Eclosão de *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* e *M. mayaguensis* em Lixiviados de Caupi Associado a *Glomus etunicatum* e *Bradyrhizobium* sp.*

Kércya M. S. Siqueira**, Gustavo R. C. Torres**, Elvira M.R. Pedrosa*** & Romero M. Moura***

Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Dois Irmãos, CEP 52171-900, Recife, PE,
e-mail: epedrosa@ufrpe.br

(Aceito em 02/02/2004)

Autor para correspondência: Elvira Maria Regis Pedrosa

SIQUEIRA, K.M.S., TORRES, G.R.C., PEDROSA, E.M.R. & MOURA, R.M. Eclosão de *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* e *M. mayaguensis* em lixiviados de caupi associado a *Glomus etunicatum* e *Bradyrhizobium* sp. Fitopatologia Brasileira 29:259-262. 2004.

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar a influência de lixiviados de caupi (*Vigna unguiculata*) cultivar Epace 10 inoculada com *Glomus etunicatum* e/ou *Bradyrhizobium* sp. sobre eclosão de *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* e *M. mayaguensis*. O solo foi infestado com 200 esporos do fungo micorrízico e/ou 1 ml de suspensão contendo 10^8 UFC/ml das estirpes de *Bradyrhizobium* NFB 700 e NFB 652, e semeados com caupi, deixando-se plantas não inoculadas como testemunha. As plantas foram mantidas em condições de casa de vegetação, durante 57 dias após infestação, para coleta dos lixiviados. Procederam-se avaliações após 0, 24, 48 e 144 h de imersão de ovos dos nematóides em água ou lixiviados de plantas não inoculadas e inoculadas com fungo e bactéria em conjunto ou

isoladamente. O delineamento adotado foi do tipo inteiramente casualizado em arranjo fatorial $3 \times 5 \times 4$ (nematóide $\times$ lixiviado $\times$ período de exposição), com quatro repetições. *Meloidogyne javanica* apresentou maior ($P \leq 0,01$) percentual de juvenis eclodidos quando em lixiviados de plantas inoculadas simultaneamente com o fungo e a bactéria. Considerando o tempo de exposição aos lixiviados, *M. javanica* e *M. mayaguensis* apresentaram comportamento semelhante, em relação ao percentual de juvenis eclodidos, diferindo ambas de *M. incognita*, após 144 h. A eclosão de juvenis em função do tempo, em resposta a cada lixiviado, ajustou-se ($P \leq 0,01$) ao modelo quadrático.

Palavras-chave adicionais: nematóide das galhas, fungo micorrízico, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, eclosão, interação.

ABSTRACT

Hatch of *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. mayaguensis* in root leachates from cowpea associated with *Glomus etunicatum* and *Bradyrhizobium* sp.

The objective of the present work was to evaluate the influence of root leachates from cowpea (*Vigna unguiculata*) cultivar Epace 10 inoculated with *Glomus etunicatum* and/or *Bradyrhizobium* sp. on the hatching of *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. mayaguensis* juveniles. Soil was infested at planting with 200 spores of the fungus and/or 1 ml of 10^8 UFC/ml suspension of *Bradyrhizobium* sp. stirps NFB 700 and 652. Non infested soil was used as the control. Plants were allowed to grow under greenhouse conditions for 57 days after

soil infestation for leachates collection. Hatch evaluations were done at 0, 24, 48 and 144 h after eggs were immersed in water or leachings of the inoculated and non inoculated 57-day old plants. The experimental design was completely randomized in a $3 \times 5 \times 4$ (nematode $\times$ leachate $\times$ exposure time) factorial arrangement with four replicates. *Meloidogyne javanica* presented the highest ($P \leq 0.05$) percentage of hatching in leachates of plants inoculated with *G. etunicatum* and *Bradyrhizobium* sp. simultaneously. Considering the time effect on hatch, *M. javanica* did not differ from *M. mayaguensis* but both of them differed ($P \leq 0.05$) from *M. incognita* after 144 hours. Juvenile hatching versus time, in response to each leachate, fit ($P \leq 0.01$) the quadratic model.

