



**LILIAN SIMARA ABREU SOARES COSTA**

**PERSPECTIVAS DE SUPRESSIVIDADE E  
QUALIDADE DO INÓCULO RIZOSFÉRICO DE  
*Meloidogyne exigua* NO CAFEIEIRO EM ALGUNS  
PERÍODOS DO ANO**

**LAVRAS – MG**

**2010**

**LILIAN SIMARA ABREU SOARES COSTA**

**PERSPECTIVAS DE SUPRESSIVIDADE E QUALIDADE DO INÓCULO  
RIZOSFÉRICO DE *Meloidogyne exigua* NO CAFEIEIRO EM ALGUNS  
PERÍODOS DO ANO**

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

Orientador

Dr. Vicente Paulo Campos

**LAVRAS – MG**

**2010**

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

Costa, Lilian Simara Abreu Soares.

Perspectivas de supressividade e qualidade do inóculo rizosférico de *Meloidogyne exigua* no cafeeiro em alguns períodos do ano / Lilian Simara Abreu Soares Costa. – Lavras : UFLA, 2010. 64 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2010.  
Orientador: Vicente Paulo Campos.  
Bibliografia.

1. Café. 2. Nematóide. 3. Controle biológico. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 632.96

**LILIAN SIMARA ABREU SOARES COSTA**

**PERSPECTIVAS DE SUPRESSIVIDADE E QUALIDADE DO INÓCULO  
RIZOSFÉRICO DE *Meloidogyne exigua* NO CAFEIEIRO EM ALGUNS  
PERÍODOS DO ANO**

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

APROVADA em 6 de agosto de 2010.

Dr. Ricardo Magela de Souza

UFLA

Dra. Sônia Maria de Lima Salgado

EPAMIG

Dr. Vicente Paulo Campos

Orientador

**LAVRAS – MG**

**2010**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela proteção e a vida e por todas as suas bênçãos.

A Sta. Teresinha cujo espírito gentil impregnou cada página deste capítulo.

Ao conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Prof. Dr. Vicente Paulo Campos, pela orientação, conselhos e conhecimentos transmitidos, estímulo, amizade e exemplo de profissionalismo.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia, pela formação acadêmica e apoio.

Ao funcionário Tarlei pelo valioso auxílio na avaliação dos trabalhos e pela sua paciência e bons conselhos e ao Cleber, Pedro e a Sônia pelos auxílios laboratoriais, convivência e amizade.

Aos colegas de trabalho, Renata, Eduardo, Alex, Maria Clara e Davi, pelo grande auxílio e dedicação durante a condução dos experimentos e pela valiosa amizade, que contribuíram para realização deste trabalho. Especialmente aos “amigos para os quais qualquer hora é hora, seja no trabalho ou na descontração (colegas do curso de Mestrado). E aos amigos distantes, porém, amigos (Hercules, Fernando, Fátima e José Mauro).

Aos alunos da iniciação científica e estagiários do Laboratório de Nematologia, Willian, Márcia, Júlio e Marina, obrigada pela amizade e convivência.

Aos demais colegas e funcionários do Departamento de Fitopatologia pelo apoio e paciência, e aos funcionários responsáveis pela limpeza (Elenice), pela amizade, preocupação e descontração nas horas vagas.

E a todos os meus familiares e irmãos Stella, Livia e Rinaldi em especial aos meus pais Maria e Luiz Alberto, sem vocês: pode esquecer.

## RESUMO

O ovo nos nematóides sofre o processo de embriogênese, com diversas fases, constituindo o estágio de sobrevivência desse organismo no campo. Todas as fases da embriogênese bem como a eclosão do juvenil do segundo estágio (J2) sofrem a influência da temperatura. Os ovos também sofrem os efeitos da microflora da rizosfera a qual também vai afetar o sítio de alimentação de *Meloidogyne* sp. podendo levar à supressividade de sua população na rizosfera da planta. Entretanto outros fatores podem estar envolvidos na supressão de populações de fitonematóides no campo, como fatores físicos do solo e matéria orgânica. Numa rizosfera estável como na cultura cafeeira (planta perene) a investigação de fatores supressivos durante as diversas estações do ano podem caracterizar o potencial de dano e prejuízo ao cafeeiro pelo inóculo rizosférico de *Meloidogyne exigua*. Em amostras representativas da rizosfera cafeeira de duas cidades (Lavras e Varginha, MG) avaliou-se o número de galhas, produção de ovos, eclosão de (J2) e desenvolvimento embrionário. Embora os parâmetros avaliados tenham variado bastante entre os dois locais de amostragem e períodos de coleta de amostras (I, II, III e IV) destaca-se o número maior de galhas e produção de ovos ( $P \leq 0,05$ ) nos períodos de dezembro/janeiro (III) e março/abril (IV) comparadas aos demais períodos de coleta (junho/julho-I e setembro/outubro-II). Contudo, foi mais elevada (entre 56 a 60%) a eclosão de J2 nas amostras colhidas em I (56% a 60%) seguida daquelas colhidas em IV (entre 13,4% a 22%) e mais baixas nos períodos II e III (0,6% a 5,6%), nos cafezais das duas cidades amostradas. Menor número de J2 foi encontrado nos ovos nos períodos II e III de amostragem, podendo constituir-se em indicativo de supressividade de *M. exigua* na rizosfera cafeeira.

Palavras-chave: *Meloidogyne exigua*. Supressividade. Café.

## ABSTRACT

In the egg of the nematodes undergoes the embryogenesis involving different phases and the egg is the survival stage of this organism in the field. All of embryogenesis phases as well as second stage juvenil (J2) hatching are influenced by temperature. Also eggs suffer the effect of rhizosphere microflora which affects the feeding site of *Meloidogyne* sp. leading to its population suppressiveness by plant rhizosphere. However, other factors may be involved in the suppressiveness of plant-parasitic nematodes in the field such as physical factors, organic matter and soil microbiota. On the stable rhizosphere as in coffee crop (pereneal plant) the investigation of suppressive factors during the seasons of the year may bring about the damage and loss potentials to coffee by *M. exigua* rhizosphere inoculum. From representative samples (galled roots) taken from coffee rhizosphere at two towns (Lavras and Varginha) on Minas Gerais state, Brazil, were evaluated galls and egg numbers per gram of root as well as second stage juvenil (J2) hatching and embryonic development from the eggs. Although these parameters varied, considerably, among two sampling places (towns) and sampling times (I, II, III, IV), the number of gall and egg production were consistently high ( $P \leq 0,05$ ) on coffee root taken on december/january (III) and march/april (IV) compared to other sampling times (june/july-I and september/october-II). However, the J2 hatching percentage was highest on samples taken at I (56% to 60%) followed by sampling at IV (between 13,4% and 22%) and lowest ( $P \leq 0,05$ ) on sampling at II and III (0,6% to 5,6%) on both towns of sampled coffee plantations. Lower number of J2 was found inside eggs at sampling times II and III which may be an indication of *M. exigua* suppressiveness on coffee rhizosphere.

Keywords: *Meloidogyne exigua*. Suppressiveness. Coffee.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Número total de ovos e porcentagem de eclosão de juvenil de segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne exigua</i> em 4 períodos de amostragem (I, II, III e IV) em cafezais de Lavras e Varginha, MG.....	44
Figura 2	Número de ovos/grama de raiz e eclosão total de juvenis de segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne exigua</i> em 4 períodos de amostragem em cafezais de Lavras e Varginha, MG.....	45
Figura 3	Agrupamento das fases do desenvolvimento embrionário dentro dos ovos extraídos de raízes (30g) de cafeeiros de Lavras e Varginha, MG infestados por <i>Meloidogyne exigua</i> , em 4 períodos (I, II, III e IV) do ano.....	48
Figura 4	Agrupamento das fases de desenvolvimento embrionário dentro dos ovos extraídos de raízes dos cafeeiros de Lavras e Varginha, MG infestados por <i>Meloidogyne exigua</i> colhidos: A e B) em dez/jan (III) e C e D) em março/abril (IV). As avaliações foram feitas antes da montagem da câmara de eclosão e 10 dias após, constituindo assim os ovos que não eclodiram.....	51



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Número de galhas e eclosão de juvenil de segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne exigua</i> em 30 gramas de raiz de cafezal infestado nos municípios de Lavras, MG e Varginha, MG em 4 períodos do ano.....	43
Tabela 2	População de ovos, eclosão de juvenis de segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne exigua</i> e número de galhas em 30 gramas de raiz de cafezal infestado em 4 períodos de amostragem.....	43
Tabela 3	População de ovos, eclosão de juvenil de segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne exigua</i> e número de galhas em 30 gramas de raiz de cafezais infestados das cidades de Lavras e Varginha, MG.....	46
Tabela 4	Porcentagem de ovos em diversas fases de desenvolvimento embrionário em 30 gramas de raízes galhadas colhidas em 4 períodos do ano em cafezais de Lavras e Varginha, MG., Brasil.....	47
Tabela 5	Desenvolvimento embrionário dentro dos ovos de <i>Meloidogyne exigua</i> , extraídos de raízes de cafezais em amostras colhidas em dez/jan (III) antes e após o encerramento do período estabelecido para a eclosão (10 dias).....	49
Tabela 6	Desenvolvimento embrionário dentro dos ovos de <i>Meloidogyne exigua</i> extraídos de raízes de cafezais em amostra colhida em mar/abr (IV) antes e após o encerramento do período estabelecido para a eclosão (10 dias).....	50
Tabela 7	População de <i>Meloidogyne exigua</i> em uma única galha na rizosfera de cafezal infestado nas cidades de Lavras e Varginha, MG, em 4 períodos do ano (I, II, III, IV).....	52
Tabela 8	População de <i>Meloidogyne exigua</i> em uma única galha da rizosfera cafeeira infestada, em 4 períodos de amostragem....	53
Tabela 9	População de <i>Meloidogyne exigua</i> em uma única galha da rizosfera cafeeira infestada em cafezais das cidades de Lavras e Varginha – MG.....	54

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

H.	Heterodera
M.	Meloidogyne
MG	Minas Gerais
NaOH	Soda cáustica

## **LISTA DE SIGLAS**

ANOVA	Análise de variância
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
SISVAR	Sistema para análise de variância

## LISTA DE SÍMBOLOS

≤	Menor ou igual
%	Porcentagem
C	Centígrados
cm	Centímetros
g	Gramas
J2	Juvenil de segundo estágio
ml	Mililitros
sp	Uma espécie do gênero
spp	Várias espécies do gênero

## SUMÁRIO

	<b>CAPÍTULO 1 Introdução geral.....</b>	<b>13</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>16</b>
<b>2.1</b>	<b>O ovo, a embriogênese e a eclosão de <i>Meloidogyne sp.</i>.....</b>	<b>16</b>
<b>2.2</b>	<b>Temperatura no desenvolvimento embrionário e na eclosão de juvenis do segundo estágio (J2) de <i>Meloidogyne spp.</i>.....</b>	<b>17</b>
<b>2.3</b>	<b>A massa de ovos e a sua microflora residente.....</b>	<b>18</b>
<b>2.4</b>	<b>O sítio de alimentação de <i>Meloidogyne sp.</i> e a interação com micro-organismos do solo.....</b>	<b>19</b>
<b>2.5</b>	<b>Solos supressivos.....</b>	<b>22</b>
<b>3</b>	<b>CONSIDERAÇÕES GERAIS.....</b>	<b>26</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>27</b>
	<b>CAPÍTULO 2 Perspectivas de supressividade e qualidade do inóculo rizosférico de <i>Meloidogyne Exigua</i> no cafeeiro em alguns períodos do ano.....</b>	<b>34</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>36</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>39</b>
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>42</b>
<b>4</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>58</b>
<b>5</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>59</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>60</b>
	<b>ANEXO.....</b>	<b>64</b>

## CAPÍTULO 1

### INTRODUÇÃO GERAL

#### 1 INTRODUÇÃO

Os nematóides de galhas (*Meloidogyne* sp) produzem cerca de até 2500 ovos por fêmea, constituindo o inóculo mais abundante dentre os fitonematóides. Esse inóculo, contudo sofre efeitos da temperatura e da microbiota da rizosfera. Embora a temperatura tenha sido muito estudada (CAMPOS; CAMPOS; POZZA, 2008; DECKER, 1989; LIMA; FERRAZ, 1985) os efeitos da microbiota da rizosfera ainda não foram adequadamente estudados na população de ovos de *Meloidogyne* sp principalmente de *M. exigua*.

