatoes production than *M. hapla* (MH) as they cause more severe tuber damages and is more difficult to control (Santo & O'Bannon, 1981a; O'Bannon & Santo, 1984). In 1985, MC2 was

discovered in Washington State, which reproduces very well on alfalfa (*Medicago sativa* L.), an unsuitable host for MC1 (Santo *et al.* 1980; Santo & Pinkerton, 1985; Pinkerton *et al.*, 1986). MC2 causes tuber damage similar to MC1 and has been found widespread in the major potato producing areas of the Pacific Northwest (Charchar *et al.*, 1984).

The higher incidence of MC1 or MC2 compared to *M. hapla* (MH) suggests they are the dominant species. This dominance has been suggested to result from the ability to develop and reproduce over a wider temperature range than MH (Finley, 1981; Santo & O'Bannon, 1981b; Inserra *et al.* 1985; Pinkerton, *et al.*, 1986). Soil temperatures in the Pacific Northwest generally range throughout the growing season within the optimal infective and developmental limits of MC races, but not always within the limits of MH. Thus, the MC races are able to become established and populations increase early in the season at soil temperature as low as 6 °C (Charchar, 1987), which results in more MC races generations per year than MH (Santo & O'Bannon, 1981b; O'Bannon & Santo, 1984).

Detailed information on the effects of temperature on the infectivity of MC races on potato is limited and involves crops other than potato. Inserra *et al.* (1985) reported the effect of temperature on the life cycle of MC1 on 'Nugaines' winter wheat (*Triticum aestivum* L.). The infectivity and reproduction of MH have previously been described on potato (Thomason & Lear, 1961; Griffin & Jorgenson, 1969). The objective of this study was to determine the minimum and optimum soil temperatures required for J<sub>2</sub> penetration of MC1, MC2, and MH on 'Russet Burbank' potato roots.

The experiments were conducted in controlled temperature tanks and growth chambers at the Irrigated Agriculture Research and Extension Center (IAREC), Washington State University (WSU), Prosser (WA) USA.

**Temperature tank studies.** For this experiment were used one population of MC1 from Washington, one population of MC2 from Oregon and one population of MH from Washington. The MC1 and MC2 populations were isolated from potato 'Russet Burbank' and maintained on wheat 'Nugaines' and

alfalfa 'Thor', respectively. The population of MH from Washington was isolated from alfalfa and maintained on pepper (*Capsicum annuum* L. 'California Wonder'). These three nematode populations were reared on tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) 'Columbia' on separate benches under greenhouse conditions maintained at 20-26 °C. Periodically, these populations were checked for possible contamination by using differential host test on alfalfa 'Thor', wheat 'Nugaines', pepper 'California Wonder' and carrot 'Chantenay Red Cored', which is a good host for MC1 but not for MC2 (Mojtahedi *et al.*, 1988).

Plants were watered as needed and fertilized monthly with a granulated Osmocote® (Joe Berger & Co., Renton, Washington) formulation, 14-14-14 (10 g / pot). Nematode eggs for inocula were extracted after shaking the galled roots of 55 to 65 day-old stock tomato plants in 0.5 % NaOCl technique for 4 minutes (Hussey & Barker, 1973). Second-stage juveniles (J<sub>2</sub>), which served as inoculum for the experiment, were obtained by placing highly concentrated egg suspensions of the nematode populations on 25 µm (500-mesh) screens and incubated at 24 °C for 24 hours.

Single-eye seed pieces of 'Russet Burbank' potato were planted in methyl bromide fumigated sand in metal flats in the greenhouse. After five weeks, the original seed pieces were removed and a single plant was transplanted into an 8 cm-diameter plastic cup containing 250 cm<sup>3</sup> of methyl bromide-fumigated sandy loam soil. The plants were held in a greenhouse for 1 week. The cups were inserted in empty cups of the same size, placed in 25 cm-diameter glass jars, three cups per jar. Interspaces between cups were filled with methyl bromide-fumigated soil up to the top edge of the cups, which is 4 cm from the top of the glass jar.

The glass jars were immersed in controlled water temperature tanks in a greenhouse. The water of each tank was kept in continuous circulation around the jars by bubbling compressed air from the bottom of the tank through a series of holes in a glass or *teflon* tube spanning the length of each tank. After an additional week, inoculations were made by pouring a suspension of 150 freshly hatched juveniles of MC1 or MC2, or MH in 5 ml of water around the exposed

roots of the plants in each cup. The three potato plants (one per cup) in the glass jars were inoculated with the same nematode population. The jars were positioned randomly at constant soil temperatures of 6, 12, 18, 24, and 30 °C ( $\pm 1$  °C). Plant foliage was kept at ambient temperature maintained at 22-26 °C. The light source was a series of VHO cool white fluorescent bulbs with an intensity of  $4.8 \times 10^3$  lux, positioned 91 cm above the temperature tanks. Plants were watered as needed and fertilized once with a granulated Osmocote®, formulation 14-14-14 at a rate of 5 g / cup. Plants were removed six days after inoculation, washed free of soil and stained with acid-fuchsin-NaOCl staining procedure of Byrd *et al.* (1983) for counting  $J_2$  of each nematode population after penetrating in the potato roots (Figure 1).

A complete randomized block design with eight replicates for each nematode population was used to compare the nematode populations at the same temperature. A split-plot design with a separate tank for each temperature was used to compare each nematode population at different temperatures (Gomez & Gomez, 1984). Mean comparisons were made by using Duncan's Multiple Range Test based on arc sin-transformed data.

The penetration of roots on 30-day-old potato seedlings six days after inoculation by  $J_2$  of MC1, MC2, and MH was affected ( $P \leq 0.05$ ) by soil temperatures

(Table 1). The percentage of  $J_2$  which penetrated roots increased significantly as soil temperatures increased. Maximum penetration of MC1 occurred at 18, 24, and 30 °C; MC2 at 24 and 30 °C; and MH at 30 °C. No differences ( $P \leq 0.05$ ) were observed between MC1 and MC2, except at 18 °C, in which MC1 penetrated roots more efficiently than MC2. Significantly ( $P \leq 0.05$ ) fewer MH penetrated roots at 24 °C than either of the MC races. Also significantly less MH penetrated roots at 12 and 18 °C than MC1. No differences ( $P \leq 0.05$ ) in the three nematode populations were observed at 6 or 30 °C.

MC1 had a wider optimal temperature range for penetration of 'Russet Burbank' potato roots than MC2 or MH (Table 1). Although MH reproduces better at 30 °C than MC1 or MC2 (Santo & O'Bannon, 1981b; Charchar, 1987), no differences were found in their ability to penetrate roots at this temperature. These results indicate that MC1 and MC2 are faster and more aggressive nematodes than MH. This is probably the reason why MH competes poorly with MC's races for feeding sites on 'Russet Burbank' potato roots whenever they occur together (Santo & O'Bannon, 1981a; O'Bannon & Santo, 1984).