INTRODUÇÃO

Exsudatos radiculares, mudanças sazonais no ambiente e fatores físicos e químicos que estão relacionados à diapausa de juvenis não eclodidos afetam eclosão de nematóides fitoparasitos (Idowu & Falowe, 1989). O requerimento por exsudatos radiculares de plantas hospedeiras para induzir ou aumentar eclosão, seguinte à quiescência, é mais comum entre nematóides de cisto, embora também ocorra em outras espécies, como *Meloidogyne hapla* Chitwood e *Rotylenchulus*

reniformis Linford & Oliveira (Jones *et al.*, 1998). Muitas espécies de *Meloidogyne* eclodem em água, e embora exsudatos aumentem a taxa de eclosão, não são requeridos para finalizar a quiescência (Gaur *et al.*, 2000).

Fatores relacionados à planta e ao ambiente influenciam a quantidade e composição de exsudatos radiculares. Alguns desses são: espécie vegetal, estágio de desenvolvimento da planta, tipo e fertilidade do solo, luz, tratamentos foliares, injúrias e atividade microbiana na superfície das raízes (Curl, 1982). Fatores outros modificam atividade de eclosão do exsudato em relação ao nematóide, em adição aos fatores de eclosão derivados da planta. Por exemplo, há crescente evidência do papel de fatores de origem microbiana na eclosão

*Parte da Dissertação de Mestrado do primeiro autor. UFRPE (2003)

**Bolsista da CAPES

***Bolsista do CNPq

de nematóides dos cistos (Jones *et al.*, 1998). Segundo Cronin *et al.* (1997) um isolado da rizobactéria *Pseudomonas fluorescens* Migula, em uso como agente biocontrolador, demonstrou estimular eclosão de *Globodera rostochiensis* Woll. *in vitro* e em ensaio de casa de vegetação. Fungos micorrízicos desempenham papel importante permitindo crescimento vigoroso das plantas. O micélio micorrízico associado às raízes filtra exsudatos e, por absorção diferencial, causam mudanças quantitativas e qualitativas na hospedeira. Além disso, ectomicorrizas produzem uma gama de substâncias, algumas das quais podem funcionar como antibióticos, que associadas ao efeito filtrante das hifas modificam a composição da comunidade da rizosfera, incluindo-se os nematóides (Webster, 1985). O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito de lixiviados de caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] cultivar Epace 10 inoculada com *Glomus etunicatum* Becker & Gerdemann e/ou *Bradyrhizobium* sp. Jordan sobre a eclosão de juvenis de *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood, *M. javanica* (Treub) Chitwood e *M. mayaguensis* Rammah & Hirschmann.

MATERIAL E MÉTODOS

Para produção dos lixiviados, sementes de caupi cultivar Epace 10, desinfestadas com álcool 50% por 30 s, solução de hipoclorito de sódio (0,7%) por 1 min, seguida de lavagem em água destilada esterilizada, por três vezes, foram semeadas em recipiente de 500 ml, contendo solo esterilizado com brometo de metila (100 ml/m³) e infestado com *G. etunicatum* ou *Bradyrhizobium* sp. O substrato empregado apresentou as seguintes características: pH (H₂O – 2,5:1) 4,4; P disponível 1 mg/kg; K trocável 0,4 mmolc/kg; Ca trocável 8,2 mmolc/kg; Mg trocável 5,1 mmolc/kg; N total 1,10 g/kg. A correção da acidez do solo foi realizada a fim de obter pH próximo a 5,5.

