

## Efeito do aldicarbe no ciclo de vida de *Meloidogyne incognita*

Esdras Henrique da Silva<sup>1</sup>, Vicente Paulo Campos<sup>2</sup>, Fernando da Silva Rocha<sup>3</sup>, Walmes Marques Zeviani<sup>4</sup>, Willian César Terra<sup>2</sup>, Renê Luís de Oliveira Rigitano<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Instituto Federal do Tocantins, Campus Colinas do Tocantins, Colinas do Tocantins, Tocantins, Brasil. E-mail: esdras.silva@ifto.edu.br

<sup>2</sup> Universidade Federal de Lavras, Departamento de Fitopatologia, Lavras, Minas Gerais, Brasil. E-mail: vpcampos@ufla.br, terranema@gmail.com, rigitano@ufla.br

<sup>3</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Núcleo de Ciências Agrárias, Montes Claros, Minas Gerais, Brasil. E-mail: rochafplant@yahoo.com.br

<sup>4</sup> Universidade Federal do Paraná, Departamento de Estatística, Curitiba, Paraná, Brasil. E-mail: walmes@ufpr.br

Recebido: 21/10/2017; Aceito: 02/04/2019.

### RESUMO

Ovos, juvenis de segundo estágio (J2) e fêmeas de *Meloidogyne incognita* foram inseridos em solução contendo o princípio ativo aldicarbe com ação nematicida. A exposição ao nematicida ocasionou: (1) redução na eclosão, (2) redução na mobilidade, (3) mortalidade de J2, e (4) redução na penetração. A aplicação do nematicida após a infecção com J2 saudáveis foi mais eficiente em reduzir a reprodução do nematoide. A aplicação feita mais próxima da inoculação causou maiores reduções de galhas e de ovos/g de raiz de planta de soja, com maior efeito na reprodução. Enquanto os J2 incubados por 24 h em aldicarbe 50 µg mL<sup>-1</sup> e inoculados em soja tiveram o número de ovos/g raiz reduzido em 2,5%, em comparação à testemunha, a aplicação da mesma concentração após a inoculação resultou em 95% de redução. A irrigação do substrato com solução de aldicarbe impediu a penetração e interrompeu o ciclo. O teor de energia lipídica corporal dos J2 foi avaliado por coloração com “Oil Red O”, e as fotografias analisadas por programa de análise de imagem. A energia corporal foi semelhante nos J2 incubados em aldicarbe e em água pura a 25 °C até oito dias. Portanto, o aldicarbe afeta aditivamente as várias fases do ciclo de vida de *M. incognita*, com maior efeito na reprodução e na desorientação dos J2 para as raízes de soja, sem preservar a energia corporal dos J2 imóveis.

**Palavras-chave:** Nematoides de galhas, controle químico, carbamato.

### Effect of aldicarb in the *Meloidogyne incognita* life cycle

#### ABSTRACT

Eggs, juveniles of the second stage (J2) and females of *Meloidogyne incognita* were placed in solution of the nematicide aldicarb. Exposure to nematicide caused: (1) reduction in hatching, (2) mobility and (3) J2 mortality, and (4) reduction in penetration. The application of nematicide after infection with healthy J2 was more efficient in reducing nematode reproduction. The application made closer to J2 inoculation caused greater galls and eggs/g of soybean root reductions with larger effect on reproduction. Whereas the 24 h stored J2 in aldicarb 50 µg mL<sup>-1</sup> and inoculated in soybean had the number of eggs/g of root reduced at 2.5% compared to control, the application of the same aldicarb concentration after inoculation resulted on 95% reduction. The irrigation of the substrate with aldicarb solution impeded J2 penetration and interrupted the life cycle. The amount of J2 lipid body energy was assessed by staining with “Oil Red O” and photos analyzed by image program. The body energy was alike on J2 stored in aldicarb and in pure water at 25 °C up to eight days. Therefore, the aldicarb affect, accumulatively, over various phases of *M. incognita* life cycle with greater effect on reproduction and J2 disorientation towards soybean roots, without preserving body energy in aldicarb stored J2.

