

Efeitos das Temperaturas Durante as Estações do Ano e do Resfriamento do Solo Infestado na Sobrevivência e Infectividade de *Ditylenchus dipsaci*¹

RENATA CESAR VILARDI TENENTE²
& ADRIAN A.F. EVANS³

RESUMO

Tenente, R.C.V. & A.A.F. Evans, 1995. Efeitos das temperaturas durante as estações do ano e do resfriamento do solo infestado na sobrevivência e infectividade de *Ditylenchus dipsaci*. **Nematol. Brasileira** 19:29-40.

Os efeitos das estações do ano e do resfriamento do solo infestado com *D. dipsaci* foram avaliados pela extração de nematóides do solo (sobrevivência) e pela infestação em plântulas de cebola, feijão, aveia e alfafa (infectividade). Foram realizadas seis coletas de solo e, em cada uma delas, este foi dividido 50% para cada tratamento, com ou sem resfriamento. As raças de *D. dipsaci* utilizadas foram a da aveia, da alfafa e do feijão. Após um mês de resfriamento do solo, o mesmo procedimento foi aplicado ao solo trabalhado imediatamente após as coletas em campo, isto é, extração e plantio dos hospedeiros. Os números de nematóides e de seus estádios foram contados separadamente. Comparando as amostras resfriadas a 5°C com as não resfriadas, verificou-se que, na sobrevivência, a raça do feijão teve um aumento no número de nematóides, para as amostras coletadas no inverno e resfriadas. Tal observação não foi verificada para a raça da aveia, que não apresentou aumento no número de nematóides sobreviventes recuperados; a raça da alfafa mostrou acentuado decréscimo no número de nematóides sobreviventes recuperados do solo resfriado. Resultados diferentes daqueles obtidos para sobrevivência foram verificados na avaliação da infectividade da raça do feijão, aumentada pelo resfriamento do solo

Recebido para publicação: 4/7/1994.

¹ Parte da Tese de PhD do primeiro autor, no Imperial College, Universidade de Londres - Inglaterra.

² EMBRAPA/CENARGEN. Cx.P. 2372. 70849-970 Brasília, DF.

³ Imperial College/Silwood Park, Ascot, Berks SL5 7PY Inglaterra.

no outono, e da aveia com aumento no número de nematóides resfriados durante o inverno. Para a raça da alfafa, a infectividade não se alterou, mas a reprodução dos nematóides aumentou ligeiramente no inverno. Os resultados mostraram que não só a infectividade foi afetada pelo resfriamento do solo, mas também a sobrevivência, sugerindo que a presença de diapausa em *D. dipsaci* é um importante fator na sobrevivência da espécie.

Palavras-chaves: *Ditylenchus dipsaci*, dormência, infectividade, raças, sobrevivência.

SUMMARY

Tenente, R.C.V. & A.A.F. Evans, 1995. Effects of seasonal temperature and soil chilling on *Ditylenchus dipsaci* survival and infectivity. **Nematol. Brasileira** 19:29-40.

Seasonal temperature and soil chilling effects on *Ditylenchus dipsaci* survival and infectivity (were studied using the bean, oat and lucerne races. After collecting, fifty percent of the soil samples were immediately chilled at 5C during one month and the remaining samples were divided into two parts. One was used to extract nematodes, for checking *D. dipsaci* survival. The other part was used to grow onion and named hosts in bioassays which lasted one month, under greenhouse condition, before evaluating infectivity. Nematodes were counted separately for each stage of *D. dipsaci*. The same procedure was applied to the soil that had been chilled for a month, for verifying survival (extractability) and infectivity (bioassay). When results from unchilled and chilled samples were compared it was shown that survival of the bean race increased in chilled samples collected during the winter. For the oat and lucerne races, the number of surviving nematodes decreased. Infectivity of the bean race increased with soil chilling during autumn while for the oat race infectivity increased in samples collected during the winter. The lucerne race showed lower increasing in infectivity, in samples collected during winter, although the number was lower when compared with other races. Therefore the results showed that survival and infectivity were affected by soil chilling and seasonal temperature. These results suggested that diapause is present in *D. dipsaci*.