Os propágulos utilizados na infestação do solo consistiram de, aproximadamente, 200 esporos de *G. etunicatum*, provenientes de solo-inóculo e/ou 1 ml de suspensão contendo 10⁸ UFC/ml dos isolados de *Bradyrhizobium* sp. NFB 700 e NFB 652 por vaso. Em seguida, foram mantidos em condições de casa de vegetação com temperatura média de 33±2 °C, durante 57 dias após infestação. Realizaram-se adubações quinzenais, com solução nutritiva ajustada pelos resultados encontrados na análise química, não havendo fonte de fósforo e nitrogênio. Completados 55 dias, a irrigação foi suspensa por 48 h com objetivo de aumentar a exsudação. Adicionaram-se 150 ml de água e coletaram-se os lixiviados no fundo de cada recipiente, procedendo-se filtração de acordo com Schmitt & Riggs (1991). Os tratamentos foram constituídos de ovos de *M. incognita* raça 2 (Mi), *M. javanica* (Mj) e *M. mayaguensis* (Mm) expostos à água (AG = testemunha absoluta), a lixiviado de caupi não inoculado (LI = testemunha relativa), a lixiviados de plantas inoculadas com *G. etunicatum* (Ge), *Bradyrhizobium* (Br) e *G. etunicatum* + *Bradyrhizobium* (Ge + Br) com quatro períodos de exposição 0, 24, 48 e 144 h.

Os ovos foram coletados de raízes de tomateiro

(*Lycopersicon esculentum* Mill) cultivar Santa Cruz, utilizando-se metodologia descrita por Hussey & Barker (1973), e depositados em recipientes plásticos contendo 3 ml de água ou lixiviados. Todos os recipientes tiveram concentração de ovos estimada para, aproximadamente, 500 unidades por parcela e foram incubados na ausência de luz sob condições laboratoriais controladas (temperatura de 26±2 °C e umidade relativa do ar de 65±5%). O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial 5x3x4 (lixiviado x nematóide x período de exposição), com quatro repetições, sendo a unidade experimental um recipiente.

Para determinação do percentual de juvenis eclodidos (PJE) foi considerada a relação entre o número de juvenis eclodidos e o número total de ovos aferido no início do experimento por parcela, e o resultado expresso em percentagem. Os dados foram transformados em arcoseno $\sqrt{(PJE/100)}$, empregando-se análise de variância e teste de Tukey a 5% de probabilidade. Modelos lineares, logarítmicos e quadráticos foram utilizados na tentativa de descrever a eclosão das espécies de juvenis estudadas em função do período de exposição aos lixiviados. Para os modelos foram considerados os valores absolutos relativos aos totais de juvenis eclodidos transformados em $\log_{10} (x+1)$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não houve interação entre nematóide, lixiviado e período de exposição, como também não foi significativa a interação entre lixiviado e período de exposição. Entretanto, interações altamente significativas ocorreram entre nematóide × lixiviado e nematóide × período de exposição, indicando que a eclosão das espécies de *Meloidogyne* variou com o tipo de lixiviado e com o período de exposição. O maior ($P \leq 0,05$) percentual de juvenis eclodidos ocorreu quando os ovos de *M. javanica* foram expostos a lixiviados de plantas inoculadas simultaneamente com *G. etunicatum* e *Bradyrhizobium* sp. (Tabela 1). Neste caso, o percentual de eclosão de *M. javanica* foi maior ($P \leq 0,05$) do que o dos demais nematóides. As três espécies de *Meloidogyne* estudadas não diferiram quando expostas aos demais lixiviados (Tabela 1). O estímulo à eclosão, promovido pela ação conjunta do fungo e bactéria, pode estar associado ao baixo nível de fósforo do substrato. Entretanto, não foi verificado efeito da ação isolada do fungo ou, ainda, diferença entre água e lixiviados. Por outro lado, foi verificado por alguns pesquisadores (Haroon & Smart Jr, 1983; Sikora & Noel, 1996) menor estímulo à eclosão pelo lixiviado de plantas mais velhas. O ciclo do caupi, com aproximadamente 60 dias, estava quase completo quando os lixiviados foram coletados.