**Keywords:** root-knot nematode, chemical control, carbamate.

## 1. Introdução

Diversas plantas produzem moléculas químicas com propriedades nematocidas, tais como alcoóides, ácidos graxos, isotiocianatos, glicosídeos cianogênicos, terpenóides, compostos fenólicos e outros, os quais possuem comprovada atividade nematocida (Jardim et al., 2018; Campos et al., 2016).

Carbamatos e organofosforados são substâncias orgânicas sintéticas largamente empregadas na agricultura e no uso doméstico, e que possuem atividade inibidora da acetilcolinesterase (AChE). AChE é a enzima responsável por hidrolisar o neurotransmissor acetilcolina (ACh) nas sinapses colinérgicas, transmitindo a mensagem entre os neurônios. As sinapses colinérgicas estão amplamente distribuídas no sistema nervoso central e periférico, sendo importantes para a manutenção de inúmeras funções fisiológicas (Duerr et al., 2008).

O princípio ativo 2-methyl-2-(methylthio) propanal O-(N-methylcarbamoyl) oxime, conhecido como aldicarbe, pertencente ao grupo dos carbamatos, possui atividade inibidora da AChE, sendo por muitos anos utilizado para controle de nematoides. O mecanismo de ação do aldicarbe é semelhante a várias moléculas químicas orgânicas que podem no futuro ser usadas como nematocidas, como exemplo os alcaloides eserina, sanguinina, deidroevodiamina, turbinatina e hamaina (Wang et al., 2012; Houghton et al., 2006). Dessa forma, o estudo do ciclo de vida de nematoides expostos a moléculas com propriedades inibitórias da AChE é altamente relevante.

O aldicarbe é uma molécula que afeta o parasitismo do juvenil de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne* spp. dentro e fora do hospedeiro, na solução do solo (Sikora e Hartwig, 1991). De acordo com a concentração, moléculas do grupo dos carbamatos estimulam ou inibem a eclosão de J2 de *Meloidogyne* spp (Jardim et al., 2018; Huang e Van Gundy, 1976; Hough e Thomason, 1975; Nelmes, 1970). A mobilidade dos J2 de *Globodera rostochiensis* (Wollenweber), bem como a capacidade infectiva de *Meloidogyne javanica* (Treib), *Meloidogyne incognita* (Kofoid e white) e *Heterodera schachtii* (Schmidt) foram estudadas após exposição ao aldicarbe (Hough e Thomason, 1975; Nelmes, 1970). O retardamento no desenvolvimento pós-embrionário de *H. schachtii* pelo aldicarbe foi observado em beterraba (Sikora e Hartwig, 1991; Steele e Hodges, 1975). Contudo, são escassas as informações sobre o desenvolvimento de *Meloidogyne* spp. em plantas, quando a aplicação da molécula inibidora da AChE ocorre após o início da infecção por J2 saudável.

A reversibilidade parcial da mobilidade dos J2 anteriormente expostos ao aldicarbe e logo em seguida lavados em água, e a perda parcial da infectividade após a exposição ao aldicarbe (Nelmes, 1970; Steele e

Hodges, 1975) demonstram efeitos nematocida e nematostáticos complexos. Entretanto, em muitos estudos, foram empregados J2 recentemente eclodidos, necessitando, assim, pesquisar o efeito inibidor da AChE em J2 com baixa reserva lipídica. A incubação de J1 de *Heterorhabditis amazonensis* com herbicidas não causa mortalidade, mas reduz as reservas lipídicas corporais (Andaló et al., 2009), enquanto a incubação de J2 de *Meloidogyne* spp. em água parada a 26-28 °C leva à perda da reserva lipídica corporal e à patogenicidade a partir do 4º dia (Freire et al., 2007).

