

REPRODUÇÃO DE *Ditylenchus dipsaci* RAÇA 'TEASEL' SOBRE CALO DE ALFAFA (*Medicago sativa*)¹RENATA C.V. TENENTE² & ADRIAN A.F. EVANS³

RESUMO

Tenente, R.C.V. & A.A.F. Evans, 1992. Reprodução de *Ditylenchus dipsaci* raça 'teasel' sobre calo de alfafa (*Medicago sativa*). Nematol. Brasileira 16(1): 19-26.

A reprodução de *Ditylenchus dipsaci* raça "teasel" sobre calo de alfafa (*Medicago sativa* L.) foi estudada, inoculando 50 J4s por parcela, em calos com uma e três semanas de crescimento, usando meio de cultura de Murashige e Skoog modificado, sem (MS) e com inositol (MSi), e incubando a 15, 20 e 25°C, no escuro, por oito semanas. A multiplicação dos nematóides foi maior em calo de uma semana, que cresceu em MS e foi mantido a 20°C. O J4 foi sempre o estágio mais numeroso, compreendendo de 44,0 a 80,5% da população recuperada de cada tratamento.

Palavras chaves: cultura de tecido; multiplicação; nematóide dos caules.

SUMMARY

Tenente, R.C.V. & A.A.F. Evans, 1992. Reproduction of *Ditylenchus dipsaci* teasel race on lucerne callus. Nematol. Brasileira 16(1): 19-26.

The reproduction of *Ditylenchus dipsaci* teasel race on lucerne callus (*Medicago sativa* L.) was studied, inoculating fifty J4s per replicate on one week and three weeks old callus, using modified Murashige and Skoog medium, without (MS) and with inositol (MSi), and incubating at 15, 20 and 25°C, in the dark, during eight weeks. The multiplication of nematodes was greater in the treatment with 1 wk-old callus, growing on MS and kept under 20°C. However, *D. dipsaci* could be propagated at all temperatures and media used in this experiment, but the numbers of nematodes produced were always low. The J4 was always the stage most numerous, being from 44.0 to 80.5% of

¹ Recebido para publicação: 14/04/1992. Aceito: 29/09/92.

Parte da tese de doutoramento do primeiro autor.

² CENARGEN/EMBRAPA - C.P. 10.2372, 70770-000 - Brasília, DF.

³ IMPERIAL COLLEGE, Silwood Park, Ascot-Berks SL5 7PY - Inglaterra.

the nematode population recovered from each treatment.

Key words: alfafa; rearing; Stem nematode; tissue culture.

INTRODUÇÃO

Muitos dos estudos com nematóides parasitos de plantas, como os de seleção de espécies ou variedades de plantas resistentes ou os de identificação de espécies ou populações desses parasitos, usando eletroforese de proteínas, requerem-nos em grande número. Sua obtenção em cultura de calo não é técnica nova e vem sendo frequentemente descrita na literatura nematológica. *D. dipsaci* é uma das espécies parasitas obrigatórias que podem proliferar em tecido de alfafa "*in vitro*" e produzir grande quantidade de indivíduos (Krusberg, 1960; 1961; Webster e Lowe, 1966; Webster, 1967; Riedel e Foster, 1970; Riedel *et al.*, 1973; Faulkner *et al.*, 1974 e Philippi e Pichard, 1988).

Neste trabalho, relatamos um dos ensaios que realizamos, visando aperfeiçoar técnicas existentes de desinfecção, inoculação e incubação de culturas, para criar *D. dipsaci* raça 'teasel' em calo de alfafa e, a partir de pequeno número, obtê-lo em quantidade.

MATERIAL E METODOS

O ensaio foi um fatorial 2X2X3, totalizando 12 tratamentos, com 10 repetições por tratamento, para se verificar a taxa de reprodução de *D. dipsaci* raça teasel, após 8 semanas, a partir de 50 juvenis de 4º estágio (J4) em calos obtidos de raízes de alfafa, sob diferentes condições. Foram utilizados calos de uma e de três semanas de idade, cultivados em meio de Murashige e Skoog (1962) modificado, sem (MS) e com inositol (MSi) e incubados a 15, 20 ou 25°C.