Key words: *Ditylenchus dipsaci*, dormancy, infectivity, races, survival.

INTRODUÇÃO

A temperatura tem demonstrado ser um fator limitante sobre a atividade de *Ditylenchus dipsaci* e torna-se mais importante quando ligada à umidade (Bosher & McKeen, 1954; Webster, 1964; Evans & Perry, 1976; Pimentel & Huang, 1985,

e Antoniou & Evans, 1987). As condições ambientais oferecidas durante as estações do ano são também fatores que afetam a habilidade desse parasito no solo e na infecção de plantas hospedeiras (Webster, 1967; Miyagawa & Lear, 1970; Saygusa & Yamamoto, 1972).

A influência das estações na atividade de *D. dipsaci* pode ser explicada pelas diferentes temperaturas alcançadas em cada uma delas. Entretanto, Saygusa & Yamamoto (1972) observaram um aumento na recuperação de nematóide do solo coletado no verão e resfriado, sugerindo, portanto, que a atividade desse parasito foi afetada pelo prévio resfriamento. Discrepâncias podem ser observadas nos relatos sobre a sobrevivência e infectividade de *D. dipsaci*, podendo algumas dessas ser influenciadas pelo período de coleta de amostras do campo (estação do ano), pela umidade, pela temperatura e pela raça do nematóide (Wallace, 1962; Webster, 1964; Griffin, 1968; Sturhan, 1971; Rivoal, 1979; Hooper, 1984, e Whitehead, 1984). Portanto, os efeitos das estações do ano, bem como do resfriamento do solo infestado, foram avaliados neste trabalho. Além disso, o hospedeiro nomeado de cada raça (feijão, aveia e alfafa), foi incluído, bem como plântulas de cebola, para avaliação da infectividade em bioensaios suplementares.

MATERIAL E MÉTODOS

As raças de feijão, aveia e alfafa utilizadas foram procedentes da Estação Experimental de Rothamsted, Harpenden, Inglaterra, de áreas cultivadas com *Vicia faba* (raças aveia e feijão) cv. Minden e *Medicago sativa* (raça alfafa) cv. Europa. Foram realizadas seis coletas de solo cobrindo um período de 18 meses (setembro/87 a março/89). As amostras foram trazidas ao laboratório, sendo metade (50%) do volume coletado resfriado a 5° C durante um mês e, metade, subdividida, sendo 25% para extração do solo mediante a técnica da bandeja (Whitehead & Hemming, 1965) e 25% para plantio imediato de feijão, aveia, alfafa e de plântulas de cebola. As plantas usadas nos bioensaios, após um mês de transplantadas, foram coletadas e coloridas com fucsina ácida (0,5%) segundo Bridge et al. (1982), e o solo usado para plantio também passou pela extração da bandeja. Foi adotado o mesmo procedimento em relação às amostras resfriadas a 5° C/um mês. Em ambos os ensaios determinaram-se os números de nematóides e de seus estádios separadamente. Foi aplicada a análise da variância (ANOVA) aos dados obtidos, constando cada tratamento de quatro repetições.

RESULTADOS

Raça do feijão: Significativamente ($P < 0,01$) elevado número de nematóides da população da raça do feijão foi recuperado do solo (sobrevivência) não resfriado, comparado àquele obtido do solo resfriado a 5°C /um mês, exceto na coleta realizada em fevereiro/88 (Fig. 1). Portanto, a densidade populacional de *D. dipsaci* oscilou durante as estações do ano. Grande número de nematóides foi encontrado ao final do verão, decrescendo até maio (primavera), alcançando o pico máximo em setembro (início do outono), antes de diminuir novamente (Fig. 1A).

Em relação à infectividade, a raça do feijão mostrou diferente tendência comparada à sobrevivência, pois o parasito resfriado (5°C /um mês) encontrado foi significativamente ($P < 0,01$) maior para infectar as plantas de cebolas em setembro (final do verão) e dezembro (final do outono) (Fig. 1B). Entretanto, a capacidade de *D. dipsaci* infectar foi menor na primavera e no verão, quando se utilizou a cebola como hospedeiro (Fig. 1B), após resfriamento. Resultados contrários aos da cebola foram obtidos quando se utilizou feijão como planta hospedeira (Fig. 1C), pois o número de nematóides recuperados de amostras resfriadas foi sempre menor que o obtido de solo não resfriado.