**Growth chamber studies.** The minimum temperature for penetration of MC1, MC2, and MH was determined in a separate experiment. 'Russet Burbank' potato seedlings were grown for 30 days



**Figure 1** - Root penetration by  $J_2$  of *Meloidogyne chitwoodi* race 1 in potato 'Russet Burbank' six days after inoculation.

and transplanted to Sandusky bedding plant containers with a cell size of 4.5 × 4.5 × 6.6 cm and cells were inserted in support flats. Each cell was filled to a depth of just 3.5 cm with 50 grams of 60-mesh pore white quartz sand to support the potato seedling and avoid cross contamination between cells. Three days after transplanting, roots of potato seedlings were inoculated with 150 J<sub>2</sub> that were prepared and inoculated as previously described. Nematode isolates tested included two populations of MC1 (WAMC1 from Quincy, WA and WAMC11 from Lynden, WA), two populations of MC2 (ORMC8 from Klamath Falls, OR and WAMC15 from Patterson, WA), and one population of MH (WAMH from Prosser, WA). The inoculated trays were kept in growth chambers (Percival model 1-30B) adjusted to 3, 6, 9, and 12 °C (± 0.5 °C) for 28 days. The potato roots were washed free of sand, stained using the acid-fuchsin-NaOCl technique for counting J<sub>2</sub> invaded in the roots using a stereoscope with 40-70× magnification. The statistical procedure for this experiment followed the same as

previously described.

None of the nematode populations was able to penetrate roots at 3 °C (Table 2). Also no penetration was observed for MH at 6 and 9 °C. Significantly more ( $P \leq 0.05$ ) nematodes of all populations penetrated roots at 12 °C compared to 3, 6, and 9 °C, and more ( $P \leq 0.05$ ) J<sub>2</sub> of MC1 isolate WAMC1 penetrated roots than isolate WAMC11 at 6 °C, but not at 9 or 12 °C. The isolate of MC2 (ORMC8) penetrated roots more readily ( $P \leq 0.05$ ) than WAMC15 at 12 °C, but did not differ at 6 and 9 °C. MC1 isolate WAMC11 penetrated roots less ( $P \leq 0.05$ ) than the isolate (WAMC1) at 6 °C. Significantly more juveniles ( $P \leq 0.05$ ) of MC2 isolate ORMC8 were able to penetrate roots at 12 °C than the MC1 isolates, and at 9 °C than MC1 isolate WAM11 (Table 2).

The experiment conducted in a growth chamber indicated that the minimum temperature for penetration of roots by the MC races is between 3 and 6 °C (Table 2); however, no root penetration was observed by MH at 6 or 9 °C in contrast to the

**Table 1** - Effect of temperature on percent penetration of second-stage juvenile (J<sub>2</sub>) of *Meloidogyne chitwoodi* races 1 (MC1) and 2 (MC2) and *M. hapla* (MH) on seedlings of potato 'Russet Burbank' six days after inoculation with 150 J<sub>2</sub>.

Nematodes	Percent J <sub>2</sub> penetrating potato roots				
	Temperature (°C)				
	6	12	18	24	30
MC1	0.7 aC	5.7 aB	11.9 aA	11.8 aA	11.3 aA
MC2	3.1 aB	3.4 abB	3.9 bB	10.6 aA	11.6 aA
MH	0.7 aB	0.8 bB	1.5 bB	1.9 bB	11.6 aA

Values are means of eight replicates. Values followed by the same lower case letter in columns, and values followed by the same capital letter in rows are not significantly different ( $P \leq 0.05$ ) according to Duncan's Multiple Range Test, based on arc sin-transformed data.

**Table 2** - Minimum temperature for percent penetration of *Meloidogyne chitwoodi* race 1 (MC1) and 2 (MC2) and *M. hapla* (MH) populations on potato 'Russet Burbank' 28 days after inoculation with 150 second-stage juveniles (J<sub>2</sub>).

Nematodes <sup>1</sup>	Percent J <sub>2</sub> penetrating potato roots <sup>2</sup>			
	Temperature (°C)			
	3	6	9	12 <sup>3</sup>
WAMC1	0.0 B	1.1 aB	1.9 abB	5.9 bcA
WAMC11	0.0 B	0.3 bB	0.9 bcB	6.3 bA
ORMC8	0.0 B	1.4 aB	2.4 aB	10.9 aA
WAMC15	0.0 B	1.4 aB	1.1 abB	5.0 bcA
WAMH	0.0 B	0.0 cB	0.0 cB	2.5 cA

<sup>1</sup>Nematode populations: (WAMC1) *Meloidogyne chitwoodi* race 1 from Quincy (WA); (WAMC11) *M. chitwoodi* race 1 from Lynden (WA); (ORMC8) *M. chitwoodi* race 2 from Klamath (OR); (WAMC15) *M. chitwoodi* race 2 from Patterson (WA); and (WAMH) *M. hapla* from Prosser (WA).

<sup>2</sup>Values are means of eight replicates. Values followed by the same lower case letter in columns, and values followed by the same capital letter in rows are not significantly different ( $P \leq 0.05$ ) according to Duncan's Multiple Range Test, based on arc sin-transformed data.

<sup>3</sup>Values at 12 °C were recorded 10 days after inoculation.

temperature tanks experiment at 6 °C. The difference observed with MH in the two experiments at 6 °C may be explained for two hypothesis: **1)** different isolates of MH may have been used in the temperatures tanks and growth chambers experiments, or **2)** environmental differences of both experiments (temperature tanks and growth chambers) may have caused different effects on MH for penetration in potato roots at 6 °C.

The results obtained with the MC isolates indicated that there were differences in the ability of the different isolates of MC1 and MC2 to penetrate roots at low temperatures. MC1 isolate WAMC1 penetrated roots more frequently than WAMC11 at 6 °C, and MC2 isolate ORMC8 more than WAMC15 at 12 °C. However, additional studies are needed to confirm if different isolates of MH have also different behavior for root penetration at low temperatures as observed with MC races isolates. Stephan & Trudgill (1982) reported that different physiological races of MH have different abilities to tolerate higher and lower temperatures. Other findings have shown that a MH population from Washington reproduced best in potato roots at 30°C (Santo & O'Bannon, 1981b; O'Bannon & Santo, 1984), whereas a population from Utah reproduced best in potato roots at 25 °C (Griffin & Jorgenson, 1969). The results of both experiments supported the hypothesis that MC races are dominants in the Pacific Northeast of Washington State due to wider range of optimum temperatures than MH.