Com relação ao efeito do período de exposição sobre o percentual de juvenis eclodidos (Tabela 2), *M. javanica* e *M. mayaguensis* apresentaram comportamentos semelhantes, diferindo de *M. incognita*, após 144 h de exposição dos ovos aos lixiviados. Segundo De Guiran & Villemin (1980), certo grau de resistência pode retardar a eclosão. Em estudos conduzidos por Huang & Pereira (1994), a eclosão foi retardada em

TABELA 1 - Efeito de água e lixiviados de caupi (*Vigna unguiculata*) cultivar Epace 10, inoculado com *Glomus etunicatum*, *Bradyrhizobium* sp., *Glomus etunicatum* + *Bradyrhizobium* sp. e testemunha, sobre eclosão de *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* e *M. mayaguensis*, independentemente do período de exposição dos ovos

Lixiviado	Percentual de juvenis eclodidos*			Total
	<i>M. incognita</i>	<i>M. javanica</i>	<i>M. mayaguensis</i>	
AG	16,31 aA	12,22 bA	20,66 aA	16,25 b
LI	11,63 aA	10,15 bA	16,41 aA	12,62 b
Ge	9,14 aA	7,99 bA	16,51 aA	10,96 b
Br	11,43 aA	17,19 bA	22,05 aA	16,66 b
Ge + Br	20,35 aB	40,89 aA	16,55 aB	25,29 a
Total	13,54 B	16,47 AB	18,38 A	

*Para análise estatística os dados foram transformados em arcoseno ($\arcsen(x/100)$), sendo apresentados os senos. Na mesma coluna e linha, médias seguidas por mesma letra minúscula e maiúscula, respectivamente, não diferem significativamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. AG = água; LI = lixiviado de Epace 10 sem inoculação; Ge = lixiviado de Epace 10 com *G. etunicatum*; Br = lixiviado de Epace 10 com mistura de estirpes de *Bradyrhizobium* sp.; Ge + Br = lixiviado de Epace 10 com *G. etunicatum* + *Bradyrhizobium* sp.

TABELA 2 - Percentual de juvenis de *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* e *M. mayaguensis* eclodidos após 24, 48 e 144 h de exposição dos ovos a água e lixiviados de caupi (*Vigna unguiculata*) cultivar Epace 10, independentemente do tipo de lixiviado

Espécie	Percentual de juvenis eclodidos*		
	Horas de exposição		
	24	48	144
<i>M. incognita</i>	9,62 aB	22,42 aA	22,99 bA
<i>M. javanica</i>	7,12 aB	14,33 aB	31,43 aA
<i>M. mayaguensis</i>	6,55 aB	15,20 aB	38,54 aA

*Para análise estatística os dados foram transformados em arcoseno ($\arcsen(x/100)$), sendo apresentados os senos. Na mesma coluna e linha, médias seguidas por mesma letra minúscula e maiúscula, respectivamente, não diferem significativamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

ovos oriundos de plantas resistentes incubados em água. No presente estudo não foi determinado o grau de resistência às três espécies de *Meloidogyne* da cultivar de caupi utilizada, contudo os ovos utilizados no experimento foram coletados de tomateiro cultivar Santa Cruz, altamente susceptível. A eclosão dos juvenis em resposta aos diferentes lixiviados ajustou-se ($P \leq 0,01$) ao modelo quadrático, sendo descrita através das seguintes equações: $\log Y = 0,08439 + 0,04954X - 0,00026033X^2$; $R^2=0,84^{**}$ (em água), $\log Y = 0,09977 + 0,04824X - 0,00025497X^2$; $R^2=0,88^{**}$ (em lixiviado de caupi não inoculado), $\log Y = 0,08732 + 0,04503X - 0,00023611X^2$; $R^2=0,70^{**}$ (em lixiviado de caupi inoculado com *G. etunicatum*), $\log Y = 0,13360 + 0,05188X - 0,00027779X^2$; $R^2=0,86^{**}$ (em lixiviado de caupi inoculado com *Bradyrhizobium* sp.), $\log Y = 0,10721 + 0,05472X - 0,00028865X^2$; $R^2=0,94^{**}$ (em

lixiviado de caupi inoculado com *Bradyrhizobium* sp. e *G. etunicatum*). De acordo com os modelos (Figura 1) dentro do intervalo estudado, o pique de eclosão ocorreu entre 24 e 144 h de exposição dos ovos à água ou lixiviados, exceto em lixiviados procedentes de caupi inoculados com *G. etunicatum* e *Bradyrhizobium* sp. simultaneamente. Neste caso é provável que o pique de eclosão tenha ocorrido após 144 h, apesar do maior ($P 0,05$) percentual de juvenis eclodidos apresentado (Tabela 1).