A composição dos estádios da população de *D. dipsaci* raça do feijão encontrada nos ensaios de sobrevivência e de infectividade, em feijão e cebola, mostrou que, em todos os períodos de coleta, o quarto estágio larval (L4) foi predominante. O número de nematóides adultos (machos e fêmeas) cresceu com o resfriamento do solo na coleta realizada em fevereiro e diminuiu em maio, quando comparado ao número obtido de amostras não resfriadas. Simultaneamente, poucas larvas do segundo e terceiro estádios (L2 e L3) estiveram em evidência quando o feijão foi usado como planta hospedeira, comparado à planta de cebola, para solo não resfriado. Entretanto, em solo previamente resfriado, as larvas do segundo e terceiro estádios não apareceram, quando se utilizou o feijão como hospedeiro.

Raça da aveia: Os resultados para a raça da aveia foram similares aos obtidos com a do feijão, embora mostrassem algumas diferenças no estudo da população total em relação à sobrevivência, onde se obteve significativa redução no número de nematóides recuperados do solo após o resfriamento (5°C /um mês), com exceção da coleta realizada em fevereiro/88 (Fig. 2A).

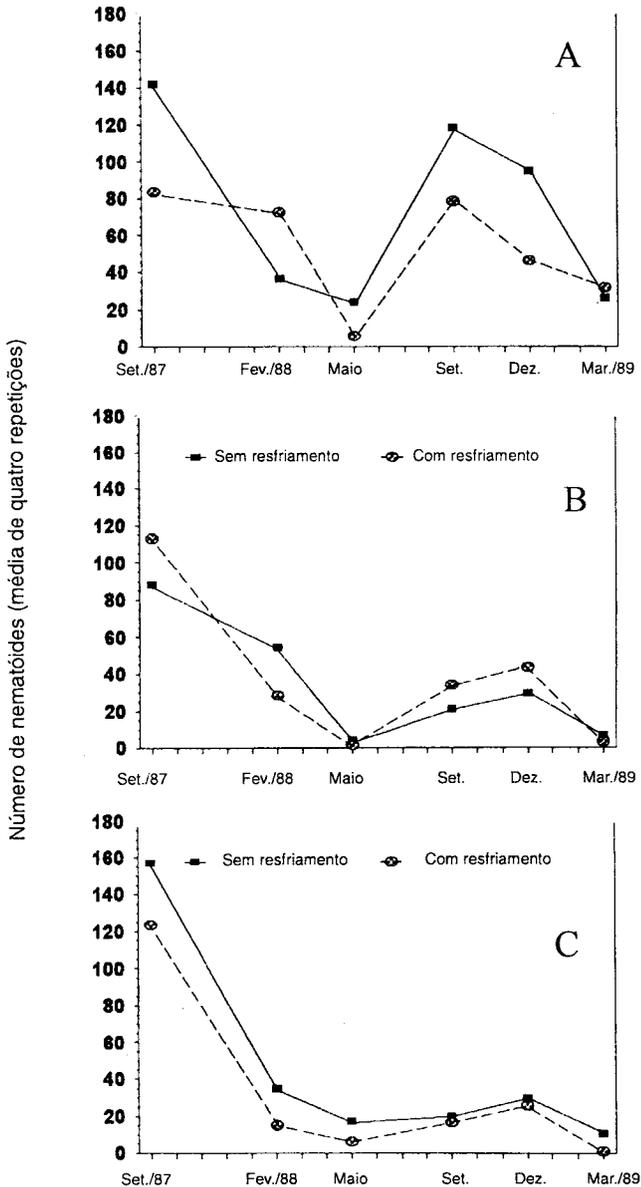


Figura 1. Média do número total de *Ditylenchus dipsaci* raça do feijão, recuperados do solo com ou sem resfriamento, e de plantas, durante as estações do ano. A: sobrevivência: raça feijão; B: bioensaio: cebola; C: bioensaio: feijão.