### Literature Cited

- ANONYMOUS. 1985. Agricultural Statistics United States Department of Agriculture. Superintendent of Documents, U.S. Government Printing Office, Washington D.C., p. 164.
- BYRD, D.W., T. KIRKPATRICK & K.R. BARKER. 1983. An improved technique for cleaning and staining plant tissues for detection of nematodes. *Journal of Nematology*, 15 (1): 142-143.
- CHARCHAR, J.M. 1987. Effect of temperature on the life cycle of *Meloidogyne chitwoodi* races 1 and 2 and *M. hapla*. (Ph.D Dissertation). Washington State University, Pullman, 68 p.
- CHARCHAR, J.M., G.S. SANTO & J.H. O'BANNON. 1984. Life cycle of *Meloidogyne chitwoodi* and *M. hapla* on potato in controlled temperature tanks and microplots. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF NEMATOLOGY, I, Guelph, Canadá, p. 18.
- FINLEY, A.M. 1981. Histopathology of *Meloidogyne chitwoodi* (Golden *et al.*) on Russet Burbank potato. *Journal of Nematology*, 13 (4): 486-491.
- GOMEZ, K.A. & A. A. GOMEZ. 1984. Statistical Procedures for Agricultural Research. 2<sup>nd</sup> ed. John Wiley and Sons, New York, 680 p.
- GRIFFIN, G.D. & E.C. JORGENSON. 1969. Life cycle and reproduction of *Meloidogyne hapla* on potato. *Plant Disease Reporter*, 53 (4): 259-261.
- HUSSEY, R.S. & K.R. BARKER, 1973. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. *Plant Disease Reporter*, 57 (12): 1025-1028.
- INSERRA, R.N., N. VOVLAS, J.H. O'BANNON & G.D. GRIFFIN. 1985. Development of *Meloidogyne chitwoodi* on wheat. *Journal of Nematology*, 17 (3): 322-326.
- MOJTAHEDI, H., G.S. SANTO & J.H. WILSON. 1988. Host test to differentiate *Meloidogyne chitwoodi* races 1 and 2 and *M. hapla*. *Journal of Nematology*, 20 (3): 468-473.
- O'BANNON, J.H. & G.S. SANTO. 1984. Effect of soil temperature on reproduction of *Meloidogyne chitwoodi* and *M. hapla* alone and in combination on potato and *M. chitwoodi* on rotation plants. *Journal of Nematology*, 16 (3): 309-312.
- PINKERTON, J.N., H. MOJTAHEDI & G.S. SANTO. 1986. Reproductive efficiency of Pacific Northwest isolates of *Meloidogyne chitwoodi* on alfalfa. *Journal of Nematology*, 18 (1): 62.
- SANTO, G.S. & J.H. O'BANNON. 1981a. Ecology of root-knot nematodes on Russet Burbank potato in Washington. *Journal of Nematology*, 13 (4): 459-460 (Abstract).
- SANTO, G.S. & J.H. O'BANNON. 1981b. Effect of soil temperature on the pathogenicity and reproduction of *Meloidogyne chitwoodi* and *M. hapla* on Russet Burbank potato. *Journal of Nematology*, 13 (4): 483-486.
- SANTO, G.S., J.H. O'BANNON, A.M. FINLEY & A.M. GOLDLEN. 1980. Occurrence and host range of a new root-knot nematode (*Meloidogyne chitwoodi*) in the Pacific Northwest. *Plant Disease*, 64 (7): 951-952.
- SANTO, G.S. & J.N. PINKERTON. 1985. A second race of *Meloidogyne chitwoodi* discovered in Washington State. *Plant Disease*, 69 (4): 361 (Abstract).
- STEPHAN, Z.A. & D.L. TRUDGILL. 1982. Development of four populations of *M. hapla* on two cultivars of cucumber at different temperatures. *Journal of Nematology*, 14 (4): 545-549.
- THOMASON, I.J. & B. LEAR. 1961. Rate of reproduction of *Meloidogyne* spp. as influenced by soil temperature. *Phytopathology*, 51 (8): 520-52.

## Efeito da Concentração de Clamidósporos de *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* no Controle de *Meloidogyne javanica*\*

Rosângela Dallemole-Giaretta<sup>1,2\*\*</sup>, Leandro G. Freitas<sup>2</sup>, Silamar Ferraz<sup>2</sup>, Wânia S. Neves<sup>2</sup>, Everaldo A. Lopes<sup>2</sup> & Marcelo M. Coutinho<sup>2</sup>

\*Parte da Tese do primeiro autor, para a obtenção do título de Doutor pela Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa (MG) Brasil.

<sup>1</sup>Bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

<sup>2</sup>Departamento de Fitopatologia, UFV, 36571-000 Viçosa (MG) Brasil.

Autora para correspondência: rodallemole@yahoo.com.br

Recebido para publicação em 10 / 01 / 2008 . Aceito em 07 / 06 / 2008

Editado por Mário Inomoto

**Resumo** - Dallemole-Giaretta, R., L.G. Freitas, S. Ferraz, W.S. Neves, E.A. Lopes & M.M. Coutinho. 2008. Efeito da concentração de clamidósporos de *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* no controle de *Meloidogyne javanica*.

Avaliou-se, em dois experimentos em casa de vegetação, a eficiência de *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* no controle de *Meloidogyne javanica*. No primeiro experimento, o solo de cada vaso foi infestado com 3.000 ovos de *M. javanica* e com clamidósporos do fungo nas concentrações de 5.000, 10.000, 15.000, 20.000 ou 25.000 por grama de solo, e após sete dias, uma muda de tomate ‘Santa Clara’ foi transplantada. No segundo experimento, o solo foi infestado com 4.000 ovos do nematóide e 5.000 clamidósporos / g de solo, porém as mudas foram transplantadas somente após 15 dias. No primeiro experimento, o número de ovos de *M. javanica* foi reduzido de 34 a 60 %, independentemente da concentração de clamidósporos aplicada, mas não se observou redução no número de galhas. No segundo experimento, a aplicação do antagonista ao solo reduziu em 82 % o número de ovos e em 50 % o número de galhas por sistema radicular, o que indica que o fungo deve ser colocado em contato com o nematóide no solo por um período maior antes do plantio do tomateiro, para que haja redução da densidade de inóculo do patógeno e do número de galhas já no primeiro ciclo de vida do nematóide.

**Palavras-chaves:** fungo nematófago, nematóide das galhas, controle biológico.

**Summary** - Dallemole-Giaretta, R., L.G. Freitas, S. Ferraz, W.S. Neves, E.A. Lopes & M.M. Coutinho. 2008. Effect of different rates of *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* chlamydospores on *Meloidogyne javanica* control.

The efficiency of *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* on the control of *Meloidogyne javanica* was evaluated in two greenhouse experiments. In the first experiment, the soil of each pot was infested with 3,000 eggs of *M. javanica* and chlamydospores of the fungus at the rates of 5,000; 10,000; 15,000; 20,000; or 25,000 per gram of soil. Seven days after soil infestation, one seedling of tomato ‘Santa Clara’ was transplanted into each pot. In the second experiment, the soil was infested with 4,000 eggs of the nematode and 5,000 chlamydospores / g of soil, but the tomato seedlings were transplanted only 15 days after soil infestation. In the first experiment, all chlamydospore rates reduced the number of eggs of *M. javanica* (up to 60 %), but no effect on the number the galls was observed, whereas in the second experiment, the application of the antagonist reduced in 82 % the number of eggs and in 50 % the number of galls per root system. The result suggests that the fungus should be placed in contact with the nematode eggs into the soil for a longer period before transplanting tomato, in

order to reduce the pathogen inoculum density and the number of galls right in the first life cycle of the nematode.

**Key words:** nematophagous fungi, root-knot nematode, biological control.

## Conteúdo

*Pochonia chlamydosporia* Zare & Gams (sin. *Verticillium chlamydosporium* Goddard) é um fungo parasita facultativo de ovos de nematóides do gênero *Meloidogyne* Goeldi (De Leij & Kerry, 1991; De Leij *et al.*, 1993) e sua efetividade no controle do nematóide das galhas já foi comprovada em vários estudos (Viaene & Abawi, 2000; Bourne, 2001; Khan *et al.*, 2005). Esse antagonista reduz a população do nematóide por meio da colonização das massas de ovos, que ficam expostas na superfície do sistema radicular das plantas, e morte do embrião ou juvenil de segundo estágio (Morgan-Jones *et al.*, 1983; Bourne *et al.*, 1996; Kerry & Bourne, 2002; Mukhtar & Pervaz, 2003). Além disso, apresenta a vantagem de produzir clamidósporos, estruturas de resistência e sobrevivência, que são preferencialmente utilizados como inóculo, podendo ser adicionados ao solo em suspensão aquosa sem fonte adicional de nutrientes (Kerry & Bourne, 2002). No solo, os clamidósporos germinam e o micélio formado prolifera, coloniza o sistema radicular e parasita as massas de ovos formadas na superfície das galhas (Bourne *et al.*, 1996). A colonização radicular por *P. chlamydosporia* depende da quantidade de inóculo do antagonista no solo, da presença do nematóide nas raízes e da quantidade de estímulos liberados pelas raízes das plantas para o crescimento do fungo (De Leij & Kerry, 1991; De Leij *et al.*, 1992a; Bourne & Kerry, 2000). *Pochonia chlamydosporia* também é capaz de utilizar a matéria orgânica do solo como fonte de nutrientes e de predação de ovos não associados às raízes ou em restos culturais, o que se sugere que esse antagonista possa sobreviver no solo na ausência de plantas (Stirling, 1991; Bourne & Kerry, 2000; Viaene & Abawi, 2000; Mauchline *et al.*, 2002). Considerando que ovos de nematóide são importante fonte nutricional para o fungo (Stirling, 1991), é possível potencializar o controle do nematóide das galhas por meio da aplicação de *P. chlamydosporia* ao solo alguns dias antes do plantio da cultura principal, visando aumentar o parasitismo de ovos