FIG. 1 - A: Eclosão de *Meloidogyne incognita* raça 2, *M. javanica* e *M. mayaguensis* após 0, 24, 48 e 144 h de imersão dos ovos em água ($\log Y = 0,08439 + 0,04954X - 0,00026033X^2$), em lixiviados de plantas de caupi (*Vigna unguiculata*) cultivar Epace 10 não inoculadas ($\log Y = 0,09977 + 0,04824X - 0,00025497X^2$), inoculadas com *Glomus etunicatum* ($\log Y = 0,08732 + 0,04503X - 0,00023611X^2$), inoculadas com *Bradyrhizobium* sp. ($\log Y = 0,13360 + 0,05188X - 0,00027779X^2$). B: Inoculadas com *Bradyrhizobium* sp. e *G. etunicatum* ($\log Y = 0,10721 + 0,05472X - 0,00028865X^2$).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CRONIN, D., MOENNE-LOCCOZ, Y., FENTON, A., DUNNE, C., DOWLING, D.N. & O'GARA, F. Role of 2,4-

- diacetylphloroglucinol in the interactions of the biocontrol pseudomonas strain F113 with the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. Applied and Environmental Microbiology 63:1357-1361. 1997.
- CURL, E.A. The rhizosphere: relation to pathogen behavior and root disease. Plant Disease 66: 624-630. 1982.
- DE GUIRAN, G. & VILLEMIN, M.A Spécificité de la diapause embryonnaire des oeufs de *Meloidogyne* (Nematoda). Revue de Nématologie 3:115-121. 1980.
- GAUR, H.S., BEANE, J. & PERRY, R.N. The influence of root diffusate, host age and water regimes on hatching of the root-knot nematode, *Meloidogyne triticozyae*. Nematology 2:191-199. 2000.
- HAROON, S. & SAMART JR, G.C. Root extracts of pangola digitgrass affect egg hatch and larval survival of *Meloidogyne incognita*. Journal of Nematology 15:646-649. 1983.
- HUANG, S.P. & PEREIRA, A.C. Influence of inoculum density, host, and low temperature period on delayed hatch of *Meloidogyne javanica* eggs. Journal of Nematology 26:72-75. 1994.
- HUSSEY, R.S. & BARKER, K.R. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. Plant Disease Reporter 57:1025-1028. 1973.
- IDOWU, A.A. & FAWOLE, B. Effects of cowpea and maize root leachates on *Meloidogyne incognita* egg hatch. Journal of Nematology 22:136-138. 1989.
- JONES, P.W., TYLKA, G.L. & PERRY, R. In: Perry, R.N. & D.J. Wright (Eds) The Physiology and Biochemistry of Free-living and Plant-parasitic Nematodes. London. CABI Publishing. 1998. pp. 181-212.
- SCHIMITT, D.P. & RIGGS, R.D. Influence of selected plant species on hatching of eggs and development of juveniles of *Heterodera glycines*. Journal of Nematology 23:1-6. 1991.
- SIKORA, E.J. & NOEL, G.R. Hatch and emergence of *Heterodera glycines* in root leachate from resistant and susceptible soybean cultivars. Journal of Nematology 28:501-509. 1996.
- WEBSTER, J.M. Interaction of *Meloidogyne* with fungi on crop plants. In: Sasser, J.N. & Carter, C.C. (Eds). An Advanced Treatise on *Meloidogyne*. v. 1. Biology and Control. Raleigh. North Carolina University Graphics. 1985. pp.183-192.