Diante da importância da AChE como alvo para moléculas bioativas, a avaliação do potencial de compostos que apresentem inibição da AChE tem grande relevância para o desenvolvimento de novos nematocidas (Kang et al., 2013). Estudos abrangentes, com uma única espécie de nematoide e hospedeiro, conduzirão para um entendimento melhor dos efeitos aditivos da inibição da AChE nas diversas fases do ciclo de vida de *Meloidogyne* spp. Neste trabalho, utilizou-se como modelo de estudo o nematoide *M. incognita*, e a soja (*Glycine max* (L.) Merrill cv. Emgopa 313) como planta hospedeira, para estudar vários aspectos do ciclo de vida do nematoide exposto ao aldicarbe em várias concentrações e períodos de tempo.

## 2. Material e Métodos

**2.1) Preparo da solução estoque de aldicarbe:** solução estoque de aldicarbe em água destilada, na concentração esperada de 500 µg/mL, foi preparada pesando-se 6,66 g da formulação comercial Temik® 150 G, colocados em erlenmeyer contendo 1.000 mL de água, que foi colocado em mesa agitadora por 30 minutos. A seguir, a fase aquosa foi filtrada em algodão colocado no fundo do funil e mantida em geladeira a 8 °C. Alíquotas foram obtidas para se avaliar o teor de aldicarbe em solução, por meio de cromatografia líquida de alta eficiência, no laboratório de Toxicologia de Inseticidas da Universidade Federal de Lavras. Diluições da solução estoque (metodologia própria dos autores) foram feitas para se obter as concentrações empregadas nos ensaios. O experimento foi realizado antes do cancelamento do registro do produto comercial usado no trabalho.

**2.2) Obtenção de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita*:** raízes de tomateiros (*Lycopersicon esculentum* Mill cv Kada) cultivados em casa de vegetação e infestadas com *M. incognita* proveniente de uma população pura identificada por eletroforese (Carneiro e Almeida, 2001) foram lavadas cuidadosamente e cortadas em pedaços de 1 cm. A seguir, foram trituradas em liquidificador por 20 segundos, em solução de hipoclorito de sódio a 0,5%, seguindo-se a técnica de Hussey e Barker (1973). Os

ovos retidos na peneira de 0,025 mm foram recolhidos em b quer de 200 mL utilizando-se pisseta contendo  gua. A suspensão de ovos foi colocada em câmara de eclosão e mantida   temperatura de 25  C. Foram utilizados nos ensaios apenas os J2 eclodidos no terceiro dia.

**2.3) Efeito do aldicarbe na eclosão:** câmaras de eclosão foram preparadas empregando-se placas de Petri (4,5cm) forradas com peneiras de tecido poliéster (0,025 a 0,030mm de abertura) fixado em anéis de PVC (40 x 10 mm), sobre os quais adicionou-se 1.000 ovos de *M. incognita* por peneira, que foram incubados em temperatura de 25  C. Essas peneiras com ovos foram imersas em soluço de aldicarbe nas concentra es de 1, 5 ou 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Os ovos colocados em água destilada foram considerados como controle. Os J2 eclodidos que passaram pelos poros da peneira foram recolhidos na placa de Petri para contagem. A primeira contagem dos J2 eclodidos ocorreu 48 horas após a montagem do ensaio até os 14 dias, sendo as avalia es feitas com intervalos de 48 horas, com o uso de microscópio de objetiva invertida. A soluço de aldicarbe ou água era substituída por nova soluço (4 mL) após cada contagem. Na montagem do ensaio, utilizou-se o delineamento inteiramente ao acaso, com quatro repeti es.

**2.4) Mobilidade e mortalidade de J2 após exposi o a diversas concentra es de aldicarbe em um único período de tempo:** duzentos e cinquenta  $\mu\text{L}$  de solu es de aldicarbe nas concentra es 5, 10, 50, 100 ou 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  foram colocados por célula de placa Elisa previamente desinfestada com álcool 95%.  gua destilada foi utilizada como controle. J2 de *M. incognita* foram quantificados em microscópio de objetiva invertida e calibrada a suspensão para 50 J2 por 25  $\mu\text{L}$ . Em cada célula foram pipetados 25  $\mu\text{L}$  dessa suspensão. Após 24 horas, avaliou-se a mortalidade conforme metodologia descrita por Chen e Dickson (2000).