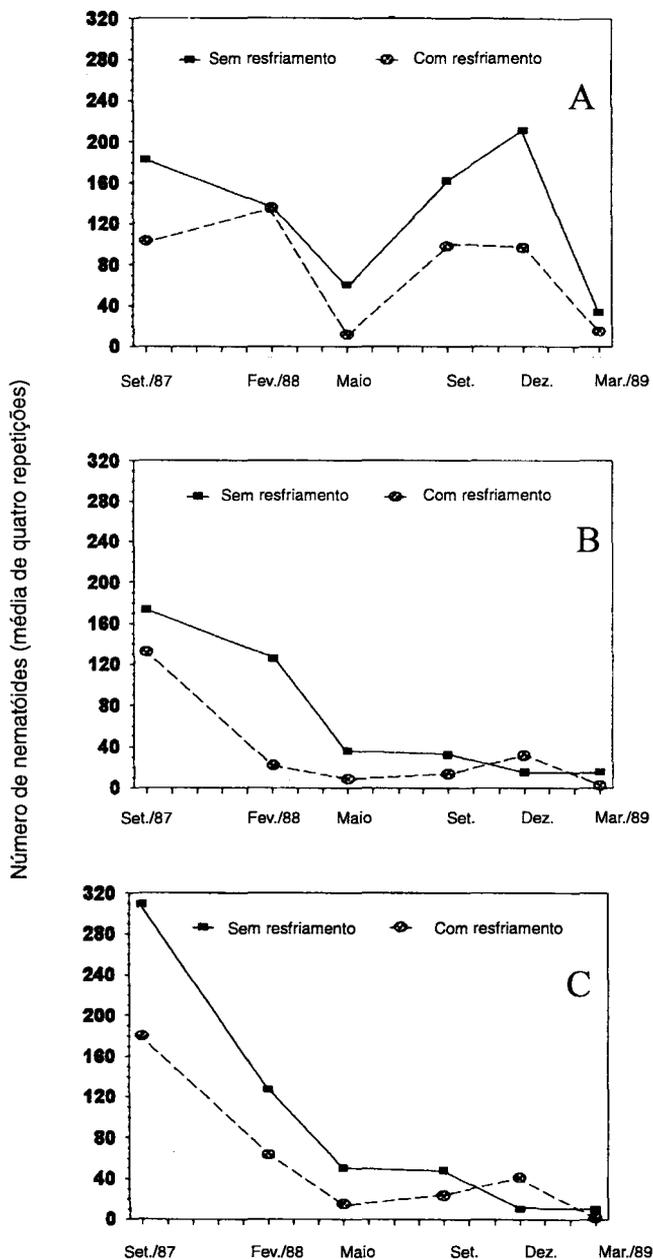


Figura 2. Média do número total de *Ditylenchus dipsaci* raça da aveia, recuperados do solo com ou sem resfriamento e de plantas, durante as estações do ano. A: sobrevivência: raça aveia; B: bioensaio: cebola; C: bioensaio: aveia.

A infectividade também mostrou similar tendência em relação à sobrevivência e foi significativamente maior quando seguida do resfriamento, em dezembro/88, independentemente do hospedeiro usado, para verificar a invasão dos nematóides da raça da aveia.

A composição da população dessa raça apresentou poucas diferenças entre as amostras resfriadas ou não, exceto que maior número de adultos foi observado para sobrevivência em fevereiro/88 (solo natural) e dezembro/88 (solo resfriado). Na infectividade em cebola ou aveia, o número de adultos (machos e fêmeas) foi significativamente maior em fevereiro/88, comparado a outras épocas de coleta.

Para a raça da aveia, o número de L4 foi sempre maior que 75% para a maioria dos períodos de coleta, associado ao prévio resfriamento do solo infestado.

Raça da alfafa: Os resultados obtidos referem-se somente aos quatro primeiros períodos de coleta de solo, isto é, até setembro/88, perfazendo um ano de observação.

A sobrevivência no solo da raça da alfafa de *D. dipsaci* decresceu significativamente durante os períodos de coleta até que nenhum indivíduo foi recuperado no final da amostragem (Fig. 3A, B, C), tanto no solo natural como no resfriado. O número de nematóides sobreviventes, para a raça da alfafa, foi sempre menor que das outras duas raças envolvidas, independentemente de a extração ter sido realizada sobre o solo natural ou resfriado.