dos nematóides e assim reduzir o inóculo inicial do fitopatógeno. Dessa forma, o presente trabalho teve por objetivo avaliar diferentes concentrações de clamidósporos de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* e a aplicação do fungo no solo aos sete ou quinze dias antes da instalação da cultura no controle de *Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood.

O isolado Pc-10 do antagonista utilizado nos ensaios pertence à coleção de fungos nematófagos do Laboratório de Controle Biológico de Fitonematóides da Universidade Federal de Viçosa, e foi originalmente isolado de solo naturalmente infestado com *Meloidogyne* spp. no município de Viçosa (MG). Para a obtenção dos clamidósporos, o fungo foi repicado para placas de Petri contendo meio 'corn meal agar' (CMA) e cultivado por 15 dias em câmara de crescimento no escuro a 26 °C. Posteriormente, três discos de meio de cultura com 7 mm de diâmetro e colonizados pelo antagonista foram transferidos para frascos tipo *erlenmeyer*, com capacidade de 250 cm<sup>3</sup> e contendo 80 g de substrato previamente autoclavado, composto de milho triturado + areia 1:1 (massa : massa) e 60 ml de água. Estes frascos foram armazenados por 21 dias em câmara de crescimento no escuro a 26 °C. Após esse período, o substrato de cada frasco foi transferido para um balde e, após a adição de água de torneira em quantidade suficiente para cobrir o substrato, foi realizada a agitação manual da mistura e a filtragem através de uma camada dupla de gaze. O número de clamidósporos por mililitro da suspensão foi quantificado com o auxílio de câmara de Neubauer e microscópio óptico no aumento de 40 x.

O primeiro experimento foi conduzido durante o período de 10 / 11 / 06 a 02 / 01 / 07, com temperatura média na casa de vegetação de 28,8 °C, com média das máximas de 36,0 °C e a média das mínimas de 21,6 °C. Vasos de 500 cm<sup>3</sup> de capacidade foram preenchidos com a mistura solo e areia, na proporção 1:1 (volume : volume), previamente tratadas com brometo de metila. O solo de cada vaso



foi colocado em um saco de plástico de 5.000 cm<sup>3</sup> de capacidade com os clamidósporos do fungo (5.000, 10.000, 15.000, 20.000 ou 25.000 clamidósporos por grama de solo), homogeneizado por agitação manual e colocado novamente no vaso. A seguir, o solo foi infestado com 3.000 ovos de *M. javanica* por vaso ao se adicionar o inóculo em quatro orifícios de aproximadamente 5 cm de profundidade, equidistantes 5 cm na parte central do vaso. O solo foi mantido úmido em 60 % da capacidade de campo por sete dias, quando uma muda de tomateiro 'Santa Clara' foi transplantada em cada vaso. O segundo experimento foi conduzido durante o período de 13/05 a 28/07/07 com média de temperatura na casa de vegetação de 22,1 °C, sendo a média das máximas de 30,6 °C e a média das mínimas de 13,6 °C. Os procedimentos metodológicos foram semelhantes ao experimento anterior, entretanto, o solo de cada vaso foi infestado com 5.000 clamidósporos/ g de solo e

4.000 ovos de *M. javanica*. Além disso, o transplante das mudas de tomate ocorreu somente 15 dias após a infestação do solo. Como controle, em ambos os experimentos, foi utilizada uma mistura de solo e areia infestada com o nematóide, sem a adição do fungo. O delineamento dos experimentos foi o inteiramente casualizado, com oito repetições por tratamento. No final de cada experimento foram avaliados a altura das plantas, a massa da parte aérea e das raízes frescas e os números de galhas e de ovos por sistema radicular.

Não foi observado aumento na altura e na massa da parte aérea, nos dois experimentos, quando comparados com as testemunhas com nematóides. Além disso, não houve diferença na massa das raízes das plantas (Tabelas 1 e 2). O isolado Pc-10 de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* reduziu a multiplicação de *M. javanica* em raízes de tomateiro, em todas as concentrações de clamidósporos aplicadas ao solo

**Tabela 1** - Efeito da aplicação ao solo de diferentes quantidades de clamidósporos de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia*, isolado Pc-10 sete dias antes do plantio dos tomateiros, sobre a reprodução do nematóide, seus sintomas nas raízes e o desenvolvimento da planta em casa de vegetação. (Experimento 1).

Concentração de clamidósporos / g de solo	Altura (cm)	Massa da parte aérea (g)	Massa de raiz (g)	Nº. de galhas	Nº. de ovos
0 (sem nematóide)	94	70 *	15 ns	-	-
0 (com nematóide)	89	61	20	1.444 ns	313.329
5.000	82	60	18	1.337	159.700 *
10.000	71 *	58	22	1.505	138.667 *
15.000	87	61	17	1.297	191.562 *
20.000	77	64	19	1.603	125.187 *
25.000	80	59	18	1.415	207.808 *

Os valores são médias de oito repetições.

\*Médias que diferem do controle ( $P < 0,05$ ) no teste de médias de Dunnett.

ns = Não significativo pelo teste F a 5 % de probabilidade.

**Tabela 2** - Efeito da aplicação ao solo de diferentes quantidades de clamidósporos de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia*, isolado Pc-10 quinze dias antes do plantio dos tomateiros, sobre a reprodução do nematóide, seus sintomas nas raízes e o desenvolvimento da planta, em casa de vegetação. (Experimento 2).

Concentração de clamidósporos / g de solo	Altura (cm)	Massa da parte aérea (g)	Massa de raiz (g)	Nº. de galhas	Nº. de ovos
0 (sem nematóide)	52 ns	70 ns	23 ns	-	-
0 (com nematóide)	52	62	26	611	177.618 <sup>a</sup>
5.000	51	67	24	276 *	31.488 *

Os valores são médias de oito repetições.

ns = Não significativo pelo teste F a 5 % de probabilidade.

\*Significativo pelo teste F a 5 % de probabilidade.

<sup>a</sup>Valores transformados para  $\sqrt{x}$ .