Para a obtenção dos calos, sementes de alfafa (*Medicago sativa*) cv. Europa foram desinfectadas pela imersão em solução de hipoclorito de sódio a 20%, durante 15 minutos, e lavadas por 3 a 4 vezes em água destilada estéril. A seguir, foram postas para germinar em placas

de Petri com ágar (1%), à temperatura de 20°C ($\pm$ 3°C) por 4 a 7 dias. Em ensaio preliminar, com diversas partes das plântulas, somente as raízes produziram calo. As raízes novas emitidas foram cortadas, desinfectadas por imersão em álcool etílico (90%) por um minuto e em hipoclorito de sódio (20%) durante dez minutos, lavadas em água destilada estéril e colocadas em papel de filtro para eliminar o excesso de água. Os pedaços de raízes foram semeados em meio de Murashige e Skoog (1962) modificado, sem (MS) ou com inositol (MSi). Esse meio foi o que apresentou os melhores resultados em ensaios preliminares.

O meio de Murashige e Skoog ("Flow Laboratory" UK) foi modificado no seguinte, para o preparo de 1 litro, com pH 5.7: sacarose = 30 g; ágar = 7 g; Kinetina = 2 mg; 2,4D = 2 mg e inositol = 100 mg, no MSi. O meio sem inositol (MS) foi preparado sem esse componente. Depois de esterilizados, 20 ml dos meios foram colocados em frascos de 50 ml, logo vedados com tampas previamente esterilizadas.

Para se ter o inóculo, *D. dipsaci* raça 'teasel' foi extraído de tecidos secos de cardo (= 'teasel') infestado, durante 12 a 48 horas, pela técnica de bandeja modificada (Whitehead e Hemming, 1965). Os nematóides vivos foram coletados em peneira de malha de 25 μ m e centrifugados a 4500 rpm por 5 minutos. Após o descarte do sobrenadante, foram ressuspensos em solução de cloreto de mercúrio (1%) e sulfato de estreptomicina (1%), para desinfectá-los externamente, segundo a técnica de Moody *et al.* (1973). Após nova centrifugação, eles passaram por três lavagens em água destilada estéril. O inóculo consistiu só de juvenis de 4º estágio (pré-adultos ou J4), a razão de 50 por parcela, já que em ensaio preliminar não se observou multiplicação de *D. dipsaci* com inóculos de 5, 10 e 20 juvenis por calo, mas se teve êxito com 50 exemplares. Para a inoculação, os 50 J4s foram transferidos, um a um, para uma rodela de ágar (0,1 cm de diâmetro) e esta foi colocada sobre o calo, que constituía uma das parcelas do ensaio.

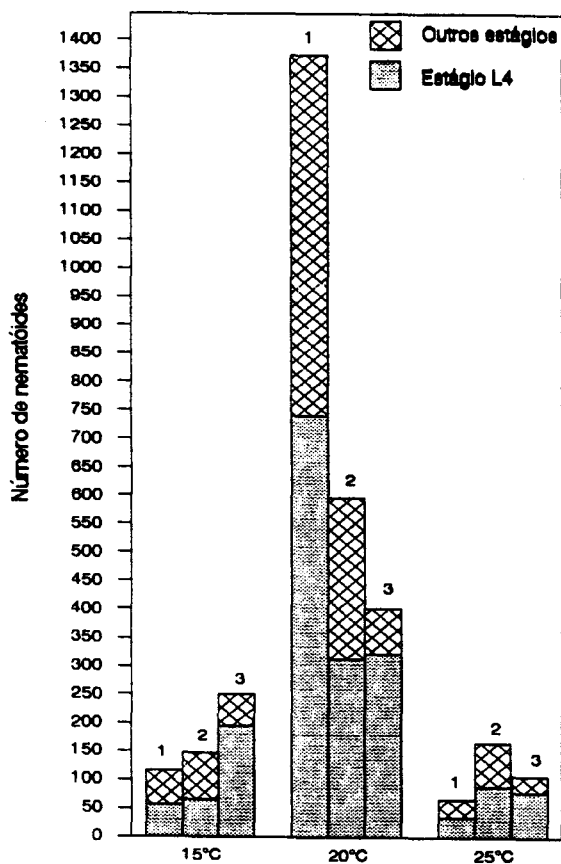
Para avaliar o efeito da temperatura na multiplicação de *D. dipsaci*, as culturas inoculadas foram incubadas a 15°, 20° ou 25°C, no escuro, já que essa condição é relatada como melhor do que a com luz (Faulkner *et al.*, 1974).