**2.5) Mobilidade de J2 expostos ao aldicarbe e desintoxicados pela incub o em água:** os J2 foram incubados em soluço de aldicarbe por 24 horas e em água pura por 24 horas. Para isso, 5 mL das concentra es de 0, 5, 10, 50, 100 ou 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de aldicarbe foram colocados em frascos de vidro de 15 mL. Como controle, utilizou-se água destilada. Em cada frasco, foram pipetados 30  $\mu\text{L}$  de suspensão contendo 100 J2. Os frascos foram armazenados em BOD a 25  C, por 24 horas. A seguir, a suspensão de J2 foi vertida em peneira de 11  $\mu\text{m}$  para eliminar toda a soluço de aldicarbe.

Os J2 retidos na peneira foram lavados por duas vezes em água de torneira e recolhidos para os fracos de vidro com jatos de água através de pisseta. Os J2 foram mantidos em 5 mL de água e incubados a 25 C, por 24 horas. Após esse período, os J2 foram transferidos para placa Elisa e quantificado o número de J2 móveis e imóveis. Nos ensaios 4 e 5 utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado com seis concentra es de aldicarbe e cinco repeti es.

**2.6) Mobilidade, mortalidade e percentual de lipídios neutros em J2 expostos a diversas concentra es de aldicarbe em diferentes períodos de tempo:** suspensões de J2 de *M. incognita* foram incubadas a 25  C, por 4, 8 e 12 dias, em solu es de aldicarbe, nas concentra es de 0, 5 e 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Em frascos de vidro de 15 mL, foram colocados 5 mL das solu es e pipetados 100  $\mu\text{L}$  de uma suspensão com 500 J2 recentemente eclodidos. Após o período de incub o, a suspensão de J2 foi vertida em peneira de 11  $\mu\text{m}$  para eliminar toda a soluço de aldicarbe, sendo os J2 lavados e recolhidos para os frascos conforme descrito anteriormente. A seguir, avaliou-se a mobilidade e a mortalidade dos J2, conforme metodologia descrita no ensaio anterior.

Para avalia o de lipídios neutros foi utilizado o corante "Oil Red O", segundo a técnica de Christophers et al. (1997). Para isso, após a lavagem e a retirada do aldicarbe, os J2 foram concentrados em 0,5 mL de  gua. Em seguida, foram adicionados 3 mL da soluço corante Oil Red O.

A suspensão foi aquecida em banho-maria a 60  C, por 20 minutos. Após o resfriamento em temperatura ambiente, por 12 horas, os J2 com o corpo colorido de vermelho (teor de lipídio neutro) foram concentrados em 0,5 mL da soluço corante por meio de centrifuga o a 2.000 rpm, por três minutos. A seguir, foram adicionados 3 mL de soluço de água destilada + glicerina pura (1:1) e armazenados   temperatura ambiente.

Lâminas foram montadas com os J2 de cada tratamento e fotografados dez J2 de cada repeti o, em cada período de armazenamento. A partir das fotografias, foi utilizado o programa *Quan-v102p* para estimar a área de colora o vermelha que corresponde   de lipídios, em detrimento da área total do corpo do J2. A partir da , se calculou o percentual de lipídios neutros em rela o   área total do corpo dos J2 de *M. incognita*.

Utilizou-se o delineamento inteiramente ao acaso, com fatorial 3 x 4, três concentra es e (a concentra o zero foi utilizada como testemunha) quatro tempos de incub o, com quatro repeti es. Os J2 recém-eclodidos foram utilizados como controle.

**2.7) Penetração de J2 em soja:** foram feitos dois ensaios: no primeiro, os J2 foram armazenados em solução de aldicarbe por 24 h e depois inoculados; no segundo, a solução de aldicarbe foi depositada no solo antes da inoculação do J2. Sementes de soja foram distribuídas em bandejas plásticas previamente desinfestadas com álcool 95%, as quais continham areia umedecida com água. Em seguida, foram colocadas em câmara climatizada com 14 horas de luz e 10 horas de escuro, à temperatura de  $27 \pm 2^\circ\text{C}$ , para permitir a germinação. Após 72 horas, as sementes germinadas com radícula de 2 cm de comprimento foram selecionadas para a instalação dos ensaios.