*Meloidogyne exigua* é a espécie do nematóide de galhas mais disseminado nas Américas, principalmente no Brasil (CAMPOS; VILLAIN, 2005). No Sul de Minas, aproximadamente 22% das propriedades cafeeiras estão infestadas por esse patógeno (CASTRO et al., 2008).

A condição perene da cultura cafeeira permanecendo no campo por mais de 20 anos (VIEIRA, 2008), submete a população de *Meloidogyne exigua* aos efeitos variados de temperatura, umidade e microflora nas diferentes estações do ano. Variações na população de *M. exigua* no campo têm sido constatadas (ALMEIDA; CAMPOS; LIMA, 1987; HUANG; SOUZA; CAMPOS, 1984; MAXIMIANO et al., 2001; SOUZA; BRESSAN-SMITH, 2008). Porém, a temperatura e umidade não só afetam a fisiologia de *Meloidogyne* sp, como a embriogênese, produção de ovos, eclosão de juvenil de segundo estágio (J2), formação de galhas e causando morte de embriões (LIMA; FERRAZ, 1985; SANTOS; FERRAZ, 1977; TRONCONI et al., 1986), mas também afeta o cafeeiro ao interferir nas relações planta-nematóide. Por exemplo, a emissão de

raízes novas é drasticamente reduzida nos períodos de baixa temperatura (abril a setembro) (RENA; MAESTRI, 1986) diminuindo a possibilidade do J2 encontrar local de penetração, levando-o à perda de energia corporal e incapacitando-o ao parasitismo (ROCHA; CAMPOS; SOUZA, 2010). Também nesse período, a temperatura do solo inferior a 20° C impede a penetração.

Moléculas tóxicas a nematóides solúveis em água e voláteis de diversas origens, mas principalmente oriundas do crescimento fungico e bacteriano, resultante da degradação de resíduos vegetais e mesmo pela produção de exsudatos radiculares ocorrem com frequência na natureza (AMARAL et al., 2009; CAMPOS; PINHO; FREIRE, 2010).

A microflora (fungos e bactérias) do solo bem como dos ovos e fêmeas de *Meloidogyne* sp. tem sido estudada em várias culturas (BARRON, 1977; GRAY, 1987, 1988a, 1988b; JANSSON; NORDBRING-HERTZ, 1988; KERRY, 1984; KERRY; EVANS, 1996; MORGAN-JONES; RODRIGUES-KABANA, 1988; POINAR JUNIOR; JANSSON, 1988). Entretanto, a rizosfera do cafeeiro tem merecido pouca atenção. Fungos e bactérias antagonistas isolados de outras culturas foram utilizados em estudos sobre controle de *M. exigua* do cafeeiro (AMARAL et al., 2009; CAMPOS; CAMPOS, 1997; OLIVEIRA et al., 2007, 2009), tendo sido demonstrado que moléculas produzidas por fungos e bactérias são tóxicas a *M. exigua*, afetando assim a população desse nematoide.

Ainda não se correlacionou a incidência de componentes da microflora cafeeira à redução de população de *M. exigua* no campo. Mas tem-se provado o aumento na virulência de *M. exigua* em algumas localidades (MUNIZ et al., 2009).

O estudo da qualidade do inóculo de *M. exigua* na rizosfera cafeeira poderá expandir o conhecimento sobre a redução de inóculo (juvenil de segundo estágio-J2) principalmente no final da primavera e durante o verão (SOUZA;

BRESSAN-SMITH, 2008), além de sugerir critérios para se definir fatores de supressividade que poderão auxiliar o produtor no sentido de evitar o uso de nematicida em rizosfera cafeeira supressiva a *M. exigua*. Também não se estudou ainda o efeito rizosférico do cafeeiro na qualidade do inóculo de *M. exigua* nas diversas estações do ano.



## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 O ovo, a embriogenese e a eclosão de *Meloidogyne* sp.

O ovo de *Meloidogyne* sp. possui uma camada quitínica (casca) formada por 30% de quitina e 50% de proteína e uma camada lipídica abaixo dela (BIRD; BIRD, 1998) que consiste na principal barreira à permeabilidade da casca do ovo. A camada lipídica em *Meloidogyne* sp. é formada de duas ou três membranas lipoprotéicas (JONES; TYLKA; PERRY, 1998).

A embriogenese de *Meloidogyne* sp. ocorre dentro do ovo, iniciando-se pela multiplicação celular e, em seguida, pela movimentação das células na formação do embrião e passando-se pelas fases mórula, blástula e gástrula. No início da formação do juvenil, ocorre a fase denominada *tadpole*, seguida da formação do juvenil do primeiro estágio, ocorrendo, então, a primeira ecdise dentro do ovo e o juvenil passa para o segundo estágio, que eclode do ovo (BIRD, 1972). Todos os ovos são depositados numa massa de ovos, os quais podem ser parcialmente imersos na galha produzida pelo hospedeiro suscetível em resposta à indução por *Meloidogyne* spp.

Dentro dos ovos, os juvenis de segundo estágio (J2) são protegidos de fatores ambientais extremos (JONES; TYLKA; PERRY, 1998). Após a eclosão em temperatura de 28°C, o J2 perde a infectividade após 6-10 dias (DUTRA et al., 2006).

O evento inicial do processo de eclosão é a alteração na permeabilidade da membrana abaixo da casca, permitindo a entrada de água e a conseqüente hidratação do juvenil dentro do ovo (JONES; TYLKA; PERRY, 1998). O J2 começa a se movimentar dentro do ovo e assim destrói as membranas da camada lipídica, ficando exposto ao efeito de moléculas tóxicas do meio ambiente.

## 2.2 Temperatura no desenvolvimento embrionário e na eclosão de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne* spp.

A temperatura é um fator que tem influenciado consideravelmente a capacidade de penetração de J2 de várias espécies de *Meloidogyne* (GOURD; SCHMITT; BARKER, 1993). A temperatura durante o desenvolvimento de embriões dentro dos ovos também pode influenciar drasticamente a habilidade do J2 de *Meloidogyne* de infectar seu hospedeiro (VRAIN, 1978).

A duração do ciclo de vida do *Meloidogyne* é alterada pela temperatura devido ao efeito cumulativo nas diversas fases do desenvolvimento embrionário dentro do ovo, bem como na eclosão e na mobilidade do J2 (CAMPOS et al., 2001; LEE; ATKINSON, 1977). O período de tempo requerido para a ontogenia e reprodução de *Meloidogyne* sofre maior influência da temperatura do ambiente do que qualquer outro fator abiótico (NOE, 1991). A temperatura ideal para o desenvolvimento da maioria das espécies de *Meloidogyne* está entre 15 e 30° C (DECKER, 1989; WALLACE, 1971). De modo geral, o ciclo de vida é completado em 25 dias à temperatura de 27° C (AGRIOS, 1997). Mas pode tornar-se mais longo em temperaturas mais elevadas ou mais baixas (DECKER, 1989). Em alguma fase de desenvolvimento do nematoide, os efeitos acumulativos causados pelo fator temperatura, podem interferir no tempo necessário para completar o seu ciclo de vida (CAMPOS et al., 2001). Nos trabalhos com *M. exigua*, Lima e Ferraz (1985) observaram um desenvolvimento embrionário *in vitro* lento a 15 ° C em comparação às temperaturas de 20, 25 e 30° C, onde 50% dos embriões dentro dos ovos morreram. Santos e Ferraz (1977) observaram boa eclosão de J2, *in vitro*, a 25° C e menor a 15, 20 e 30° C. Após a inoculação de mudas de café arábica “Catuai Vermelho” com *M. exigua*, Tronconi et al. (1986) observaram correlação positiva entre o número de galhas no sistema radicular e a temperatura do ar a qual foi mantida constante em 16,

20, 24 e 28° C. Nesse estudo, a reprodução do nematoide foi maior a 20 e 24° C comparada com 16 e 28° C.

### **2.3 A massa de ovos e a sua microflora residente**

As massas formadas pelos ovos embebidos em matriz gelatinosa nas raízes do cafeeiro representam apenas parte dos ovos produzidos pelas fêmeas de *Meloidogyne exigua*, as quais ficam expostas à colonização por organismos. Acredita-se que a função da substância gelatinosa seja a de proteção dos ovos contra antagonistas. Inibidores de crescimento de bactérias comuns da rizosfera têm sido encontrados nos compostos da matriz gelatinosa (NIBLACK; KARR, 1994; SHARON; ORION; SPIEGEL, 1993). Por outro lado, a substância gelatinosa estimulou o parasitismo de ovos de *Heterodera schachtii* pelo fungo *Pochonia chlamydosporia* (IRVING; KERRY, 1986) e o fungo *Scytalidium* sp. proliferou em massas de ovos antes de parasitar ovos de *Meloidogyne* ou fêmeas (OKA et al., 1997). Dentro da raiz, a matriz gelatinosa causa lise dos tecidos onde a fêmea fica embebida, formando um canal através do qual os ovos alcançam a superfície (ORION; LOOTS; ORION, 1987). Apesar de pouco conhecida, glicoproteínas, polissacarídeos, enzimas, lectinas, alto níveis de galactose e N-acetil glucosamina têm sido encontrados na composição da substância gelatinosa (IBRAHIM, 1991; SHARON; ORION; SPIEGEL, 1993), podendo constituir-se em nutriente para o crescimento de fungos e bactérias.

A função inibidora ou fonte nutricional da substância gelatinosa envoltória dos ovos de *Meloidogyne* deve se tornar um fator de seleção ou de estímulo ao crescimento de micro-organismos na massa de ovos, propiciando, assim, o crescimento de microflora diversificada em cada rizosfera. Além disto, a produção de exsudato radicular estimula ainda mais a diversificação dessa microflora em cada rizosfera (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Essa microflora

resultante pode ser antagonica ao nematoide, ou inibir o crescimento de organismos importantes ao controle biológico de nematóides; entre eles, os fungos parasitas de ovos, fazendo com que o controle biológico por patógenos de *Meloidogyne* seja ineficaz. A microflora da matriz gelatinosa tem sido largamente ignorada como um fator de influência do parasitismo de ovos dos nematoides (KOK; PAPERT; KOK-A-HIN, 2001).

A microflora da matriz gelatinosa poderá produzir substâncias solúveis em água ou voláteis tóxicos a *Meloidogyne spp*, ou inibir o crescimento de outros residentes (fungos ou bactérias), além do parasitismo de ovos ou de fêmeas já amplamente estudados (BARRON, 1977; GRAY, 1987, 1988a, 1988b; JANSSON; NORDBRING-HERTZ, 1988; KERRY, 1984; KERRY; EVANS, 1996; MORGAN-JONES; RODRIGUES-KABANA, 1988; POINAR; JANSSON, 1988).

#### **2.4 O sítio de alimentação de *Meloidogyne sp.* e a interação com micro-organismos do solo**

O sedentarismo de fêmeas de *Meloidogyne sp.* estabelecido no sítio de alimentação do xilema e células parenquimáticas provoca mudanças significativas na morfologia, anatomia e bioquímica da planta hospedeira, caracterizando provavelmente o maior sítio de interação entre agentes patogênicos (MAI; ABAWI, 1987). Células gigantes induzidas por *Meloidogyne* permanecem em um estado de alta atividade metabólica através da estimulação contínua pelo nematoide (WEBSTER, 1975). Elas contêm máximo DNA, RNA e fotoassimilados cerca de três a quatro semanas depois da infecção (BIRD, 1972). Concentrações de açúcares também são maiores durante as fases tardias da infecção (WANG; BERGESON, 1974). As concentrações de hemicelulose, ácidos orgânicos, aminoácidos livres, proteínas e lipídeos são muito mais

elevadas nas células gigantes. Este meio enriquecido beneficia os fungos patogênicos em suas interações com os nematoides das galhas (KHAN; WAJI, 1993).

De acordo com Mai e Abawi (1987), em condições naturais, as raízes das plantas são constantemente expostas a diversos micro-organismos do solo. Dessa forma, raramente estão sujeitas ao ataque de um único agente patogênico. Tal assertiva já havia sido mencionada por outros autores (FAWCETT, 1931; POWELL, 1971).

A grande diversidade de organismos do solo incluindo micro-organismos e nematoides possibilita o surgimento de muitas interações na zona das raízes. Assim, vários pesquisadores têm concluído que muitas doenças radiculares têm etiologia complexa (MAI; ABAWI, 1987). De fato, a atuação conjunta de dois ou mais patógenos pode resultar em efeito aditivo ou sinérgico no hospedeiro, originando as chamadas doenças complexas (PITCHER, 1965; POWELL, 1963, 1971; POWELL; NUSBAUM, 1960).