(Tabelas 1 e 2). No primeiro experimento, no qual o fungo e os ovos foram introduzidos no solo sete dias antes do transplântio das mudas, a redução do número de ovos foi de 34 a 60 %, variando independentemente do aumento da concentração, porém não se observou redução no número de galhas (Tabela 1). No segundo experimento, no qual o fungo e os ovos permaneceram no solo por 15 dias antes do transplântio do tomateiro, a quantidade de 5.000 clamidósporos / g de solo (a menor concentração de inóculo inicial do primeiro experimento) proporcionou reduções de 82 % do número de ovos por sistema radicular e de 55 % do número de galhas, em comparação com o tratamento testemunha ( $P < 0,05$ ) (Tabela 2). O maior período de contato entre o fungo e os ovos do nematóide no solo proporcionou melhor atuação de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* na redução da infecção inicial de *M. javanica*. Somente sete dias de contato do antagonista com os ovos do nematóide, antes do plantio do tomate, não permitiu que *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* reduzisse significativamente o número de galhas. Tal fato também foi constatado por Lopes *et al.* (2007), após manter os ovos de *M. javanica* em contato com *P. chlamydosporia* por sete dias antes do plantio da mesma cultura. Os ovos dos nematóides são constituídos de proteínas e lipídios que são utilizados pelo fungo como fonte de energia (Stirling, 1991). Quanto maior o tempo de contato do fungo com os ovos, mais eficiente é o parasitismo dos ovos podendo impedir a formação e a eclosão dos juvenis de segundo estágio ( $J_2$ ), reduzindo assim a infecção das raízes e, por consequência, o número de galhas e de ovos produzidos.

A temperatura ambiente afeta diretamente o crescimento do fungo e do nematóide. A temperatura ótima para *P. chlamydosporia* é de 25 °C (Zare & Gams, 2004) e para *M. javanica* é de 29 °C (Taylor & Sasser, 1983). Como o primeiro experimento foi instalado em uma época do ano mais quente que do segundo experimento, com temperatura média próxima a 29 °C, ótima para o nematóide mas muito quente para o fungo, os  $J_2$  se formaram mais rapidamente, eclodiram e penetraram nas raízes antes do fungo ter tido a chance de colonizar e parasitar os ovos do nematóide

(De Leij *et al.*, 1992b; De Leij *et al.*, 1993; Kerry & Bourne, 2002). Por outro lado, durante o segundo experimento, a temperatura média foi de 22,1 °C, o que prolongou muito mais o ciclo de vida do nematóide do que do fungo, retardando a eclosão e favorecendo a atividade parasítica de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia*.

Quanto ao efeito das diferentes concentrações de clamidósporos testadas para o controle de *M. javanica* no primeiro experimento, não se observou maior redução do número de ovos por sistema radicular à medida que se aumentou a quantidade de clamidósporos. No entanto, todas as quantidades de clamidósporos diminuíram a multiplicação do nematóide, em comparação com a testemunha (Tabela 1). De Leij *et al.* (1992a, 1993) também estudaram o efeito de diferentes concentrações de clamidósporos de *P. chlamydosporia* no controle de *M. incognita* (Kofoid & White) Chitwood, contudo, nesses estudos, os autores aplicaram o antagonista no solo e, em seguida, transplantaram ou semearam o tomate. Somente quinze ou trinta dias após, infestaram o solo com os  $J_2$  do nematóide. Embora esses autores tenham observado a redução da população de *M. incognita*, principalmente nas quantidades de 5.000 a 50.000 clamidósporos / g de solo, *P. chlamydosporia* não preveniu a penetração dos  $J_2$  nas raízes das plantas. Esse antagonista é parasita facultativo de ovos e fêmeas de nematóide, portanto o modo como os testes são realizados poderá afetar os resultados obtidos para o controle do nematóide das galhas. Tal fato é sugerido porque em outro estudo, com esse mesmo isolado do antagonista (dado não publicado), também aplicado ao solo no momento do transplântio do tomate, na quantidade de 5.000 clamidósporos / g de solo e inoculação dos ovos do nematóide somente sete dias após, constatou-se baixa redução tanto do número de galhas como de ovos de *M. javanica*, quando comparado com a testemunha.

De Leij *et al.* (1993), ao utilizarem as quantidades de 500, 1.000, 5.000 ou 10.000 clamidósporos de *P. chlamydosporia* / g de solo no controle de *M. incognita* em plantas de tomate, crescidas em solo orgânico com textura arenosa, areia-franca ou solo arenoso, constataram que a maior quantidade de clamidósporos

resultou em menor população final de *M. incognita*, em comparação com outras quantidades de inóculo fúngico, somente em plantas cultivadas em solo orgânico.

Portanto, a reduzida diferença na redução do número de ovos de *M. javanica*, observada no primeiro experimento, entre as quantidades de 5.000 a 25.000 clamidósporos / g de solo de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia*, provavelmente ocorreu porque o substrato utilizado para a instalação dos experimentos foi apenas uma mistura de solo e areia 1:1 (v : v), sem adição de matéria orgânica. Nesse tipo de substrato, possivelmente as quantidades mais altas de inóculo de *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* resultaram em competição por nutrientes para germinarem e se estabelecerem no solo. Embora a presença de matéria orgânica no solo possa favorecer a germinação dos clamidósporos e o estabelecimento do fungo no solo (Stirling, 1991), a utilização de quantidades muito altas de inóculo de *P. chlamydosporia* pode ser inviável, considerando a aplicação do antagonista em escala comercial (Kerry, 2001).

Como foi observado, em ambos os experimentos, *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* reduziu efetivamente o número de ovos de *M. javanica*, quando aplicado na quantidade de 5.000 clamidósporos / g de solo, principalmente quando o fungo permaneceu maior tempo em contato com os ovos do nematóide no solo. Conclui-se que o aumento da exposição nematóide ao fungo será mais efetivo no grau de controle desse fitoparasita, em comparação com o aumento da quantidade de clamidósporos aplicada ao solo.

### Literatura Citada

- BOURNE, J.M. & B.R. KERRY. 2000. Observations on the survival and competitive ability of the nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium* in soil. *International Journal of Nematology*, 10 (1): 9-18.
- BOURNE, J.M. 2001. Making a soil suppressive to root-knot nematodes by applications of *Verticillium chlamydosporium*. *IOBC / WPRS Bulletin*, 24 (1): 25-30.
- BOURNE, J.M., B.R. KERRY & F.A.A.M. DE LEIJ. 1996. The importance of the host plant on the interaction between root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) and the nematophagous fungus, *Verticillium chlamydosporium* Goddard. *Biocontrol Science and Technology*, 6: 539-548.
- DE LEIJ, F.A.A.M. & B.R. KERRY. 1991. The nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium* as a potential biological control agent for *Meloidogyne arenaria*. *Revue de Nématologie*, 14 (1): 157-164.
- DE LEIJ, F.A.A.M., B.R. KERRY & J.A. DENNEHY. 1992a. The effect of fungal application rate and nematode density on the effectiveness of *Verticillium chlamydosporium* as a biological control agent for *Meloidogyne incognita*. *Nematologica*, 38: 112-122.
- DE LEIJ, F.A.A.M., B.R. KERRY & J.A. DENNEHY. 1993. *Verticillium chlamydosporium* as a biological control agent for *Meloidogyne incognita* and *M. hapla* in pot and micro-plot tests. *Nematologica*, 39: 115-126.
- DE LEIJ, F.A.A.M., J.A. DENNEHY & B.R. KERRY. 1992b. The effect of temperature and nematode species on interactions between the nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium* and root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). *Nematologica*, 38: 65-79.
- KERRY, B.R. & J.M. BOURNE. 2002. A Manual for Research on *Verticillium chlamydosporium*, a Potential Biological Control Agent for Root-knot Nematodes. IOBC, OILB, WPRS / SROP, 84 p.
- KERRY, B.R. 2001. Exploitation of the nematophagous fungal *Verticillium chlamydosporium* Goddard for the biological control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). In: BUTT, T.M., C. JACKSON & N. MAGAN (ed). *Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential*. CAB International, Wallingford, p. 155-167.
- KHAN, M.R., S.M. KHAN & F. MOHIDE. 2005. Root-knot nematode problem of some winter ornamental plants and its biomanagement. *Journal of Nematology*, 37 (2): 198-206.
- LOPES, E.A., S. FERRAZ, P.A. FERREIRA, L.G. FREITAS, O.D. DHINGRA, C.G. GARDIANO & S.L. CARVALHO. 2007. Potencial de isolados de fungos nematófagos no controle de *Meloidogyne javanica*. *Nematologia Brasileira*, 31 (2): 78-84.
- MAUCHLINE, T.H., B.R. KERRY & P.R. HIRSCH. 2002. Quantification in soil and the rhizosphere of the nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium* by competitive PCR and comparison with selective plating. *Applied and Environmental Microbiology*, 68 (4): 1.846-1.853.
- MORGAN-JONES, G., J.F. WHITE & R. RODRIGUEZ-KÁBANA. 1983. Phytonematode pathology: Ultrastructural studies. I. Parasitism of *Meloidogyne arenaria* eggs by *Verticillium chlamydosporium*. *Nematropica*, 13 (2): 245-260.
- MUKHTAR, T. & I. PERVAZ. 2003. *In vitro* evaluation of ovicidal and larvicidal effects of culture filtrate of *Verticillium chlamydosporium* against *Meloidogyne javanica*. *International Journal of Agriculture and Biology* 5 (4): 576-579 (Resumo).
- STIRLING, G.R. 1991. *Biological Control of Plant Parasitic Nematodes: Progress, Problems and Prospects*. CAB International, Wallingford, 282 p.