A infectividade foi verificada usando cebola e alfafa como hospedeiros e mostrou diferenças na recuperação de nematóides, que foi menor quando comparado com o número obtido da sobrevivência (Fig. 3A, B, C). O resfriamento do solo (5°C/um mês) somente não afetou os estádios L2 e L3, mas o número de L4 aumentou significativamente ($P < 0,05$) no bioensaio, mais em cebola do que em alfafa, embora o número em cada caso fosse sempre baixo, comparado com as outras raças. Independente do pequeno número de nematóides encontrados, os resultados sugerem que L2, L3 e L4 responderam positivamente ao resfriamento do solo infestado, enquanto os adultos reagiram de forma negativa.

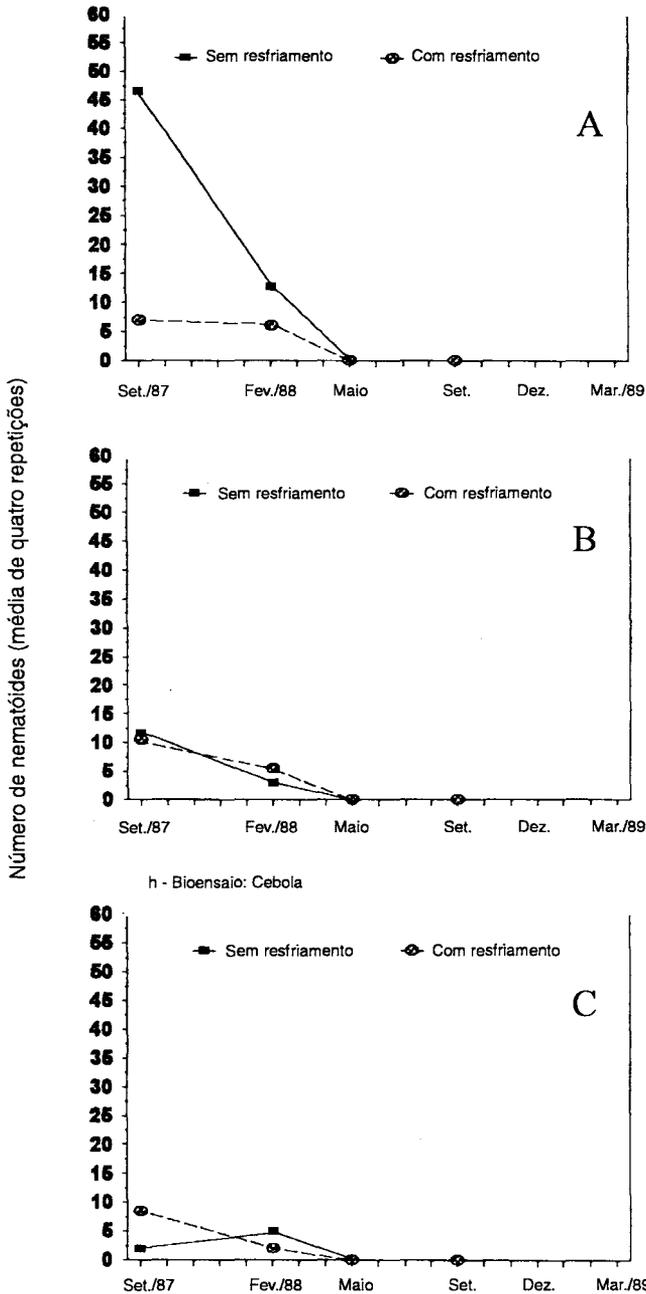


Figura 3. Média do número total de *Ditylenchus dipsaci* raça da alfafa, recuperados do solo com ou sem resfriamento e de plantas, durante as estações do ano. A: sobrevivência: raça alfafa; B: bioensaio: cebola; C: bioensaio: alfafa.

DISCUSSÃO

O decréscimo populacional de *D. dipsaci* foi substancial, para as raças do feijão, da aveia e da alfafa, na sobrevivência do nematóide, em solo resfriado, com exceção de dezembro/88, para a raça da aveia.