A participação de nematoides em doenças complexas com fungos e outros patógenos tem sido amplamente revisada (PITCHER, 1965; POWELL, 1963, 1971). Entre os nematoides fitoparasitas envolvidos em doenças com outros patógenos, destacam-se os endoparasitas sedentários e, dentre estes, as espécies de *Meloidogyne* são as mais pesquisadas (POWELL, 1971).

A alimentação dos nematoides provoca danos físicos à planta hospedeira e também fornece caminho para a rápida e direta entrada de bactérias patogênicas, especialmente quando o patógeno não quebra as barreiras mecânicas do hospedeiro. Alimentação contínua do nematoide também expõe uma maior superfície para a colonização. A disponibilidade de células necróticas na raiz também fornece rápido estabelecimento e, a partir daí, os patógenos bacterianos são capazes de invadir tecidos saudáveis circundantes. Ferimentos de raízes podem ter alguns efeitos indiretos. Por exemplo, pode aumentar a

exsudação radicular padrão e influenciar positivamente a microflora da rizosfera de tal forma que as bactérias patogênicas são estimuladas. Contudo, o papel dos nematoides em doenças envolvendo bactérias patogênicas é complexo na sua natureza e não está completamente elucidado (SITARAMAIAH; SINGH, 1990).

Nas interações envolvendo nematoides e bactérias, a severidade foi sempre maior quando as plantas foram infectadas com nematoides vários dias ou semanas antes da exposição a bactérias patogênicas do que quando foram infectados com ambos os organismos simultaneamente (JOHNSON; POWELL, 1969; SITARAMAIAH; SINHA, 1984a, 1984b). Isto demonstra que, embora o dano físico desempenhe um papel importante, este não pode explicar completamente a predisposição das plantas a patógenos bacterianos (SITARAMAIAH; SINGH, 1990).

Modificações no tecido do hospedeiro atacado por nematoide endoparasita podem ser de natureza local ou sistêmica. Powell e Nusbaum (1960) foram os primeiros a demonstrar que a modificação da planta hospedeira, devido à infestação por nematoide, proporciona uma vantagem aos fungos patogênicos, e também favorece o estabelecimento de bactérias fitopatogênicas. Johnson e Powell (1969) mostraram que os nematoides de galhas agiam como modificadores, infestando os tecidos de tal forma que as células em torno dos tecidos infestados se tornaram mais adequadas para colonização bacteriana.

As raízes infectadas com *Meloidogyne* spp. são nutricionalmente mais ricas do que as não infectadas. As raízes galhadas contêm mais aminoácidos, auxinas, substâncias promotoras de crescimento, RNA, DNA e fósforo do que uma raiz sadia. Estas substâncias promovem a multiplicação de bactérias patogênicas. Observações histológicas revelaram a presença de bactérias se multiplicando em inclusões dentro de células gigantes em plantas que receberam nematoides três a quatro semanas antes da inoculação com bactérias. Observações histológicas também foram realizadas em raízes de berinjela

inoculadas com *M. javanica* duas a três semanas antes da inoculação de *Ralstonia solanacearum* biótipo 3. Extensas cavidades em células corticais e endodérmica foram observadas (SITARAMAIAH; SINHA, 1984b). Dessa forma, os nematoides formadores de galhas predispõem as raízes à invasão bacteriana e colonização.

## **2.5 Solos supressivos**

Solos supressivos são aqueles nos quais uma determinada população de patógeno apresenta, na presença de um hospedeiro, um nível baixo comparado com o nível médio de uma infecção. A inospitabilidade natural destes solos aos patógenos pode ser descrita de três formas: o patógeno não se estabelece; ele se estabelece, mas não causa a doença; ou o patógeno se estabelece, causa doença, mas a severidade é reduzida com a monocultura (BAKER; COOK, 1974).

A ocorrência natural de solos supressivos tem sido documentada em vários sistemas de produção, sendo que, em várias instâncias, os atributos biológicos têm sido identificados como fatores contribuintes. Enquanto os estudos têm contribuído para o entendimento dos mecanismos de supressividade, dificuldades significativas têm sido encontradas para a transferência do conhecimento em técnicas reais de controle dos patógenos no campo. Os primeiros esforços concentraram-se na aplicação massiva de uma única espécie ou uma mistura delas constatadas e isoladas de áreas supressivas após suas produções massais. Entretanto, a introdução de agentes de controle em ecossistemas de solo não nativos tem alcançado níveis inconsistentes de controle. Por último, grande ênfase tem se dado na manipulação dos sistemas de produção para beneficiar o desenvolvimento dos micro-organismos benéficos da rizosfera visando à supressão dos patógenos de solo. Uma estratégia é cultivar várias espécies de plantas ou incorporar resíduos orgânicos no solo, reforçando

as comunidades de rizobactérias (MAZZOLA, 2007). Porém práticas agrícolas podem quebrar a supressividade natural de solos dentro do sistema de produção com o seu uso para a produção. McSorley et al. (2006), estudando a supressão do nematoide de galhas *Meloidogyne incognita* em diferentes tipos de solos naturais comparados com os correspondentes em campos de produção, constataram uma menor população do fitonematoide na maioria dos solos naturais em relação aos mesmos solos submetidos aos sistemas intensivos de produção.

Os estudos com controle biológico de fitopatógenos de solos vêm sendo realizados principalmente com fungos e bactérias, sendo pouco explorado o potencial de outros organismos. Mesmo com importante papel, devido ao maior número, estes organismos não são os únicos responsáveis pela supressividade dos solos. Assim, um solo com alta diversidade biológica apresenta maior capacidade de supressão de patógenos (BETTIOL; GHINI, 2005).

A supressividade geral se refere à inibição de patógenos causada pela totalidade da atividade microbiana, a qual pode ser detectada pela quantificação da população total de micro-organismos ou pela atividade de certas enzimas no solo. A supressividade específica decorre da atividade antagonista por um único micro-organismo ou um pequeno grupo definido de organismos, podendo ser detectada pela medição do aumento da atividade antagonista aumentada, incluindo parasitismo, ou pela mensuração de mudanças específicas na estrutura e na fisiologia da comunidade microbiana do solo ou dos micro-organismos da rizosfera (FERNANDEZ et al., 2001).

Os organismos envolvidos na supressividade de solos agem por mecanismos de controle biológico como: antibiose, parasitismo, competição, predação e indução local de resistência do hospedeiro, caracterizando assim a supressividade local. Na supressividade a distância, os micro-organismos em uma seção da raiz do hospedeiro induzem resistência em outra, envolvendo uma



indução sistêmica. Apesar dessa divisão, vários organismos agem por mais de um mecanismo, beneficiando-se do ambiente em que vivem. Yin et al. (2003) identificaram bactérias *Rhizobium* como sendo responsáveis pela supressividade de *H. schachtii* e que as mesmas estavam firmemente aderidas à parede dos cistos e mesmo no seu interior.

A incorporação da matéria orgânica estimula a atividade da microbiota do solo, limitando a atividade dos fitopatógenos. Solos ricos em matéria orgânica geralmente apresentam maior supressividade por promover e suportar maior atividade microbiana. Além disto, ocorre melhoria da estrutura do solo e além de ser fornecedora de micronutrientes, hormônios e outras substâncias resultantes da sua decomposição, levando a indução de resistência do hospedeiro ou controlando o patógeno (BETTIOL; GHINI, 2005). Em alguns sistemas, no entanto, a eficácia da matéria orgânica tem sido atribuída a um componente da comunidade microbiana, desenvolvendo um mecanismo de operação (MAZZOLA, 2007). A supressão do patógeno ocorre pelo aumento da competição por espaço e nutrientes, favorecendo a produção de metabólitos voláteis e não voláteis tóxicos aos patógenos e aumento da atividade dos parasitas e predadores. Em resumo, a adição de matéria orgânica apresenta-se como uma alternativa no controle dos patógenos do solo, podendo ser utilizada não somente na agricultura orgânica, mas também na agricultura tradicional. No entanto, pode ser necessária a incorporação de grande volume de massa fresca, podendo onerar os custos de produção. Além disso, caso a temperatura do solo permaneça baixa, pode-se requerer um maior tempo para que ocorra o processo de decomposição e, assim, a biofumigação do solo (AIRES et al., 2009). A estrutura e textura do solo afeta a biota do solo por aumentar a porosidade propiciando o desenvolvimento de fungos, bactérias, nematoides, entre outros, além do aumento da capacidade de retenção de água. Solos argilosos e solos

com menor retenção de água se mostram menos apropriados ao desenvolvimento dos nematoides.

### 3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Detalhes da embriogênese de *Meloidogyne* sp precisam ser esclarecidos. Por exemplo, a fase de multiplicação celular é paralisada a 10°C sem morte das células (CAMPOS; CAMPOS; POZZA, 2008), porém, parece se desenrolar rapidamente a partir desta temperatura e possivelmente bem protegida da influência de moléculas tóxicas do meio ambiente. Contudo, encerrada a fase de multiplicação celular não se tem certeza da eficácia protetora da camada e membranas lipídicas do ovo (abaixo da casca) ao embrião e juvenis em formação. Neste contexto, a natureza (antagonista ou não) da microflora (fungos e bactérias) residente passa a ter papel relevante levando a supressão da população do nematoide. Como esses ovos são abundantes e ficam expostos por longo tempo a moléculas produzidas pela microflora, a análise do desenvolvimento embrionário e de juvenis dentro do ovo podem constituir-se em elementos diagnósticos de supressividade por serem, talvez, mais vulneráveis aos efeitos da microflora residente no sitio de alimentação de *Meloidogyne* sp.

## REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. San Diego: Academic, 1997. 635 p.
- AIRES, A. et al. Suppressing potato cyst nematode, *Globodera rostochiensis*, with extracts of Brassicacea plants. **American Journal of Potato Research**, New York, v. 86, n. 4, p. 327-333, Aug. 2009.
- ALMEIDA, V. F.; CAMPOS, V. P.; LIMA, R. D. Flutuação populacional de *Meloidogyne exigua* na rizosfera do cafeeiro. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 11, n. 1, p. 159-175, dez. 1987.
- AMARAL, D. R. et al. Effect of plant and fungous metabolites on *Meloidogyne exigua*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, p. 1861-1865, 2009. Edição Especial.
- BAKER, K. F.; COOK, R. J. **Biological control of plant pathogens**. San Francisco: Freeman, 1974. 433 p.
- BARRON, G. L. **The nematode destroying fungi: topics in mycobiology canadian biological publications**. Ontario: Guelph, 1977. 140 p.
- BETTIOL, W.; GHINI, R. Solos supressivos. In: MICHEREFF, F.; ANDRADE, D. E. G. T.; MENEZES, M. (Ed.). **Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais**. Recife: UFRPE, 2005. p. 125-152.
- BIRD, A. F. Quantitative studies on the growth of syncytia induced in plants by root-knot nematodes. **International Journal of Parasitology**, New York, v. 2, n. 1, p. 157-170, Mar. 1972.
- BIRD, A. F.; BIRD, J. Introduction to functional organization. In: PERRY, R. N.; WRIGHT, D. J. (Ed.). **The physiology and biochemistry of free-living and plant-parasitic nematodes**. Wallingford: CAB International, 1998. p. 1-24.
- CAMPOS, H. D.; CAMPOS, V. P. Efeito da época e forma de aplicação dos fungos *Arthrobotrys conoides*, *A. musiformis*, *Paecilomyces lilacinus* e *Verticillium chlamydosporium* no controle de *Meloidogyne exigua* em cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 3, p. 361-365, set. 1997.

CAMPOS, H. D.; CAMPOS, V. P.; POZZA, E. A. Efeito da temperatura na multiplicação celular no desenvolvimento embrionário e na eclosão de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne javanica*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 34, n. 1, p. 29-33, jan./fev. 2008.

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

CAMPOS, V. P.; PINHO, R. S. C.; FREIRE, E. S. Volatiles produced by interacting microorganisms potentially useful for the control of plant pathogens. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 3, p. 525-535, maio/jun. 2010.

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

CASTRO, J. M. C. et al. Levantamento de fitonematóides em cafezais do sul de Minas Gerais. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 32, n. 1, p. 56-64, mar. 2008.

DECKER, H. **Plant nematodes and their control: phytonematology**. New York: Brill, 1989. 540 p.