Os nematóides foram extraídos dos calos de alfafa e respectivos substratos, separadamente, após 8 semanas de incubação, empregando-se a técnica da bandeja modificada. Desta forma, a água destilada foi trocada em intervalos de doze horas e os nematóides contados diariamente, durante oito dias consecutivos, de dez vidros de cultura (repetições) de cada tratamento.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se a multiplicação de *D. dipsaci* em todos os tratamentos, com diferenças em número devidas às idades das culturas ao se inocular os nematóides, aos meios de crescimento e, principalmente, às temperaturas de incubação. Embora ensaios realizados anteriormente tenham mostrado bons resultados com a técnica de desinfecção dos nematóides aqui utilizada, todas as repetições com calos de 3 semanas e crescidos em MS sem inositol foram perdidas, devido ao efeito de contaminação surgida após a 3ª semana de incubação.

O maior número de nematóides (média de 1373 nematóides por repetição) foi recuperado do tratamento em que se inoculou calo de uma semana de idade, cultivado em substrato sem inositol e mantido a 20°C (Fig. 1). A melhor temperatura foi sempre a de 20°C, independente da idade das culturas de calo ao se inocular ou da presença ou ausência de inositol no meio. Faulkner *et al.* (1974) relataram que a temperatura ótima ficava entre 20 e 25°C para a raça 'alfafa' de *D. dipsaci*; esses autores, tendo como inóculo inicial 3.200 nematóides por cultura e incubando por 25 dias, obtiveram o pico de cerca de 253.000 nematóides a 22,5 °C. Portanto, a taxa de multiplicação foi de aproximadamente 79, quase três vezes maior que a obtida neste trabalho (= 27,4). Krusberg (1961) relatou que *D. dipsaci* alcançou população de 42.000 exemplares/frasco de cultura, em temperatura de 25°C. Riedel *et al.* (1973) obtiveram de 500 a 23.000 nematóides por cultura de calo, tendo como inóculo inicial porção repicada de cultura já estabelecida.



Meios (e idade das culturas ao serem inoculadas):

- (1) Murashige e Skoog (= MS) (1 semana)
- (2) MS + inositol (= MSI) (1 semana)
- (3) MSI (3 semanas)

Temperatura de incubação

Figura 1. Número médio de diferentes estádios de *Ditylenchus dipsaci* raça "teasel obtido de calo de alfafa submetido a três temperaturas de incubação no escuro, durante oito semanas.

A reprodução de *D. dipsaci* inoculado nos calos de alfafa de três semanas, crescendo em meio MS e incubados a 15° e 25°C, foi, em média, de 250 e 106 nematóides por repetição, respectivamente (Fig. 1). A 25°C, a multiplicação só foi maior (165 nematóides/rep.) quando se utilizou o meio MSi com calo envelhecido de uma semana.

Embora *D. dipsaci* raça teasel tenha se reproduzido em todas as condições ensaiadas, os números totais de nematóides, obtidos ao final de 8 semanas, foram sempre baixos, se comparados aos de trabalhos de outros autores anteriormente mencionados.

Os J4s sempre predominaram e somaram, geralmente, mais de 50% dos componentes das populações, fazendo exceção somente nas culturas inoculadas quando tinham uma semana de idade e incubadas a 15°C, onde eram 49 e 44%, nos meios MS e MSi, respectivamente (Tabela 1).

Resultados diferentes na proporção de J4s em relação aos outros estádios foram relatados por Viglierchio *et al.* (1973), que obtiveram de 30 a 50% de J4s.

A adaptação de *D. dipsaci* para novas condições de alimentação pode ser vagarosa e explicaria a baixa densidade da população aqui obtida, quando comparada aos resultados de outros pesquisadores, que apenas repicavam calo, já com população do nematóide, para novos meios de cultura.

O efeito da cultura de calo sobre a produção dos diferentes estádios desse nematóide pode ser reflexo do vigor com que a população está se reproduzindo. Essa pode ser influenciada por alguma condição adversa, como a produção de alguma toxina, que não foi assinalada.