Para as raças do feijão e da aveia, os resultados mostraram que o resfriamento prévio do solo estimulou a recuperação de nematóides, quando coletados ao final do inverno (fevereiro), comparada ao número de nematóides encontrados no início do inverno (dezembro). Além disso, o resfriamento prévio do solo afetou negativamente a infectividade desses nematóides, exceto no outono e no início do inverno. Esses resultados apresentaram diferenças entre as raças estudadas e concordam com aqueles encontrados por Wallace (1962), Webster (1964), Griffin (1968), Sturhan (1971), Rivoal (1979), Hooper (1984) e Whitehead (1984).

A influência induzida pelo resfriamento do solo infestado evidentemente tem maior efeito sobre L4, para as populações das raças da aveia e do feijão. Esse estágio larval foi o predominante quando comparado aos estádios L2, L3 e adultos (machos e fêmeas), tanto para o solo sem ou com resfriamento. Entretanto, os resultados sugerem que a exposição à baixa temperatura nem sempre é necessária para induzir maior extração de nematóides, mas, também, o efeito da temperatura das estações do ano. Portanto, a atividade de *D. dipsaci* foi afetada pelo resfriamento do solo infestado, expressado com um decréscimo significativo na recuperação de nematóides, exceto para a raça da alfafa, que não apresentou diferenças significativas. Alguns desses resultados foram similares àqueles encontrados por Saygusa & Yamamoto (1972), Ogunfowora & Evans (1977) e Antoniou & Evans (1987).

Os resultados obtidos sugerem que a L4 de *D. dipsaci* pode entrar em um estágio de dormência, facilitando a sua sobrevivência no solo durante o inverno, na ausência da planta hospedeira, sendo maior para as raças do feijão e aveia do que para a raça da alfafa.

A ocorrência de tal dormência é confirmada pelos resultados obtidos nos bioensaios usando cebola ou os nomeados hospedeiros (aveia, feijão e alfafa). Há forte evidência de que os nematóides dessas raças respondam ao prévio resfriamento, mostrando maior infectividade às plantas hospedeiras comparadas com aqueles não resfriados ou mesmo comparados com os números de nematóides sobreviventes em alguns meses de coleta de solo. No início da estação

de crescimento, a primavera, a maioria dos L4 parece ser capaz de responder à presença da planta hospedeira, sendo essa condição mantida durante o bioensaio (um mês a $\pm 15^{\circ}\text{C}$), o que permitiu que as larvas migrassem no solo e invadissem as plantas hospedeiras. Entretanto, os nematóides resfriados em solo coletado durante o inverno revelaram-se, em sua maioria, L4 (raça do feijão). Mas, isso não foi evidenciado para L4 da raça da aveia, com exceção do solo coletado em dezembro/87. Para L4, raça da alfafa, a resposta ao prévio resfriamento dos nematóides foi baixa e um pequeno número de indivíduos foi recuperado de solo resfriado ou não, bem como de solo com ou sem hospedeiro. Esses resultados, para raça de alfafa, concordam com aqueles obtidos por Watson & Lownsbery (1970), que não encontraram diferenças significativas entre ovos resfriados ou não de *Meloidogyne naasi*, embora a eclosão desses ovos resfriados tenha sido maior que a dos não resfriados. De outra parte, as diferenças entre as raças relacionadas ao resfriamento prévio dos nematóides, encontradas neste trabalho, apresentam similaridade com as encontradas entre raças de *Heterodera avenae* por Rivoal (1979). Os resultados presentes sugerem que nem todas as larvas (L4) de *D. dipsaci* entram em diapausa durante o inverno, induzidas pelas baixas temperaturas, porque a maioria delas, das populações de nematóides recuperadas do solo, falharam ao responder ao tratamento de resfriamento, como foi evidenciado pela significância na análise de interação entre hospedeiro, período de coleta de amostras e a temperatura de tratamento, afetando diferentes estádios de *D. dipsaci*.

CONCLUSÃO

A L4 pode entrar em dormência, facilitando a sua sobrevivência no solo durante o inverno, na ausência da planta hospedeira e, por último, maior sobrevivência para raças do feijão e aveia do que para a da alfafa. Os resultados ainda indicam a presença da diapausa, evidenciada nos bioensaios das três raças, para os espécimes do 4º estágio larval.