DUTRA, M. R. et al. Efeito do armazenamento de ovos de *Meloidogyne incognita* raça 3 em água e no solo, e de galhas no solo, na infectividade de juvenis do segundo estágio em tomateiro. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 1, p. 51-58, abr. 2006.

FAWCETT, H. S. The importance of investigation on the effects of known mixtures of microorganisms. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 21, n. 5, p. 545-549, 1931.

FERNANDEZ, C. et al. Induced soil suppressiveness to a root-knot nematode species by a nematicide. **Biological Control**, Orlando, v. 22, n. 2, p. 103-114, Apr. 2001.

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

GRAY, N. F. **Fungi attacking vermiforme nematodes**. Boca Raton: CRC, 1988a. v. 2, 139 p.

\_\_\_\_\_. Fungi attacking vermiforme nematodes. In: POINAR, G. O.; JANSSON, H. B. (Ed.). **Disease of nematodes**. Boca Raton: CRC, 1988b. v. 2, p. 3-38.

\_\_\_\_\_. Nematophagous fungi with particular reference to their ecology. **Biological Review**, Tokyo, v. 62, n. 3, p. 245-304, Aug. 1987.

HUANG, S. P.; SOUZA, P. E.; CAMPOS, V. P. Seasonal variation of a *Meloidogyne exigua* population in a coffee plantation. **Journal of Nematology**, Lawrence, v. 16, n. 11, p. 115-117, Jan. 1984.

IBRAHIM, S. K. Distribution of carbohydrates on the cuticle of several developmental stages of *Meloidogyne javanica*. **Nematologica**, Leiden, v. 37, n. 3, p. 275-284, Dec. 1991.

IRVING, F.; KERRY, B. R. Variation between strains of the nematophagous fungus, *Verticillium chlamydosporium* Goddard: factors affecting parasitism of cyst nematode eggs. **Nematologica**, Leiden, v. 32, n. 1, p. 474-485, Jan. 1986.

JANSSON, H. B.; NORDBRING-HERTZ, B. Infection events in the fungus-nematodes systems. In: POINAR, G. O.; JANSSON, H. B. (Ed.). **Diseases of nematodes**. Boca Raton: CRC, 1988. v. 2, p. 59-72.

JOHNSON, H. A.; POWELL, N. T. Influence of root-knot nematodes on bacterial wilt development in flue-cured tobacco. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 59, p. 486-491, 1969.

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

KERRY, B. R. Nematophagous fungi and the regulation of nematode population in soil. **Helminthological Abstract, Serie B**, Washington, v. 53, n. 1, p. 1-14, Dec. 1984.

KERRY, B. R.; EVANS, K. New strategies for the management of plant parasitic nematodes. In: HALL, R. **Principles and practice of managing soilborne plant pathogen**. Saint Paul: APS, 1996. p. 134-152.

KHAN, M.; WAJI, D. **Nematode interactions**. London: Chapman & Hall, 1993. 377 p.

KOK, C. J.; PAPERT, A.; KOK-A-HIN, C. H. Microflora of *Meloidogyne* egg masses: species composition, population density and effect on the biocontrol agent *Verticillium chlamydosporium* (Goddard). **Nematology**, College Park, v. 3, n. 8, p. 729-734, 2001.

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

LIMA, R. D.; FERRAZ, S. Biologia de *Meloidogyne exigua*: desenvolvimento embriogênico e efeito da temperatura na embriogênese. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 32, n. 183, p. 339-347, set./out. 1985.

MAI, W. F.; ABAWI, G. S. Interactions among root-knot nematodes and fusarium wilt fungi on host plants. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 25, p. 317-338, Sept. 1987.

MAXIMINIANO, C. et al. Flutuação populacional de *Meloidogyne exigua* em cafezal infestado por *Pasteuria penetrans*. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v. 25, n. 1, p. 63-69, jun. 2001.

MAZZOLA, M. Manipulation of rhizosphere bacterial communities to induce suppressive soils. **Journal of Nematology**, Hanover, v. 39, n. 3, p. 213-220, Sept. 2007.

MCSORLEY, R. et al. Effects of soil type and steam on nematode biological control potential of the rhizosphere community. **Nematropica**, Bradenton, v. 36, n. 2, p. 197-214, 2006.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2006. v. 1, 729 p.

MORGAN-JONES, G.; RODRIGUEZ-KABANA, R. Fungi colonizing cysts and eggs. In: POINAR, G. O.; JANSSON, H. B. (Ed.). **Diseases of nematodes**. Boca Raton: CRC, 1988. v. 2, p. 39-58.

MUNIZ, M. F. S. et al. Reaction of coffee genotypes to different populations of *Meloidogyne* spp.: detection of naturally virulent *M. exigua* population. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 34, n. 6, p. 370-378, Nov./Dec. 2009.

NIBLACK, T. L.; KARR, A. L. Source of antimicrobial activity in the gelatinous matrix of *Heterodera glycines*. **Journal of Nematology**, Athens, v. 26, n. 4, p. 561, Dec. 1994. Abstract.

NOE, J. P. Development of *Meloidogyne arenaria* on peanut and soybean under two temperature cycles. **Journal of Nematology**, Lawrence, v. 23, n. 4, p. 468-476, Oct. 1991.

OKA, Y. et al. A fungal parasite of *Meloidogyne javanica* eggs: evaluation of its use to control the root-knot nematode. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 7, n. 4, p. 489-498, Dec. 1997.

OLIVEIRA, D. F. et al. Activity of amino acids produced by *Paenibacillus macerans* and from commercial sources against the root-Knot nematode *Meloidogyne exigua*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 124, n. 1, p. 57-63, Nov. 2009.

\_\_\_\_\_. Selection of rhizobacteria able to produce metabolites active against *Meloidogyne exigua*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 119, n. 4, p. 477-479, June 2007.

ORION, D.; LOOTS, G. C.; ORION, T. Cell lysis activity of *Meloidogyne gelatinous* matrix. **Revue de Nématologie**, Montrouge Cedex, v. 10, n. 4, p. 463-465, 1987.

PITCHER, R. W. Inter-relationships of nematodes and other pathogens of plants. **Helminthological Abstracts**, Washington, v. 34, n. 1, p. 1-17, 1965.

POINAR JUNIOR, G. O.; JANSSON, H. **Diseases of nematodes**. Boca Raton: CRC, 1988. v. 1, 149 p.

POWELL, N. T. Interaction between nematodes and fungi in disease complexes. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 9, n. 3, p. 253-274, 1971.

\_\_\_\_\_. The role of plant parasitic nematodes in fungus diseases. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 53, n. 1, p. 28-35, 1963.

POWELL, N. T.; NUSBAUM, C. J. The black shank root-knot complex in flue-cured tobacco. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 50, n. 12, p. 899-906, 1960.



RENA, A. B.; MAESTRI, M. Fisiologia do cafeeiro. In: RENA, A. B. et al. (Ed.). **Cultura do cafeeiro: fatores que afetam a produtividade**. Piracicaba: POTAFOS, 1986. p. 13-85.

ROCHA, F. S.; CAMPOS, V. P.; SOUZA, J. T. Variation in lipid reserves of second-stage juveniles of *Meloidogyne exigua* in a coffee field and its relationship with infectivity. **Nematology**, College Park, v. 12, n. 3, p. 365-371, May 2010.

SANTOS, J. M.; FERRAZ, S. Efeito de exsudatos radiculares e temperatura sobre a eclosão de larvas de *Meloidogyne exigua* Göldi. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEIEIRAS, 5., 1977, Guarapari. **Resumos...** Guarapari: SBPC, 1977. p. 137-138.

SHARON, E.; ORION, D.; SPIEGEL, Y. Binding of soil micro-organisms and red blood cells by the gelatinous matrix and eggs of *Meloidogyne javanica* and *Rotylenchulus reniformis*. **Fundamental and Applied Nematology**, Montrouge, v. 16, n. 1, p. 5-9, Mar. 1993.

SITARAMAIAH, K.; SINGH, R. S. Interactions of nematodes with fungal and bacterial plant pathogens. In: SAXENA, S. K. et al. (Ed.). **Progress in plant nematology**. New Delhi: CBS, 1990. p. 195-208.

SITARAMAIAH, K.; SINHA, S. K. Histological aspects of pseudomonas and root-knot nematode wilt complex in brinjal. **Indian Journal of Nematology**, New Delhi, v. 14, n. 2, p. 175-178, 1984a.

\_\_\_\_\_. Interaction between *Meloidogyne javanica* and *Pseudomonas solanacearum* on brinjal. **Indian Journal of Nematology**, New Delhi, v. 14, n. 1, p. 1-5, 1984b.

SOUZA, R. M.; BRESSAN-SMITH, R. Coffee associated *Meloidogyne* spp.: ecology and interaction with plants. In: SOUZA, R. M. (Ed.). **Plant-parasitic nematodes of coffee**. Campos dos Goytacazes: Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2008. p. 123-148.

TRONCONI, N. M. et al. Influência da temperatura na patogenicidade e reprodução de *Meloidogyne exigua* em mudas de cafeeiro. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 10, n. 1, p. 69-83, dez. 1986.

VIEIRA, H. D. Coffee: the plant and its cultivation. In: SOUZA, R. M. (Ed.). **Plant-parasitic nematodes of coffee**. Campos dos Goytacazes: Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2008. p. 3-18.

VRAIN, T. C. Influence of chilling and freezing temperatures on infectivity *Meloidogyne incognita* and *M. hapla*. **Journal of Nematology**, College Park, v. 10, n. 2, p. 177-180, Apr. 1978.

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

WANG, E. L. H.; BERGESON, G. B. Biochemical changes in root exudate and xylem sap of tomato plants infected with *Meloidogyne incognita*. **Journal of Nematology**, Saint Paul, v. 6, n. 4, p. 194-202, Oct. 1974.

WEBSTER, J. M. Aspects of the host parasite relationship of plant parasitic nematodes. **Advanced Parasitology**, New York, v. 13, p. 225-250, 1975.

YIN, B. et al. Identification of fungal rDNA associated with soil uppressiveness against *Heterodera schachtii* using oligonucleotide fingerprinting. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 93, n. 8, p. 1006-1013, Aug. 2003.

## CAPÍTULO 2

### PERSPECTIVAS DE SUPRESSIVIDADE E QUALIDADE DO INÓCULO RIZOSFÉRICO DE *Meloidogyne exigua* NO CAFEIEIRO EM ALGUNS PERÍODOS DO ANO

#### RESUMO

A supressão de populações de fitonematoides ocorre naturalmente no campo em decorrência de fatores físicos, de matéria orgânica e da microbiota dos solos. Numa rizosfera estável como na cultura cafeeira (planta perene) a investigação de fatores supressivos durante as diversas estações do ano podem caracterizar o potencial de dano e de prejuízo ao cafeeiro pelo inóculo rizosférico de *Meloidogyne exigua*. Em amostras representativas da rizosfera cafeeira de duas cidades (Lavras e Varginha, MG) avaliou-se o número de galhas, produção de ovos, eclosão de juvenil de segundo estágio (J2) e desenvolvimento embrionário. Embora os parâmetros avaliados tenham variado bastante entre dois locais de amostragem e períodos de coleta de amostras (I, II, III e IV), destacaram-se o número maior de galhas e produção de ovos ( $P \leq 0,05$ ) nos períodos de dezembro/janeiro (III) e março/abril (IV) comparados aos demais períodos de coleta (junho/julho-I e setembro/outubro-II). Contudo, foi mais elevada (entre 56 a 60%) a eclosão de J2 nas amostras colhidas em I (56% a 60%) seguida daquelas colhidas em IV (entre 13,4% a 22%) e mais baixas nos períodos II e III (0,6% a 5,6%), nos cafezais das duas cidades amostradas. No desenvolvimento embrionário o número de ovos com juvenil formado dentro do ovo foi menor ( $P \leq 0,05$ ) nas amostras colhidas em II e III comparados aos demais períodos (I e IV). Nos ovos não eclodidos ocorreram entre 53% a 76% de ovos anormais e 23% a 45% de ovos com juvenil formado. Nos períodos de dezembro a março a microbiota antagônica a *M. exigua* pode ter sido favorecida pelas condições propícias de temperatura e umidade no período causando baixa porcentagem de eclosão e número reduzido de ovos com juvenil formado os quais podem, possivelmente, ser indicativos de supressividade de *M. exigua* na rizosfera cafeeira no Brasil.

Palavras-chave: *Meloidogyne exigua*. Supressividade. Café.