- TAYLOR, A.L. & J.N. SASSER. 1983. Biología, Identificación y Control de los Nematodos de Nódulo de la Raíz. (Especies de *Meloidogyne*). Universidad del Estado del Carolina del Norte, Raleigh, 111 p.
- VIAENE, N.M. & G.S. ABAWI, 2000. *Hirsutella rhossiliensis* and *Verticillium chlamydo sporium* as biocontrol agents of the root-knot nematode *Meloidogyne hapla* on lettuce. *Journal of Nematology*, 32 (1): 85-100.
- ZARE, R. & W. GAMS. 2004. A Monograph of *Verticillium* Section Prostrata. Rostaniha - Botanical Journal of Iran, 3 (Suplement), 188 p.

## Generation Time and Tuber Infection by *Meloidogyne chitwoodi* Race 1 and *M. hapla* on 'Russet Burbank' Potato in Field Microplots

João M. Charchar<sup>1\*</sup> & Gerald S. Santo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Embrapa Hortaliças, C. Postal 218, 70359-970 Brasília (DF) Brazil.

<sup>2</sup>Department of Plant Pathology, Washington State University (WSU), Irrigated Agriculture Research and Extension Center (IAREC), 99350, Prosser (WA) USA.

\*Corresponding author: charchar@cnph.embrapa.br

Received for publication on October 23, 2007. Accepted on August 14, 2008

Edited by Claudio Marcelo Oliveira

**Summary** – Charchar, J.M. & G.S. Santo. 2008. Generation time and tuber infection by *Meloidogyne chitwoodi* race 1 and *M. hapla* on 'Russet Burbank' potato in field microplots.

A field microplots experiment was conducted in an attempt to use soil temperature for predicting the number of generations (life cycle: egg to egg) and the tuber infections of *Meloidogyne chitwoodi* race 1 (MC1) and of *M. hapla* (MH) on 'Russet Burbank' potato. Four inoculation times with 25,000 eggs of MC1 and MH on potato roots were made separately, at intervals of 26, 28, and 32 days per microplot. MC1 and MH completed three generations (egg to egg) in the roots and one generation in the tubers of 'Russet Burbank' potato in 110 days. MC1 required 21, 28, and 28 days or 333, 378, and 491 degree days (base temperature 5 °C) and MH required 21, 24, and 21 days or 228, 204, and 263 degree days (base temperature 10 °C) after the first, second, and third inoculations, respectively, to complete their life cycles in the roots. MC1 and MH required 17 days or 242 and 157 degree days after the fourth inoculation, respectively, to complete their life cycles in the tubers. Tuber infection by MC1 was first observed in 77, 49, 35, and 17 days or 1,178; 750; 469 and 242 degree days; and by MH in 77, 56, 35, and 17 days or 793, 582, 324, and 157 degree days after inoculations. The total duration of the life cycles of MC1 and MH was of 57 and 65 days, when the nematodes completed 1.9 generations (909 degree days) and 1.7 generations (712 degree days) respectively in 110 days of experiment. Based on a growing season of 180 days in the Columbia Basin of Washington State, MC1 and MH could complete 3.2 and 2.8 generations respectively. In the end of the experiment, it was observed that MC1 caused more tuber damages than MH in the field.

**Key words:** *Solanum tuberosum*, root-knot nematodes, life cycle, biology.

**Resumo** – Charchar, J.M. & G.S. Santo. 2008. Número de gerações e infecção de tubérculos por *M. chitwoodi* raça 1 e *M. hapla* em batata 'Russet Burbank' em microparcelas de campo.

Um experimento de microparcelas no campo foi conduzido para determinar o efeito da temperatura do solo nos prognósticos do número de gerações (ciclo de vida: ovo para ovo) e da infecção de tubérculos por *Meloidogyne chitwoodi* raça 1 (MC1) e por *M. hapla* (MH) em batata 'Russet Burbank'. Quatro inoculações com 25.000 ovos de MC1 e MH foram feitas em raízes de batata separadamente, nos intervalos de 26, 28 e 32 dias por microparcela. MC1 e MH completaram três gerações nas raízes e uma geração nos tubérculos de batata 'Russet Burbank', em 110 dias. MC1 requereu 21, 28 e 28 dias ou 333, 378 e 491 graus dias (temperatura base 5 °C); MH requereu 21, 24 e 21 dias ou 228, 204 e 263 graus dias (temperatura base 10 °C) após a primeira, segunda e terceira inoculações, respectivamente, para completar seus ciclos de vida nas raízes. MC1 e MH requereram 17 dias ou 242 e 157 graus dias após a quarta inoculação respectivamente, para completar seus ciclos de vida nos tubérculos. A infecção de tubérculos por MC1 foi inicialmente observada aos 77, 49, 35 e 17

dias ou 1.178, 750, 469 e 242 graus dias; e por MH aos 77, 56, 35 e 17 dias ou 793, 582, 324 e 157 graus dias, após as inoculações. A duração total dos ciclos de vida de MC1 e MH foi de 57 e 65 dias, quando os nematóides completaram 1,9 gerações (909 graus dias) e 1,7 gerações (712 graus dias) respectivamente, em 110 dias de experimento. Baseado no ciclo vegetativo da batata 'Russet Burbank' de 180 dias no campo de Columbia Basin no estado de Washington (EUA), MC1 e MH poderiam completar 3,2 e 2,8 gerações respectivamente. No final do experimento, observou-se que MC1 causou maior dano nos tubérculos que MH, em condições de campo.