LITERATURA CITADA

- ANTONIOU, M. & A.A.F. EVANS, 1987. Diapause in *Meloidogyne naasi* eggs: I. The effect of constant temperature incubation on subsequent hatch. *Nematologica*, 33(1):186-198.

- BOSHER, J. E. & W. E. McKEEN, 1954. Lyophilization and low temperature studies with the bulb and stem nematode, *Ditylenchus dipsaci*. Proceedings of the Helminthological Society of Washington, 21:13-17.
- BRIDGE, J.; S. L. J. PAGE & S.M. JORDAN, 1982. An improved method for staining nematodes in roots. In: Rothamsted Experimental Station Report for 1981, Part 1. Lawes Agricultural Trust, Harpenden, Herts, U.K. 322p.
- EVANS, A.A.F. & R.N. PERRY, 1976. Survival strategies in nematodes. In: Neil A., ed. The Organization of Nematodes. Croll Academic Press London and New York. p. 383-424.
- GRIFFIN, G.D., 1968. The pathogenecity of *Ditylenchus dipsaci* to alfalfa and the relationship of temperature to plant infection and susceptibility. *Phytopathology*, 58: 929-932.
- HOOPER, D.J., 1984. Observations on stem nematodes, *Ditylenchus dipsaci*, attacking field beans *Vicia faba*. Rothamsted Experimental Station Report for 1983. Part 2. p. 239-259.
- MIYAGAWA, S.T. & B. LEAR, 1970. Factors influencing survival of *Ditylenchus dipsaci* (Kühn, 1857) in soil. *Journal of Nematology*, 2: 139-142.
- OGUNFOWORA, A.O. & A.A.F. EVANS, 1977. Factors affecting the hatch of eggs of *Meloidogyne naasi*, an example of diapause in a second-stage larva. *Nematologica*, 23: 137-146.
- PIMENTEL, J.P. & C.S. HUANG, 1985. Sobrevivência no solo, círculo de hospedeiras e reação de cultivares de alho (*Allium sativum* L.) a *Ditylenchus dipsaci* no Brasil. (Dissertação de Mestrado) - Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas, Depto. de Biologia Vegetal. 62p.
- RIVOAL, R., 1979. Biologie d' *Heterodera avenae* Woll. en France. 2. Étude des differences dans les conditions thermiques d'éclosion des races, Fr. 1 et Fr. 4. *Revue Nematol.*, 2:233-248.
- SAYGUSA, T. & Y. YAMAMOTO, 1972. Effect of low temperature on the detection of bulb and stem nematode, *Ditylenchus dipsaci* (Kühn) Filipjev of narcissus from field soil in summer. *Research Bulletin of Plant Protection in Japan*, 10:1-7.
- STURHAN, D., 1971. Biological races. In: Zuckerman B.M. ; W.F. Mai & R.A. Rohde, eds. *Plant Parasitic Nematodes*. Academic Press London and New York. v.2, p.51-57.
- WALLACE, H.R., 1962. Observations on the behaviour of *Ditylenchus dipsaci* in soil. *Nematologica*, 7:91-101.

- WATSON, T.R. & B.R. LOWNSBERY, 1970. Factors influencing the hatching of *Meloidogyne naasi*, and a comparison with *M. hapla*. *Phytopathology*, 60:457-460.
- WEBSTER, J.M., 1964. The effect of storage conditions on the infectivity of narcissus stem eelworm. *Plant Pathology*, 13:151-154.
- WEBSTER, J.M., 1967. The significance of biological races of *Ditylenchus dipsaci* and their hybrids. *Annual of Applied Biology*, 59:77-83.
- WHITEHEAD, A.G., 1984. Interaction of three lucerne cultivars and eleven English isolates of stem nematodes (*Ditylenchus dipsaci*), "lucerne race". *Plant Pathology*, 33:33-37.
- WHITEHEAD, A.G. & J.R. HEMMING, 1965. A comparison of some quantitative methods of extracting small vermiform nematodes from soil. *Annals of Applied Biology*, 55:25-38.