## ABSTRACT

The population suppressiveness of plant-parasitic nematodes occurs in the field due to the physical factors, organic matter and soil microbiota. On the stable rhizosphere as in coffee crop (perennial plant) the investigation of suppressive factors during the seasons of the year may bring about the damage and loss potentials to coffee by *M. exigua* rhizosphere inoculum. From representative samples (galled roots) taken from coffee rhizosphere at two towns (Lavras and Varginha) on Minas Gerais state, Brazil, were evaluated galls and egg numbers per gram of root as well as second stage juvenil (J2) hatching and embryonic development from the eggs. Although these parameters varied, considerably, among two sampling places (towns) and sampling times (I, II, III, IV), the number of gall and egg production were consistently high ( $P \leq 0,05$ ) on coffee root taken on december/january (III) and march/april (IV) compared to other sampling times (june/july-I and september/october-II). However, the J2 hatching percentage was highest on samples taken at I (56% to 60%) followed by sampling at IV (between 13,4% and 22%) and lowest ( $P \leq 0,05$ ) on sampling at II and III (0,6% to 5,6%) on both towns of sampled coffee plantations. The number of eggs with developed juvenile inside was lower ( $P \leq 0,05$ ) on samples taken at II and III compared to the sampling times I and IV. In the non-hatched eggs occurred about 53% to 76% of the so called abnormal eggs and 23% to 45% of eggs with developed juvenil inside. From december to march the antagonistic microbiota to *M. exigua* may have been favored by good temperature and humidity conditions causing, consequently, low hatching percentage and reduced number of egg with developed juvenil which may, possibly, be the indication of *M. exigua* suppressiveness on coffee rhizosphere.

Keywords: *Meloidogyne exigua*. Suppressiveness. Coffee.

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor de café do mundo e 50% dessa produção vêm do estado de Minas Gerais, sendo metade dele produzido na região do Sul de Minas (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2010).

*Meloidogyne exigua* é a espécie do nematoide de galhas mais disseminada nas Américas, principalmente no Brasil (CAMPOS; VILLAIN, 2005). No Sul de Minas, existem 22% das propriedades cafeeiras infestadas por esse patógeno (CASTRO et al., 2008).

A condição perene da cultura cafeeira permanecendo no campo por mais de 20 anos (VIEIRA, 2008), submete a população de *Meloidogyne exigua* aos efeitos variados de temperatura, umidade e microflora nas diferentes estações do ano. Variações na população de *M. exigua* no campo têm sido constatadas (ALMEIDA; CAMPOS; LIMA, 1987; HUANG; SOUZA; CAMPOS, 1984; MAXIMIANO et al., 2001; SOUZA; BRESSAN-SMITH, 2008). A temperatura e umidade afetam a fisiologia de *Meloidogyne* sp., como a embriogênese, produção de ovos, eclosão de juvenil de segundo estágio (J2), formação de galhas e causando morte de embriões (LIMA; FERRAZ, 1985; SANTOS; FERRAZ, 1977; TRONCONI et al., 1986), mas também afeta o cafeeiro ao interferir nas relações planta-nematoide. Por exemplo, a emissão de raízes novas é drasticamente reduzida nos períodos de baixa temperatura (abril a setembro) (RENA; MAESTRI, 1986) diminuindo a possibilidade do J2 encontrar local de penetração, levando-o à perda de energia corporal e incapacitando-o ao parasitismo (ROCHA; CAMPOS; SOUZA, 2010). Também nesse período, a temperatura do solo inferior a 20° C impede a penetração.

A microflora (fungos e bactérias) do solo bem como dos ovos e fêmeas de *Meloidogyne* sp. tem sido estudada em várias culturas (BARRON, 1977;

GRAY, 1987, 1988a, 1988b; JANSSON; NORDBRING-HERTZ, 1988; KERRY, 1984; KERRY; EVANS, 1996; MORGAN-JONES; RODRIGUES-KABANA, 1988; POINAR JUNIOR; JANSSON, 1988). Entretanto, a rizosfera do cafeeiro tem merecido pouca atenção. Fungos e bactérias antagonistas isolados de outras culturas foram utilizados em estudos sobre controle de *M. exigua* do cafeeiro (AMARAL et al., 2009; CAMPOS; CAMPOS, 1997; OLIVEIRA et al., 2007, 2009), tendo sido demonstrado que moléculas produzidas por fungos e bactérias são tóxicas a *M. exigua*, afetando assim a população desse nematoide.

Moléculas tóxicas a nematoides solúveis em água e voláteis de diversas origens, mas principalmente oriundas do crescimento fúngico e bacteriano, resultante da degradação de resíduos vegetais e mesmo pela produção exsudatos radiculares ocorrem com frequência na natureza (AMARAL et al., 2009; CAMPOS; PINHO; FREIRE, 2010).

Ainda não se correlacionou a incidência de componentes da microflora cafeeira à redução da população de *M. exigua* no campo. Mas tem-se provado o aumento na virulência de *M. exigua* em algumas localidades (MUNIZ et al., 2009).

O estudo da qualidade do inóculo de *M. exigua* na rizosfera cafeeira poderá expandir o conhecimento sobre a queda de inóculo (juvenil de segundo estágio-J2) principalmente no final da primavera e durante o verão (SOUZA; BRESSAN-SMITH, 2008), além de sugerir critérios para se definir fatores de supressividade que poderão auxiliar o produtor no sentido de evitar o uso de nematicida em rizosfera cafeeira supressiva a *M. exigua*. Também não se estudou ainda o efeito rizosférico do cafeeiro na qualidade do inóculo de *M. exigua* nas diversas estações do ano.

Desta forma, este trabalho teve por objetivo estudar a população de *Meloidogyne exigua* em uma única galha e em amostra representativa da

rizosfera, analisando a população de fêmeas, ovos, desenvolvimento embrionário e a eclosão a fim de investigar fatores de supressividade nas quatro estações do ano.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

**Amostragem:** foram amostrados cafezais fornecedores de inóculo para pesquisas há mais de uma década, nas cidades de Lavras e Varginha em Minas Gerais. O cafezal de Lavras, tem sempre fornecido baixa população de ovos de *M. exigua*, o que motivou a busca da outra fonte de inóculo no cafezal de Varginha, cuja quantidade também declinou nos últimos 3 anos. Desses cafezais foram colhidas 4 amostras contendo raízes finas infectadas por *Meloidogyne exigua* de 3 plantas em cada um dos 4 períodos representativos das estações do ano: inverno – período I amostragem em junho e julho; primavera – período II amostragem em setembro e outubro; verão – período III amostragem em dezembro e janeiro; outono – período IV amostragem em março e abril. As amostras foram coletadas na projeção da copa do cafeeiro na profundidade de 0-20 cm e estocadas a 8-10° C por até 3 dias e então processadas.

**Extração de ovos:** as raízes finas foram cuidadosamente lavadas em água parada e obtidas 4 amostras de 30 gramas. Para cada amostra fez-se a extração de ovos conforme Hussey e Barker (1973) e avaliou-se o número total de galhas e de ovos além de ovos por grama de raiz.

**Desenvolvimento embrionário:** avaliou-se o desenvolvimento embrionário de ovos extraídos de 4 amostras de 30 gramas de raiz antes da montagem da câmara de eclosão, bem como dos ovos que restaram após 10 dias na câmara de eclosão. Para isso escolheram-se ao acaso 100 ovos e estimou-se o número deles nas fases: 0 = unicelular, A = 2 células, B = 4 células, C = multicelular, D = gástrula, E = “tadpole”, H = Juvenil formado, conforme Bird (1972) (ANEXO A). Também avaliou-se o número de ovos na fase I (anormais) dentre aqueles que restaram após 10 dias na câmara de eclosão e que não se enquadravam em nenhuma das outras fases, isto é: ovos com anomalias morfológicas sem definição das fases acima descritas. Essa avaliação foi



repetida por três vezes e obtida a média para constituir-se numa repetição. Em cada período de amostragem a avaliação foi realizada em 4 repetições.

**Eclosão de juvenis de segundo estágio (J2):** os ovos extraídos de 30 gramas de raiz foram colocados em 4 câmaras de eclosão (repetições) e mantidos a 28° C. O número de J2 eclodidos vivos e imóveis foram avaliados a cada 24 horas durante 10 dias. A avaliação de mortalidade foi realizada conforme metodologia descrita por Chen e Dickson (2000), que consistiu em adicionar NaOH 0,1 M à suspensão de nematoides que se encontravam imóveis em placa Elisa. Os J2 que não manifestaram movimento foram considerados mortos.

**Fêmeas dentro da raiz:** das 30 gramas de raiz amostradas de cada repetição escolheram-se 10 galhas, as quais foram individualmente dissecadas sob uma lupa. As massas de ovos e as fêmeas foram retiradas das galhas com um estilete. Cada fêmea ou massa de ovos foi transferida para um tubo eppendorf com 0,5 ml de água, sendo as fêmeas esmagadas com um bastão de vidro e as massas de ovos agitadas. A suspensão de ovos foi pipetada numa lâmina escavada e ao microscópio contou-se o número de ovos por fêmea ou por massa de ovos. Calculou-se também o número de fêmeas e massa de ovos por galha bem como a média em 10 galhas dissecadas por repetição.

Ao dissecar a galha buscou-se observar “in situ” a formação ou não de J2 livres nas massas de ovos. Para isto, as massas de ovos internas foram maceradas em eppendorf com mini bastão de vidro e colocadas em lâmina escavada e através de microscópio de objetiva invertida foram observados os J2 eclodidos que já se encontravam mortos sem quantificá-los.

**Delineamento experimental:** utilizou-se o delineamento experimental blocos ao acaso em esquema fatorial 2 x 4 sendo 2 cafezais amostrados nas cidades de Lavras e Varginha em Minas Gerais e 4 períodos de coleta de amostras I= junho/julho, II= setembro/outubro, III= dezembro/janeiro, IV=

março/abril, em 4 repetições. Com essas amostras estudaram-se, no laboratório: desenvolvimento embrionário, eclosão de J2, nº total de galhas, nº total de ovos.

**Análise estatística dos dados:** o programa Sisvar foi utilizado para a realização da análise de variância (ANOVA). As médias de cada tratamento foram agrupadas pelo teste de Scott e Knott (1974), ao nível de 5% de significância. As análises de correlação foram feitas através do programa Excel.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observaram-se J2 mortos em massa de ovos. Em uma das amostras cerca de 250 J2 foram observados mortos pelo teste de mortalidade conforme metodologia descrita por Chen e Dickson (2000). Também observou-se que na câmara de eclosão muitos J2 morriam logo após a eclosão. A formação de galhas e a produção de ovos de *Meloidogyne exigua* na rizosfera cafeeira (30 gramas de raiz) foram maiores ( $P \leq 0,05$ ) nos períodos de dez/jan (III) e março/abril (IV) comparadas aos períodos junho/julho (I) e set/out (II) (Tabelas 1 e 2). Contudo a porcentagem de eclosão de juvenis de segundo estágio (J2) foi mais elevada (entre 56 a 60%) a partir dos ovos oriundos das amostras colhidas em I seguido daquelas colhidas em IV (entre 13,4 a 22,4%) e mais baixa nos períodos de coleta II e III com valores entre 0,6 a 5,6% nas duas cidades amostradas (Lavras e Varginha, MG) (Figura 1). Entretanto, o número total de ovos e ovos/g de raiz bem como a eclosão total foram maiores ( $P \leq 0,05$ ) nos períodos III e IV de amostragem comparados com os demais (Figura 1 e 2). No período de 10 dias a eclosão de J2 foi sempre maior nos 2 primeiros dias variando entre 55 a 65% nas amostras colhidas nos períodos I, II e IV e de 37% naquelas obtidas em III (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1 Número de galhas e eclosão de juvenil de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne exigua* em 30 gramas de raiz de cafezal infestado nos municípios de Lavras, MG e Varginha, MG em 4 períodos do ano