**Palavras-chaves:** *Solanum tuberosum*, nematóides de galhas, ciclo de vida, biologia.

## Content

The root-knot nematodes *Meloidogyne chitwoodi* Golden, O'Bannon, Santo & Finley (Columbia root-knot nematode) and *M. hapla* Chitwood (Northern root-knot nematode) are very important pests on potato (*Solanum tuberosum* L.) in the Pacific Northwest of United States because they cause tuber deformations that make them unmarketable (Santo & O'Bannon, 1981a). Many crops, including potato, are severely affected by *M. chitwoodi* and *M. hapla* in the Pacific Northwest, and many potato growers have their products rejected due to nematode infection and tuber galling (Griffin, 1985). Crop rotation programs to control *M. chitwoodi* in the Pacific Northwest are difficult, because wheat (*Triticum aestivum* L.) and corn (*Zea mays* L.), commonly used in rotation with potato, are also good hosts for this nematode (Santo & O'Bannon, 1981a). Penetration of *M. chitwoodi* and *M. hapla* on potato during the growing season is affected by soil temperatures in the Pacific Northwest (Santo & O'Bannon, 1981a; 1981b). Pinkerton *et al.* (1986) found that in commercial fields the first generation of *M. chitwoodi* produces egg masses at 1,000-1,100 degree days (base 5 °C) after planting the 'Russet Burbank' potato, and the second and third generations were completed in 1,600-1,700 degree days respectively. Soil temperature has a major influence on penetration, development, and reproduction of *M. chitwoodi* and *M. hapla*, and summer temperatures influence the number of generations of these nematodes per year (Santo & O'Bannon, 1981b). Since soil temperatures vary from one year to another, also the nematode infections on the tubers may vary as well (Santo, 1985). The objective of this paper was to determine the effect of soil temperature on the generation time and tuber infection by *M. chitwoodi*

race 1 (MC1) and *M. hapla* (MH) on 'Russet Burbank' potato in the field microplots.

A field microplots experiment was conducted from May 18 to September 1 of 1983 (110 days) in an attempt to use field soil temperature for predicting the number of generations (life cycle: egg to egg), and the tuber infections of MC1 and MH on 'Russet Burbank' potato. Nematode populations (MC1 and MH) used for the experiment were from Prosser (WA), isolated from 'Russet Burbank' potato (*Solanum tuberosum* L.). MC1 was raised on wheat (*Triticum aestivum* L. 'Nugaines') and the population of MH was maintained on pepper (*Capsicum annum* L. 'California Wonder') to keep pure populations. These two nematode species were also reared on tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) 'Columbia' on separate benches, in greenhouse conditions maintained at 20 - 26 °C, to be used as inocula. Plants in the greenhouse were watered as needed and fertilized with a granulated Osmocote (Joe Berger & Co., Renton, Washington) 14-14-14 (10 grams per pot). Nematode eggs for inocula were extracted from 65 day-old tomato plants by shaking the galled tomato roots in 0.5 % sodium hypochlorite for 4 minutes (Hussey & Barker, 1973), and the freed eggs were collected in a sieve with a 25 mm screen.

A row of 70 microplots was installed in an area of the Washington State University (WSU), Irrigated Agriculture Research and Extension Center (IAREC), in Prosser (WA), with the aid of a tractor PTO-driven gear-box powering an 80 cm diameter hollow auger which cuts 45 cm deep, leaving round grooves in the soil, allowing for the insertion of 80 cm diameter fiberglass cylinders, without disturbing the soil profile. The fiberglass was cut into strips 51.5 cm long and 137.5 cm wide. The overlapping edges of these

fiberglass strips were taped with duct tape to acquire a cylindrical shape. The fiberglass cylinders were pushed 45 cm deep into the groove leaving 10 cm above the surface. These microplots were installed in a sandy loam soil with 81.5 % sand, 12.9 % silt and 5.7 % clay. On March 18, 1983 all plots were fumigated with metham sodium (Vapam, Stauffer Chemical Company, Moses Lake-WA) at a rate of 935 liter per ha as drench for soil fumigation. Each microplot was drenched with 48 m<sup>3</sup> of Vapam in 13 l of water. On April 18, one month after soil fumigation, five 'Russet Burbank' potato seed pieces of same size were planted in each microplot.

During the experimental period, all the 70 microplots were irrigated once a week by a sprinkler system to a point for just keeping the soil wet to keep the plants alive. The potatoes were fertilized with ammonium sulfate NH<sub>4</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> at a rate of 1,600 kg / ha by incorporating 200 g / plot. The insecticide Sevin (Union Carbide Corporation, Research Triangle Park, North Carolina) was sprayed once a month at the rate of 1.12 kg of active ingredient per hectare (ai / ha) to control the colorado potato beetles.

The experiment started when the potato seedlings in the microplots were inoculated with eggs of the nematodes. Four inoculations with eggs of both nematode species were made (first, second, third, and fourth) on May 18, June 14, July 13, and August 15 of 1983 respectively. Inoculations were made by pouring 10 m<sup>3</sup> of water containing 5,000 eggs of MC1 and MH separately around the exposed root system of each potato seedling per microplot. Each microplot received totally 25,000 eggs of either MC1 or MH per inoculation. The subsequent inoculations were made when egg mass matrices were detected on the potato root systems or tubers of the previously inoculated plants. The numbers of days between inoculations were 26, 28, and 32, sequentially. After each inoculation, potato root systems and 2 - 3 tubers per microplot were harvested twice a week and analyzed for egg mass production. Potato root systems were carefully washed free of soil and placed in phloxin B solution to stain egg-mass matrices (Dickson & Struble, 1965). The tubers were also washed free of soil, carefully peeled, and thin slices were cut from

the tuber surface. The thin slices of tubers were stained with acid fuchsin-NaOCl technique (Byrd *et al.*, 1983) to assess females with egg masses.

Soil temperature was recorded at 2 hour intervals using an Omnidata datapod (model DP-212, Omnidata International, Inc., Logan, Utah) with two channels buried at 15 and 25 cm deep in the soil. The mean daily temperature at 15 cm varied between 18.5 and 22.5 °C and between 19.1 and 23.2 °C at 25 cm deep. The treatments were arranged in a complete randomized block design and replicated eight times for each nematode species per inoculation time. Six non-inoculated microplots served as controls. The variance analysis was based on Gomez & Gomez (1969), and the mean comparisons followed the Duncan's Multiple Range Test ( $P \leq 0.05$ ).

MC1 and MH completed three generations (life cycles: egg to egg) in the roots and one generation in the tubers of 'Russet Burbank' potato in field microplots in 110 days. MC1 required 21, 28, and 28 days or 333, 378, and 491 degree days (base 5 °C); and MH required 21, 24, and 21 days or 228, 204, and 263 degree days (base 10 °C) after the first, second, and third inoculations to complete their life cycles in the potato roots, respectively. Degree-days were calculated by converting the soil temperatures (maximum daily temperature + minimum daily temperature / 2) - base temperature  $\times$  number of days. Base temperatures used for MC1 and MH were 5 and 10 °C, respectively (Table 1). MC1 and MH required 17 days or 242 and 157 degree days after the fourth inoculation, respectively, to complete their life cycles in the tubers. Tuber infection by MC1 was first observed 77, 49, 35, and 17 days or 1,178; 750; 469; and 242 degree days and MH 77, 56, 35, and 17 days or 793, 582, 324, and 157 degree days after inoculation times (Table 1).