Também se pode cogitar que o menor número de nematóides recuperados do meio MS, especialmente das culturas inoculadas quando tinham 3 semanas, seria devido a presença de alguma substância inibidora da multiplicação, prejudicando a reprodução de *D. dipsaci*.

Outras variáveis também poderiam ser responsáveis por essa menor taxa de multiplicação: diferenças nas técnicas usadas (como as de desinfecção de nematóides), nos meios de cultura e, especialmente, na

Tabela 1. Percentagem dos estádios de desenvolvimento de *Ditylenchus dipsaci*, recuperados de culturas de calo de alfafa de duas idades, crescidas em meio sem ou com inositol e incubadas em três diferentes temperaturas, durante 8 semanas, sob condição de escuro.

Meio e idade da cultura ao ser inoculada	Estádios de <i>D. dipsaci</i>	Temperatura (°C) de incubação		
		25°C	20°C	15°C
MS - 1 semana	Macho	8,4	4,9	7,5
	Fêmea	27,5	9,2	19,5
	J4	53,5	53,9	49,3
	J3 + J2	10,6	32,0	23,7
MSi - 1 semana	Macho	12,1	6,0	9,5
	Fêmea	20,5	13,0	35,5
	J4	53,5	54,0	44,0
	J3 + J2	13,9	27,0	11,0
MSi - 3 semanas	Macho	4,2	3,0	0,7
	Fêmea	10,8	2,9	3,8
	J4	74,0	80,5	77,8
	J3 + J2	11,0	13,6	17,7

MS = Meio de Murashige e Skoog modificado, sem inositol.

MSi = Meio de Murashige e Skoog modificado, com inositol.

J4, J3, J2 = Juvenis do 4º, 3º e 2º estágio, respectivamente.

raça do nematóide, que neste trabalho foi da raça 'teasel', diferente das utilizadas por outros pesquisadores. Os dados disponíveis são insuficientes para esclarecer o problema.

LITERATURA CITADA

- FAULKNER, L.R.; D.B. BOWER; D.W. EVANS & J.H. ELGIN, JR., 1974. Mass culturing of *Ditylenchus dipsaci* to yield large quantities of inoculum. J. Nematol. 6: 126-129.
- KRUSBERG, L.R., 1960. Hydrolytic and respiratory enzymes of species of *Ditylenchus dipsaci*. Phytopathology 50: 9-22.
- KRUSBERG, L.R., 1961. Studies on the culturing and parasitism of plant parasitic nematodes, in particular *Ditylenchus dipsaci* and *Aphelenchoides ritzemabosi* on alfalfa tissues. Nematologica 6: 181-200.
- MOODY, E.H.; B.F. LOWNSBERY & J.M. AHMED, 1973. Culture of the root-lesion nematode *Pratylenchus vulnus* on carrot discs. J. Nematol. 5(3): 225-226.
- MURASHIGE, T. & F. SKOOG, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473-497.
- PHILLIPI, T. & G. PICHARD, 1988. Multiplication in vitro de *Ditylenchus dipsaci* em tejidos de *Medicago sativa*. Nematropica 18: 25-32.
- RIEDEL, R.M. & J.G. FOSTER, 1970. Monoxenic culture of *Ditylenchus dipsaci* and *Pratylenchus penetrans* with modified Krusberg's and White's media. Plant Disease Reporter 54(3): 251-254.
- RIEDEL, R.M.; J.G. FOSTER & W.F. MAI, 1973. A simplified medium for monoxenic culture of *Pratylenchus penetrans* and *Ditylenchus dipsaci*. J. Nematol. 5(1): 71-72.
- VIGLIERCHIO, D.R.; I.A. SIDDIQUI & N.A. CROLL, 1973. Culturing and population studies of *Ditylenchus dipsaci* under monoxenic conditions. Hilgardia 42: 177-213.
- WEBSTER, J.M., 1967. The significance of biological races of *Ditylenchus dipsaci* and their hybrids. Ann. Applied Biology 59: 77-83.
- WEBSTER, J.M. & D. LOWE, 1966. The effect of the synthetic plant-growth substance, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, on the host-parasite relationships of some plant-parasitic nematodes in monoxenic callus culture. Parasitology 56: 313-322.
- WHITEHEAD, A.G. & J.R. HEMMING, 1965. A comparison of some quantitative methods of extracting small vermiform nematodes from soil. Ann. Applied Biology 55: 25-38.