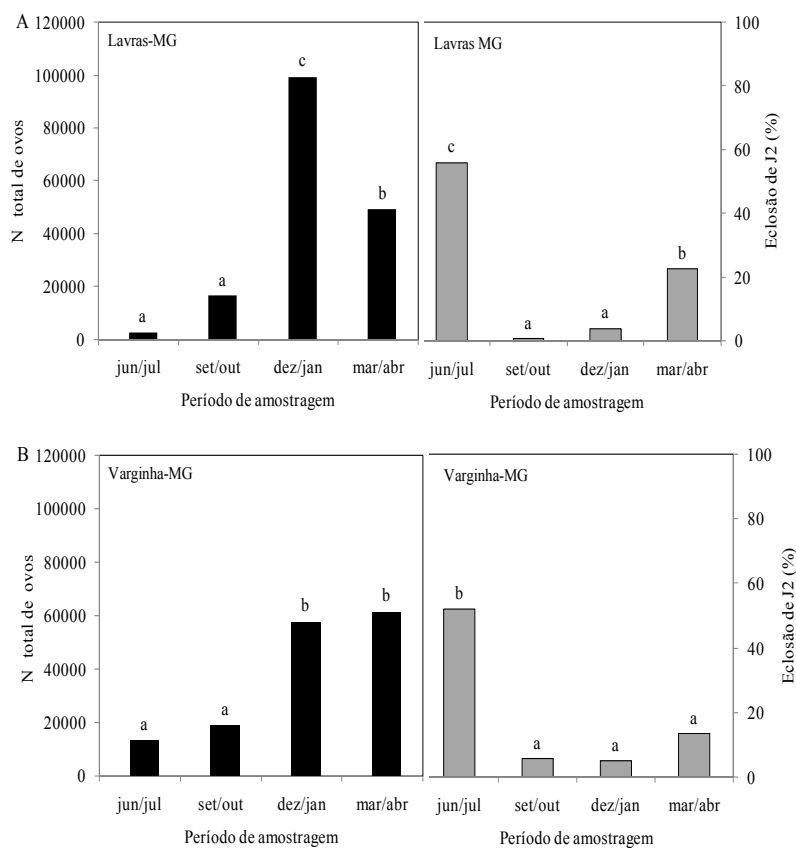
Períodos de amostragem	Locais de amostragem (cidades)	N° de galhas	Eclosão de J2		
			Até 2 dias	3 a 6 dias	7 a 10 dias
I	Lavras	394 A	716 B	520 B	204 B
	Varginha	1218 a	4765 d	1216 c	910 c
II	Lavras	886 B	55 A	40 A	7 A
	Varginha	1587 b	629 a	272 a	162 a
III	Lavras	2866D	847 B	1479 C	1519 D
	Varginha	1875 c	1675 b	958 b	307 b
IV	Lavras	2585 C	6428 C	4063 D	647 C
	Varginha	1512 d	4356 c	3016 d	858 c

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, sendo maiúscula para comparar dados de Lavras e minúsculas para Varginha, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade

Tabela 2 População de ovos, eclosão de juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne exigua* e número de galhas em 30 gramas de raiz de cafezal infestado em 4 períodos de amostragem

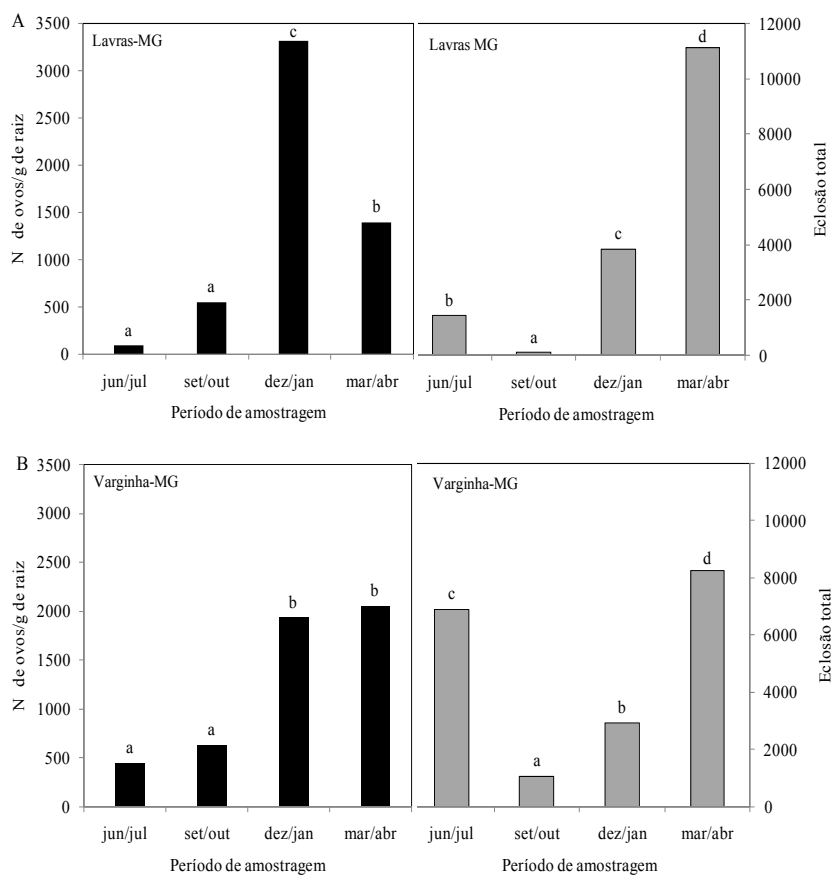
Períodos	N° de galhas	N° de ovos		Eclosão de J2			total
		total	por/g de raiz	Dias			
				até 2	3 a 6	7 a 10	
I jun/jul	806a	7927a	264a	2741b	869b	557b	4167b
II set/out	1237a	17608a	587a	342a	156a	85a	583a
III dez/jan	2370b	78726c	1722b	1262a	1219b	913b	3394b
IV mar/abr	2049b	55421b	2624c	5392c	3539c	753b	9685c

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade



Barras com mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade no mesmo período de amostragem

Figura 1 Número total de ovos e porcentagem de ecloração de juvenil de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne exigua* em 4 períodos de amostragem (I, II, III e IV) em cafezais de Lavras e Varginha, MG



Barras com mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade no mesmo período de amostragem

Figura 2 Número de ovos/grama de raiz e ecloração total de juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne exigua* em 4 períodos de amostragem em cafezais de Lavras e Varginha, MG

A porcentagem de ecloração correlacionou-se negativamente com as médias mensais de temperatura na data de coleta em cafezais de Lavras e Varginha MG amostrados.

Os cafezais amostrados de Lavras e Varginha não demonstraram diferenças ( $P \leq 0,05$ ), numa análise global, entre o número de galhas, produção de ovos e eclosão de J2 (Tabela 3).

Tabela 3 População de ovos, eclosão de juvenil de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne exigua* e número de galhas em 30 gramas de raiz de cafezais infestados das cidades de Lavras e Varginha, MG

Locais de amostragem (Cidades)	N° de galhas	N° de ovos		Eclosão de J2			total
		total	por/g de raiz	Dias			
				até 2	3 a 6	7 a 10	
Lavras	1683a	41948a	1335a	2011a	1525a	594a	4132a
Varginha	1548a	37893a	1263a	2856a	1365a	559a	4782a

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade

O desenvolvimento embrionário ocorreu nas suas diversas fases em 89 a 93% dos ovos extraídos das amostras obtidas nos 4 períodos. Em todos eles menor percentagem dos ovos foi encontrada nas diversas fases de multiplicação celular avaliadas (Tabela 4).

Tabela 4 Porcentagem de ovos em diversas fases de desenvolvimento embrionário em 30 gramas de raízes galhadas colhidas em 4 períodos do ano em cafezais de Lavras e Varginha, MG, Brasil

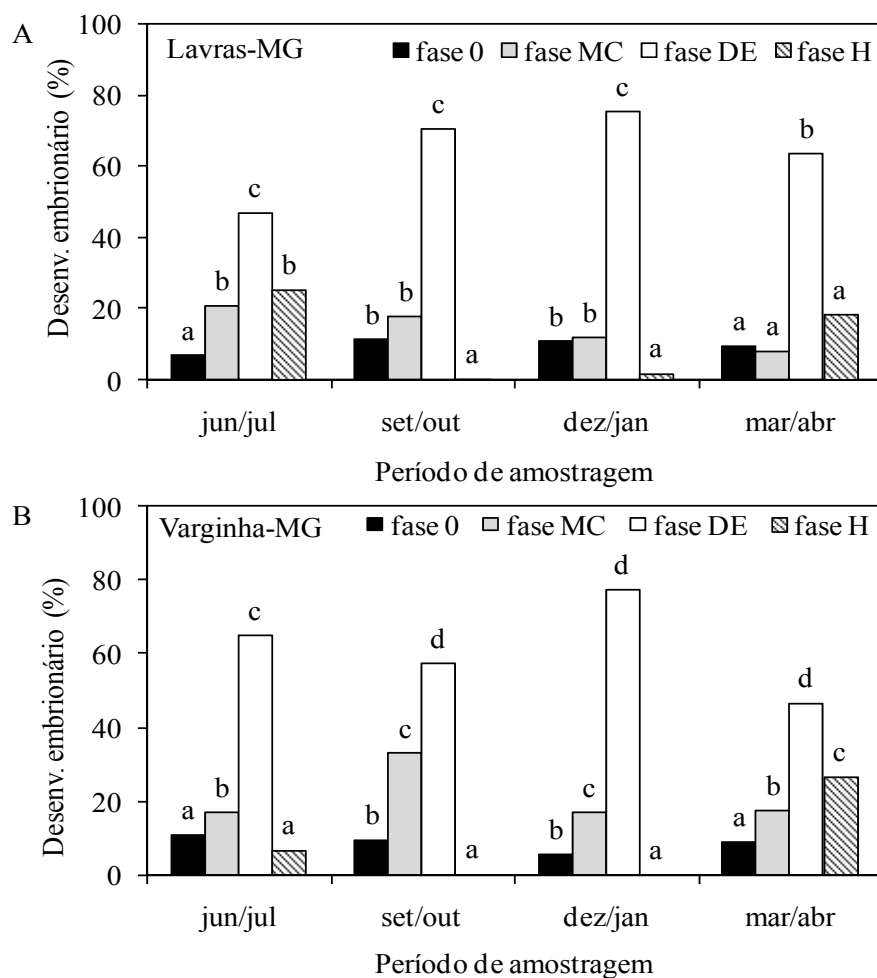
Lavras-MG							
Período	Fases (%)						
	0	A	B	C	D	E	H
I	7,00 aA	3,75aA	2,00bA	15,00bB	20,00aB	26,75aC	25,50bC
II	11,25bB	4,50aA	1,50bA	11,75bC	31,75bC	38,75bD	0,50aA
III	10,75bC	5,25aB	0,50aA	6,25aB	50,00cE	25,25aD	2,0aA
IV	9,75bA	2,75aA	0,25aA	5,25aA	33,75bC	29,75aC	18,50bB
Varginha-MG							
Período	Fases (%)						
	0	A	B	C	D	E	H
I	11,00bC	2,50aA	2,25bB	12,25aA	25,25aA	39,75cC	7,00bB
II	9,50bC	5,25bB	2,75bA	25,00bD	34,00bE	23,25bD	0,25 aA
III	5,50 aB	2,75 aB	0,25aA	14,00aC	24,75aD	52,75dE	0,00aA
IV	9,00bB	6,75bB	1,00aA	9,75aB	33,25bE	13,50aC	26,75cD

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha e minúsculas na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade

**Fase 0:** ovos na fase unicelular, **Fase A:** 2 células, **Fase B:** 4 células, **Fase C:** gástrula, **Fase E:** tadpole, **Fase H:** ovos com juvenil formado e **Fase I:** ovos anormais

Maior ( $P \leq 0,05$ ) porcentagem (57 a 81%) dos ovos ocorreu sempre nas fases de formação do embrião (gástrula e “tadpole”) e juvenil dentro do ovo em qualquer período de amostragem (Figura 3).





Barras com mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade no mesmo período de amostragem

**Fase 0:** ovos na fase unicelular, **Fase MC:** agrupamento das fases (2 células, 4 células e multicelular) dos ovos em multiplicação celular, **Fase DE:** agrupamento das fases (gástrula e “tadpole”) dos ovos em desenvolvimento embrionário, **Fase H:** ovos com juvenil formado

Figura 3 Agrupamento das fases do desenvolvimento embrionário dentro dos ovos extraídos de raízes (30g) de cafeeiros de Lavras e Varginha, MG infestados por *Meloidogyne exigua*, em 4 períodos (I, II, III e IV) do ano

Entre os 4 períodos amostrados nos cafezais de Lavras e Varginha, MG, diferenças entre as fases avaliadas ocorreram sempre, porém destacando-se a fase de juvenil dentro do ovo em que menor ( $P \leq 0,05$ ) número de ovos com juvenil formado ocorreu sempre nos períodos II e III (Tabela 4), coincidentemente com a menor porcentagem de eclosão (Figura 1). A análise do desenvolvimento embrionário nos ovos não eclodidos feita nos períodos III e IV demonstrou maior número de ovos anormais seguido por ovos com juvenil formado (Tabelas 5 e 6), porém semelhantes nas cidades amostradas.