From May 18 (first inoculation time) to September 1 (first appearance of egg masses in the tuber) of 1983 (110 days), MC1 and MH were able to complete four generations based on the time of nematode egg inoculation to the first appearance of egg masses on roots and / or tubers (Table 1). The first, second, and third generations were completed in the roots within 21 to 28 days, and the fourth generation in the tubers

**Table 1** - Detection of egg masses of *Meloidogyne chitwoodi* race 1 (MC1) and *M. hapla* (MH) on Russet Burbank potato roots and tubers in the field microplots related to days and degree days

Nematode species	Inoculation date	Days for egg mass detection		Degree-days for egg mass detection <sup>1</sup>		Tuber infection rating <sup>1</sup>	Mean temperatures (°C) <sup>2</sup>	
		Roots	Tubers	Roots	Tubers		Min.	Max.
MC1	May 18	21	77	333	1,178	4.5 a	18.0	23.7
MH		21	77	228	793	3.3 b		
MC1	June 14	28	49	378	750	3.2 a	16.5	20.5
MH		24	56	204	582	1.9 b		
MC1	July 13	28	35	491	469	3.1 a	19.7	25.4
MH		21	35	263	324	2.1 b		
MC1	August 15	<sup>3</sup>	17	-	242	4.4 a	17.3	21.2
MH		-	17	-	157	2.5 b		
MC1	Mean	25.7	44.5	400.7	659.7	3.8 a	17.9	22.7
MH		22.0	46.2	231.7	464.0	2.4 b		

Values are means of eight replicates. Values not followed by the same letter are significantly different according to Duncan's Multiple Range Test ( $P \leq 0.05$ ).

<sup>1</sup>Ratings: 0= no nematode; 1 = 1-3; 2 = 4-5; 3 = 6-9; 4 = 10+ ; 5= 50+; 6 = 100+ nematodes per tuber.

<sup>2</sup>Soil temperatures were daily recorded at 15 and 25 cm deep.

<sup>3</sup>Nematode specimens not detected.

17 days, when the experiment had to be stopped because the plants died in the microplots (Charchar *et al.*, 1984). The number of generations actually occurring, however, was less than the reported by Griffin (1985) and Pinkerton *et al.* (1986). Egg embryogenesis at the time of inoculation and within egg masses were not taken into account in this study. Thus, an accurate determination of the length of the life cycles of MC1 and MH was not possible (Charchar *et al.*, 1984). However, using the data obtained from the embryonic studies (Charchar & Santo, 2001), an estimate was made on the actual number of generations that may occur on 'Russet Burbank' potato during the growing season. The average daily soil temperature recorded during the experiment period was from 17.9 to 22.7 °C (Table 1). Embryogenic studies showed that at 18 °C the development of MC1 and MH eggs from 1-2 celled stage to J<sub>2</sub> required 24 and 26 days, and from J<sub>2</sub> to egg mass initiation 33 and 39 days, respectively (Charchar, 1987; Charchar & Santo, 2001). The total duration of the cycles (egg to egg) of MC1 and MH was 57 and 65 days, respectively (Charchar, 1987). Thus, it was estimated that MC1 and MH completed 1.9 and 1.7 generations, which required 909 and 712 degree days for each generation respectively, in 110

days. Based on a growing season of 180 days in the Columbia Basin of Washington State, MC1 and MH would have completed 3.2 and 2.8 generations, respectively, if the potato plants had survived for 180 days in the microplots. This is consistent to what others have reported for MC1 (Griffin, 1985; Pinkerton *et al.*, 1986).

In Washington State, 'Russet Burbank' potatoes are often planted in late March to April, when soil temperatures are quite cool, ranging from 7 to 10 °C (Santo, 1985). Results presented in these and others studies (Santo & O'Bannon, 1981a; Pinkerton *et al.*, 1986) showed that cooler spring temperatures favor more MC1 than MH. Regardless of when inoculations of MC1 and MH were made, females of either species with egg masses were not detected in tubers at least 77 days (MC1 1,178 degree days; MH 793 degree days) after the first inoculation (Table 1). Prior to this time no nematodes were detected within tubers, even though, tuber formation was observed 40 - 45 days after planting.

Tuber infection rating determined after harvest in the end of the experiment showed that MC1 caused more ( $P \leq 0.05$ ) severe tuber damage than MH (Table 1). This is probably due to the fact that the average soil temperatures during the experiment (17.9 to 22.7



°C) were within the infective and development limits of MC1, but not always within the optimal range of MH. Others comparisons have shown that MC1 is able to tolerate lower temperatures than MH in the Pacific Northwest (Santo & O'Bannon, 1981b; Pinkerton *et al.*, 1986). Results presented here confirmed these findings showing that MC1 was able to penetrate, develop, reproduce, and hatch at lower temperatures than MH. Thus, environmental conditions present in the potato growing areas of the Pacific Northwest tend to favor the MC1 over MH. It is probably the major reason why MC1 is economically more important on potatoes in the Pacific Northwest of the USA.

#### Literature Cited

- BYRD, D.W.JR., T. KIRKPATRICK & K.R. BARKER. 1983. An improved technique for clearing and staining plant tissues for detection of nematodes. *Journal of Nematology*, 15 (1): 142-143.
- CHARCHAR, J.M. 1987. Effect of temperature on the life cycle of *Meloidogyne chitwoodi* races 1 and 2 and *M. hapla* on Russet Burbank potato (PhD dissertation) Washington State University, Pullman (WA) EUA. 68 p.
- CHARCHAR, J.M. & G.S. SANTO. 2001. Effect of temperature on the embryogenic development and hatching of *Meloidogyne chitwoodi* races 1 and 2 and *M. hapla*. *Nematologia Brasileira*, 25 (1): 71-77.
- CHARCHAR, J.M., G.S. SANTO & J.H. O'BANNON. 1984. Life cycle of *Meloidogyne chitwoodi* and *M. hapla* on potato in controlled temperature tanks and microplots. International Congress of Nematology, I, Guelph, Ontario, Canadá, p.18.
- DICKSON, D.W. & F.B. STRUBLE. 1965. A sieving-staining technique for extraction of egg mass of *Meloidogyne incognita* from soil. *Phytopathology*, 55 (5): 497 (Abstract).
- GOMEZ, K.A. & A.A. GOMEZ. 1969. Statistical procedures for agriculture research. 2<sup>nd</sup> edition. John Wiley and Sons, New York, 680 p.
- GRIFFIN, G.D. 1985. Host-parasite relationship of *Meloidogyne chitwoodi* on potato. *Journal of Nematology*, 17 (4): 395-399.
- HUSSEY, R.S. & K.R. BARKER, 1973. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. *Plant Disease Reporter*, 57 (12): 1.025-1.028.
- PINKERTON, J.N., G.S. SANTO & H. MOJTAHEDI. 1986. Population dynamic of *Meloidogyne chitwoodi* in relation to Russet Burbank potato tuber penetration. *Journal of Nematology*, 18 (4): 627 (Abstract).
- SANTO, G.S. 1985. Managing root-knot nematode problems in the Pacific Northwest. Annual North American Seed Potato Seminar, IV. Proceedings, 3: 9-10.
- SANTO, G.S. & J.H. O'BANNON, 1981a. Ecology of root-knot nematodes on Russet Burbank potato in Washington. *Journal of Nematology*, 13 (4): 459-460.
- SANTO, G.S. & J.H. O'BANNON, 1981b. Effect of soil temperature on the pathogenicity and reproduction of *Meloidogyne chitwoodi* and *M. hapla* on Russet Burbank potato. *Journal of Nematology*, 13 (4): 483-486.