Tabela 5 Desenvolvimento embrionário dentro dos ovos de *Meloidogyne exigua*, extraídos de raízes de cafezais em amostras colhidas em dez/jan (III) antes e após o encerramento do período estabelecido para a eclosão (10 dias)

Antes								
Cidades	Fases (%)							
	0	A	B	C	D	E	H	I
Lavras	10,75c	5,25c	0,5a	6,25b	50,0d	25,25b	2,0a	0,0 a
Varginha	5,5b	2,75b	0,25a	14,0c	24,75c	52,75c	0,0a	0,0 a
Depois								
Cidades	Fases (%)							
	0	A	B	C	D	E	H	I
Lavras	2,25 a	0,0 a	0,0 a	0,5 a	4,5 b	1,0 a	24 b	67,75b
Varginha	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,5 a	23 b	76,5 b

Médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade

**Fase 0:** ovos na fase unicelular, **Fase A:** 2 células, **Fase B:** 4 células, **Fase C:** gástrula, **Fase E:** tadpole, **Fase H:** ovos com juvenil formado e **Fase I:** ovos anormais

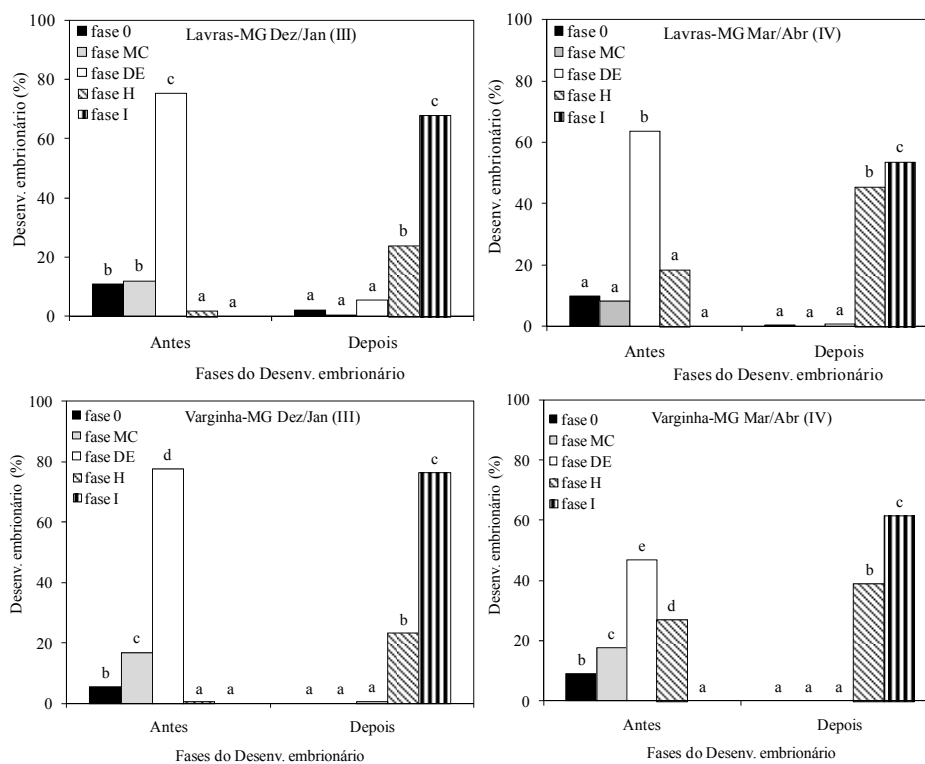
Tabela 6 Desenvolvimento embrionário dentro dos ovos de *Meloidogyne exigua* extraídos de raízes de cafezais em amostra colhida em mar/abr (IV) antes e após o encerramento do período estabelecido para a eclosão (10 dias)

Antes								
Cidades	Fases (%)							
	0	A	B	C	D	E	H	I
Lavras	9,75b	2,75b	0,25a	5,25b	33,75b	29,75c	18,5a	0,0a
Varginha	9,0b	6,75c	1,0b	9,75c	33,25b	13,5b	26,75a	0,0a
Depois								
Cidades	Fases (%)							
	0	A	B	C	D	E	H	I
Lavras	0,0a	0,0a	0,0a	0,0a	0,0a	0,75a	45,5b	53,75b
Varginha	0,0a	0,0a	0,0a	0,0a	0,0a	0,0a	38,75b	61,25b

Médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade

**Fase 0:** ovos na fase unicelular, **Fase A:** 2 células, **Fase B:** 4 células, **Fase C:** gástrula, **Fase E:** tadpole, **Fase H:** ovos com juvenil formado e **Fase I:** ovos anormais

Entre os dois períodos, III e IV, maior número de ovos não eclodidos com juvenil formado ocorreu no período IV nos ovos extraídos de amostras de duas cidades (Tabelas 6, Figura 4).



Barras com mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade no mesmo período de amostragem

**Fase 0:** ovos na fase unicelular, **Fase MC:** agrupamento das fases (2 células, 4 células, multicelular) ovos em multiplicação celular, **Fase DE:** agrupamento das fases (gástrula e “tadpole”) ovos em desenvolvimento embrionário, **Fase H:** ovos com juvenil formado e **Fase I:** ovos anormais

Figura 4 Agrupamento das fases de desenvolvimento embrionário dentro dos ovos extraídos de raízes dos cafeeiros de Lavras e Varginha, MG infestados por *Meloidogyne exigua* colhidos: A e B) em dez/jan (III) e C e D) em março/abril (IV). As avaliações foram feitas antes da montagem da câmara de eclosão e 10 dias após, constituindo assim os ovos que não eclodiram

A análise da população de *M. exigua* em única galha mostrou que o número de massa de ovos interna variou de 1,9 a 9,9 e de fêmea de 2,7 a 10 com valores variáveis entre os diversos períodos de amostragem. Também foi variável o número de ovos por massa de ovos e ovos dentro da fêmea (Tabelas 7 e 8).

Tabela 7 População de *Meloidogyne exigua* em uma única galha na rizosfera de cafezal infestado nas cidades de Lavras e Varginha, MG, em 4 períodos do ano (I, II, III, IV)

Períodos de amostragem	Locais de amostragem (cidades)	Massa de ovos	N° Ovos	Ovos/Massa	Fêmeas total	Ovos	Médias
						dentro de uma fêmea	de ovos por fêmea
I	Lavras	1,90A	1,50A	1,00A	2,70A	3,00A	1,10A
	Varginha	4,60a	368,00c	87,60b	5,70a	13,30a	2,50a
II	Lavras	5,40B	256,00C	47,00C	6,50B	36,70C	5,70C
	Varginha	4,80a	250,00b	54,10b	5,90a	22,50b	3,60b
III	Lavras	8,20C	49,80A	7,10A	8,50B	11,00B	1,40A
	Varginha	9,90b	150,00a	15,70a	10,00b	42,40c	4,40b
IV	Lavras	5,50B	119,50B	23,20B	7,00B	16,70B	2,70B
	Varginha	4,90a	296,00b	68,50b	4,70a	10,30a	2,20a

Amostragens: inverno – **período I** em junho e julho; primavera – **período II** em setembro e outubro; verão – **período III** em dezembro e janeiro; outono – **período IV** em março e abril

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, sendo maiúscula para comparar dados de Lavras e minúsculas para Varginha, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade

Tabela 8 População de *Meloidogyne exigua* em uma única galha da rizosfera cafeeira infestada, em 4 períodos de amostragem

<b>Períodos de amostragem</b>	<b>Massa de ovos/galha</b>	<b>Nº Ovos/galha</b>	<b>Ovos/ Massa</b>	<b>Nº Fêmeas /galha</b>	<b>Total de ovos nas fêmeas</b>	<b>Ovos/ fêmea</b>
I jun/jul	3,25a	184,75b	44,30b	4,20a	8,15a	1,80a
II set/out	5,10b	253,00b	50,55b	6,20b	29,60b	4,65b
III dez/jan	9,05c	99,90a	11,40a	9,25c	26,70b	2,90a
IV mar/abr	5,20b	207,75b	45,85b	5,85b	13,50a	2,45a

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade

Destaca-se, contudo, o número total de ovos nas fêmeas em única galha o qual foi sempre maior ( $P \leq 0,05$ ) nos períodos II e III em relação aos demais períodos (I e IV) (Tabela 8). Nos cafezais amostrados de Varginha, MG o número de ovos por galha e de ovos/massa de ovos internas foi maior ( $P \leq 0,05$ ) do que nas amostras de Lavras, MG (Tabela 9).

Tabela 9 População de *Meloidogyne exigua* em uma única galha da rizosfera cafeeira infestada em cafezais das cidades de Lavras e Varginha – MG

Locais de amostragem (cidades)	Massa de ovos/galha	Nº Ovos/galha	Ovos/ Massa	Nº Fêmeas /galha	Total de ovos nas fêmeas	Ovos/ fêmea
Lavras	5,25a	106,70a	19,57a	6,17a	16,85a	2,72a
Varginha	6,05a	266,00b	56,47b	6,57a	22,12a	3,17a

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade

As temperaturas altas no final da primavera e durante o verão (períodos II e III) e a disponibilidade de raízes novas (RENA; MAESTRI, 1986) nesses períodos de amostragem aumentaram a reprodução (número de ovos) e infectividade de *M. exigua* no cafeeiro nas áreas amostradas. Temperaturas de 20 a 24°C aumentam a reprodução de *M. exigua* em substrato esterelizado em câmara de crescimento (TRONCONI et al., 1986). Em campo, aumenta o número de J2 por 100 cm de solo no final da primavera e durante o verão (HUANG; SOUZA; CAMPOS, 1984). Entretanto, a menor eclosão de J2 e o menor número de ovos com juvenis formados nos períodos com temperatura alta no campo (períodos III e IV) bem como as correlações negativas entre porcentagem de eclosão e número de ovos e galhas indicam a ocorrência de substâncias tóxicas afetando o desenvolvimento dos embriões chegando a matar 23 a 45% de juvenis dentro do ovo. Como essa alteração ocorreu dentro do mesmo ano e que fatores físicos do solo e da rizosfera são estáveis em uma planta perene, é mais razoável acreditar-se numa supressividade por causa biológica uma vez que sua eficácia aumentou com aumento da temperatura e umidade no campo.

O grande número de J2 mortos nas massas de ovos (observações *in situ*) também suporta o conceito de atividade antagonista da microflora local. Mas Huang, Souza e Campos (1984), sugerem sobrevivência de J2 nas massas de ovos, o que talvez possa ocorrer em cafezais com diferente microbiota nos ovos. De fato as massas de ovos são locais de residência para muitos microorganismos (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Já se isolaram fungos e bactérias de massas de ovos (KOK; PAPERT; KOK-A-HIN, 2001). Freire et al. (2010), isolaram *Fusarium oxysporum* e *F. solani* de ovos, massas de ovos e do solo rizosférico de cafezais. O isolado 21 de *F. oxysporum* produziu compostos voláteis muito fortes contra J2 de *M. incognita*. Em geral, tem-se dado ênfase ao estudo da microflora das massas de ovos de *Meloidogyne* spp. relativos aos fungos predadores e parasitas de ovos (BARRON, 1977; GRAY, 1987, 1988a, 1988b; JANSSON; NORDBRING-HERTZ, 1988; KERRY, 1984; KERRY; EVANS, 1996; MORGAN-JONES; RODRIGUES-KABANA, 1988; POINAR; JANSSON, 1988), com poucos estudos direcionados para os demais residentes, principalmente para as bactérias colonizadoras desses locais, destacando-se apenas os trabalhos de Kok, Papert e Kok-A-Hin (2001), que isolaram bactérias de massas de ovos de planta de tomate e batata infectada por *M. fallax*.

No aspecto dos efeitos dos fungos residentes não predadores e parasitas de ovos, e bactérias, a rizosfera cafeeira infestada por *M. exigua* está praticamente inexplorada. Diaz et al. (2000), embora tenham utilizado amostra da rizosfera cafeeira, usaram-se como inoculante em mudas de tomate isolando-se, então, da rizosfera tomateira, diversas espécies de *Verticillium* e de *Pochonia chlamydosporia*. Campos e Campos (1997) testaram *P. chlamydosporia* em cafeeiro no controle de *M. exigua*, porém o isolado foi obtido de ovos de *Meloidogyne* spp. de planta de quiabo por Ribeiro e Campos (1992). Também não se aprofundaram os estudos sobre a flutuação, durante o ano, da microflora antagonista a fitonematoides. O cafeeiro, por ser uma cultura perene, permanece



no campo por mais de 20 anos e, portanto, mantém os habitantes de sua rizosfera. Nessa condição, talvez sob influência de várias alterações de temperatura e umidade durante o ano, o controle biológico pode ser operacionalizado mantendo baixa a população de *M. exigua* principalmente no período mais quente, quando o cafeeiro mais necessita da eficácia absorvente de seu sistema radicular, e quando nesse trabalho, observou-se menor eclosão de J2. A supressividade natural de populações de *M. exigua*, evitando níveis superiores ao limiar de prejuízo explica, talvez, a ampla disseminação desse nematoide na região sul de Minas com 22% das lavouras atacadas (CASTRO et al., 2008) e a grande capacidade produtiva da cafeicultura nessa região do Estado de Minas Gerais que corresponde a 25% de todo o café colhido no Brasil (CONAB, 2010).

No futuro o desenvolvimento de um método rápido para avaliar essa microflora antagonista a *M. exigua* nos períodos de outubro a fevereiro no campo poderá definir a sua capacidade supressiva e assim evitar o uso desnecessário de nematicidas em algumas áreas infetadas por esse nematoide.

Outros autores encontraram diminuição no número de J2 por unidade de raiz e por unidade de solo no final da primavera e verão (ALMEIDA; CAMPOS; LIMA, 1987; HUANG; SOUZA; CAMPOS, 1984; MAXIMIANO et al., 2001; SOUZA; BRESSAN-SMITH, 2008) o que pode, parcialmente ou totalmente, ser explicado pela diminuição da eclosão resultante da morte do embrião como constatado nesse trabalho.

Acredita-se que moléculas tóxicas tenham penetrado no ovo com mais facilidade nas fases de formação do embrião e do juvenil quando a camada e a membrana lipídicas existentes abaixo da casca (JONES; TYLKA; PERRY, 1998) não desempenham mais suas funções protetoras. Também a grande porcentagem de ovos (89 a 93%) nas fases de formação do embrião e com juvenil formado além da maior eclosão de J2 nos dois primeiros dias em que os ovos foram colocados na câmara de eclosão indicam que em qualquer estação do

ano a multiplicação celular é rápida e protegida contra a entrada de substâncias tóxicas. Campos, Campos e Pozza (2008) demonstraram que a multiplicação celular só é retardada em intervalos de temperaturas entre 5° a 10° C proporcionando menores taxa de eclosão.

Contudo, pesquisas precisarão ser direcionadas para o estudo dessa microflora e caracterizar o seu antagonismo a *M. exigua* principalmente no final da primavera e no verão.

De qualquer forma, nos locais estudados neste trabalho foi baixa a qualidade do inóculo, principalmente no verão, o que levava a redução de danos e prejuízos e possivelmente esse efeito pode ocorrer em outras regiões cafeeiras.

#### 4 CONCLUSÕES

- a) a porcentagem de eclosão de J2 foi mais elevada no período de junho/julho (I);
- b) a porcentagem de eclosão correlacionou-se negativamente com as médias mensais de temperatura na data da coleta das amostras;
- c) maior porcentagem de ovos de *M. exigua* encontra-se nas fases de desenvolvimento do embrião e juvenis;
- d) menor número de juvenil formado dentro do ovo ocorreu no período setembro/janeiro (II e III);
- e) o número total de ovos nas fêmeas em única galha foi maior no período de setembro/janeiro (II e III);
- f) aproximadamente 100% dos ovos não eclodidos foram de anormais e com juvenil;
- g) muitos J2 eclodidos morrem dentro das massas de ovos;
- h) nas rizosferas cafeeiras estudadas ocorreram antagonismos a *M. exigua*.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A qualidade do inóculo de *M. exigua* na rizosfera cafeeira varia durante o ano. Acredita-se que a porcentagem de eclosão e as fases de desenvolvimento do embrião e do juvenil sejam boas expressões dessa qualidade. A presença de J2 mortos nas massas de ovos pode constituir-se em parâmetro para se avaliar o antagonismo dentro das massas de ovos. Esses parâmetros podem simplificar o estudo do antagonismo na rizosfera cafeeira, pois eles têm efeito direto do micro-organismo residente. Entretanto os parâmetros muito estudados até então como J2 por unidade de solo ou raiz envolvem outros aspectos da relação nematoide-planta. A evolução dos estudos na busca de fatores de supressividade possivelmente terá mais sucesso investigando-se a qualidade de inóculo e J2 mortos nos massas de ovos em diversos solos e rizosferas cafeeiras.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, V. F.; CAMPOS, V. P.; LIMA, R. D. Flutuação populacional de *Meloidogyne exigua* na rizosfera do cafeeiro. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 11, n. 1, p. 159-175, dez. 1987.
- AMARAL, D. R. et al. Effect of plant and fungous metabolites on *Meloidogyne exigua*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, p. 1861-1865, 2009. Edição Especial.
- BARRON, G. L. **The nematode destroying fungi: topics in mycobiology** canadian biological publications. Ontario: Guelph, 1977. 140 p.
- BIRD, A. F. Quantitative studies on the growth of syncytia induced in plants by root-knot nematodes. **International Journal of Parasitology**, New York, v. 2, n. 1, p. 157-170, Mar. 1972.
- CAMPOS, H. D.; CAMPOS, V. P. Efeito da época e forma de aplicação dos fungos *Arthrobotrys conoides*, *A. musiformis*, *Paecilomyces lilacinus* e *Verticillium chlamydosporium* no controle de *Meloidogyne exigua* em cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 3, p. 361-365, set. 1997.
- CAMPOS, H. D.; CAMPOS, V. P.; POZZA, E. A. Efeito da temperatura na multiplicação celular no desenvolvimento embrionário e na eclosão de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne javanica*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 34, n. 1, p. 29-33, jan./fev. 2008.
- CAMPOS, V. P.; PINHO, R. S. C.; FREIRE, E. S. Volatiles produced by interacting microorganisms potentially usefull for the control of plant pathogens. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 3, p. 525-535, maio/jun. 2010.
- CAMPOS, V. P.; VILLAIN, L. Nematode parasites of coffee and cocoa. In: LUC, M.; SIKORA, R. A.; BRIDGE, J. (Org.). **Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture**. London: CAB International, 2005. p. 529-579.
- CASTRO, J. M. C. et al. Levantamento de fitonematóides em cafezais do sul de Minas Gerais. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 32, n. 1, p. 56-64, mar. 2008.

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

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Produção de café-safra 2010**: participação percentual por U.F. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 19 maio 2010.

DIAZ, L. H. et al. Nematophagous *Verticillium* spp. in soils infested with *Meloidogyne* spp. in Cuba: isolation and screening. **International Journal of Pest Management**, London, v. 46, n. 4, p. 277-284, Aug. 2000.

FREIRE, E. S. et al. Volatile substances on the antagonism between fungi, bacteria and *Meloidogyne incognita* and potentially fungi for nematode control. **Journal of Nematology**, College Park, 2010. No prelo.

GRAY, N. F. **Fungi attacking vermiforme nematodes**. Boca Raton: CRC, 1988a. v. 2, 139 p.

\_\_\_\_\_. Fungi attacking vermiforme nematodes. In: POINAR, G. O.; JANSSON, H. B. (Ed.). **Disease of nematodes**. Boca Raton: CRC, 1988b. v. 2, p. 3-38.

\_\_\_\_\_. Nematophagous fungi with particular reference to their ecology. **Biological Review**, Tokyo, v. 62, n. 3, p. 245-304, Aug. 1987.

HUANG, S. P.; SOUZA, P. E.; CAMPOS, V. P. Seasonal variation of a *Meloidogyne exigua* population in a coffee plantation. **Journal of Nematology**, Lawrence, v. 16, n. 11, p. 115-117, Jan. 1984.

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

JANSSON, H. B.; NORDBRING-HERTZ, B. Infection events in the fungus-nematodes systems. In: POINAR, G. O.; JANSSON, H. B. (Ed.). **Diseases of nematodes**. Boca Raton: CRC, 1988. v. 2, p. 59-72.

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

KERRY, B. R. Nematophagous fungi and the regulation of nematode population in soil. **Helminthological Abstract, Serie B**, Washington, v. 53, n. 1, p. 1-14, Dec. 1984.

KERRY, B. R.; EVANS, K. New strategies for the management of plant parasitic nematodes. In: HALL, R. **Principles and practice of managing soilborne plant pathogen**. Saint Paul: APS, 1996. p. 134-152.

KOK, C. J.; PAPERT, A.; KOK-A-HIN, C. H. Microflora of *Meloidogyne* egg masses: species composition, population density and effect on the biocontrol agent *Verticillium chlamyosporium* (Goddard). **Nematology**, College Park, v. 3, n. 8, p. 729-734, 2001.

LIMA, R. D.; FERRAZ, S. Biologia de *Meloidogyne exigua*: desenvolvimento embriogênico e efeito da temperatura na embriogênese. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 32, n. 183, p. 339-347, set./out. 1985.

MAXIMINIANO, C. et al. Flutuação populacional de *Meloidogyne exigua* em cafezal infestado por *Pasteuria penetrans*. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v. 25, n. 1, p. 63-69, jun. 2001.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2006. v. 1, 729 p.

MORGAN-JONES, G.; RODRIGUEZ-KABANA, R. Fungi colonizing cysts and eggs. In: POINAR, G. O.; JANSSON, H. B. (Ed.). **Diseases of nematodes**. Boca Raton: CRC, 1988. v. 2, p. 39-58.

MUNIZ, M. F. S. et al. Reaction of coffee genotypes to different populations of *Meloidogyne* spp.: detection of naturally virulent *M. exigua* population. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 34, n. 6, p. 370-378, Nov./Dec. 2009.

OLIVEIRA, D. F. et al. Activity of amino acids produced by *Paenibacillus macerans* and from commercial sources against the root-Knot nematode *Meloidogyne exigua*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 124, n. 1, p. 57-63, Nov. 2009.

\_\_\_\_\_. Selection of rhizobacteria able to produce metabolites active against *Meloidogyne exigua*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 119, n. 4, p. 477-479, June 2007.

POINAR JUNIOR, G. O.; JANSSON, H. **Diseases of nematodes**. Boca Raton: CRC, 1988. v. 1, 149 p.

RENA, A. B.; MAESTRI, M. Fisiologia do cafeeiro. In: RENA, A. B. et al. (Ed.). **Cultura do cafeeiro: fatores que afetam a produtividade**. Piracicaba: POTAFOS, 1986. p. 13-85.

RIBEIRO, R. C. F.; CAMPOS, V. P. Ocorrência de fungos parasitas de ovos de *Meloidogyne* spp. no Sul de Minas Gerais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, 16., 1992, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 1992. p. 27.

ROCHA, F. S.; CAMPOS, V. P.; SOUZA, J. T. Variation in lipid reserves of second-stage juveniles of *Meloidogyne exigua* in a coffee field and its relationship with infectivity. **Nematology**, College Park, v. 12, n. 3, p. 365-371, May 2010.

SANTOS, J. M.; FERRAZ, S. Efeito de exsudatos radiculares e temperatura sobre a eclosão de larvas de *Meloidogyne exigua* Göldi. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 5., 1977, Guarapari. **Resumos...** Guarapari: SBPC, 1977. p. 137-138.

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

SOUZA, R. M.; BRESSAN-SMITH, R. Coffee associated *Meloidogyne* spp.: ecology and interaction with plants. In: SOUZA, R. M. (Ed.). **Plant-parasitic nematodes of coffee**. Campos dos Goytacazes: Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2008. p. 123-148.

TRONCONI, N. M. et al. Influência da temperatura na patogenicidade e reprodução de *Meloidogyne exigua* em mudas de cafeeiro. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 10, n. 1, p. 69-83, dez. 1986.

VIEIRA, H. D. Coffee: the plant and its cultivation. In: SOUZA, R. M. (Ed.). **Plant-parasitic nematodes of coffee**. Campos dos Goytacazes: Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2008. p. 3-18.



## ANEXO A – Fases do desenvolvimento embrionário