Oitenta J2 foram armazenados a  $25^\circ\text{C}$ , por 24 horas, nas soluções de 0, 5, 10, 50, 100 ou  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$  de aldicarbe. Após 24 horas, os J2 foram lavados por duas vezes em água de torneira e inoculados em plântulas de soja. Para isso, sementes germinadas de soja foram transplantadas para bandeja de 144 células contendo substrato solo e areia (2:1) autoclavado por duas horas a  $120^\circ\text{C}$  e, após sete dias, as plantas foram inoculadas. Na inoculação, 80 J2 foram dispersos em 2 mL de água e distribuídos em 4 furos de  $\pm 3$  cm de profundidade ao redor das mudas. Em outro ensaio, após sete dias, as plântulas foram irrigadas com 10 mL de solução de aldicarbe (5, 10, 50, 100 ou  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), seguindo a inoculação de 80 J2 por planta.

Cinco dias após a inoculação, avaliou-se a penetração dos J2 nas raízes de soja. Para isso, a parte aérea das plantas foi eliminada, e o sistema radicular, com substrato, colocado em água parada num balde de 10 litros. As raízes foram separadas do substrato, lavadas e submetidas ao processo de clareamento e coloração dos nematoides no interior da raiz, com solução contendo corante artificial, conforme técnica de Rocha et al. (2005). A seguir, as raízes foram lavadas para retirar o excesso do corante, colocadas em lâmina de vidro com glicerina pura sobreposta com outra lâmina de mesmo tamanho e formato. Em microscópio de objetivas invertidas, foi quantificado o número de J2 que penetrou no sistema radicular. Nesse ensaio, empregou-se o delineamento inteiramente casualizado com seis concentrações de aldicarbe e cinco repetições, tendo a concentração zero (água destilada) sido utilizada como controle.

**2.8) Reprodução de *Meloidogyne incognita* pela inoculação de J2 após exposição ao aldicarbe por 24 horas ou irrigado no substrato antes da inoculação:** sementes de soja germinadas foram transplantadas para copos plásticos de 300 mL contendo 250g de substrato de solo e areia (2:1). O substrato foi autoclavado por duas horas, a  $120^\circ\text{C}$ . Após sete dias do transplantio, foi feita inoculação de 400 J2 armazenados em solução (0, 5, 10, 50, 100 ou  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) de aldicarbe, por 24

horas e lavados por duas vezes em água. Para realizar a inoculação, os J2 foram dispersos em 4 mL de água e distribuídos em quatro furos de 3 cm de profundidade, feitos ao redor das mudas. As mudas foram mantidas por 28 dias em câmara climatizada com 14 horas de luz e 10 horas de escuro, à temperatura de  $27 \pm 2^\circ\text{C}$ . A umidade dos copos foi mantida a 60% da capacidade de campo, durante os cinco primeiros dias após a inoculação.

Em outro ensaio, a solução de aldicarbe foi irrigada no substrato antes da inoculação. As plântulas de soja crescidas por 14 dias em bandeja de 144 células foram transplantadas para copos contendo substrato. Após o transplante, as plantas de soja foram irrigadas manualmente com soluções (0, 5, 10, 50, 100 ou  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) de aldicarbe até atingir 60% de campo, seguindo-se inoculação de 400 J2 recém-eclodidos por plântula de soja.

Vinte e oito dias após a inoculação, foram avaliados o número de massa de ovos e de ovos de *M. incognita* por grama de raiz nos dois ensaios. Para tanto, eliminou-se a parte aérea e foram contadas as massas de ovos coloridas de vermelho, no sistema radicular (Rocha et al., 2005). A seguir, avaliou-se o peso da matéria fresca das raízes. Em microscópio de objetiva invertida, foi quantificado o número de ovos de *M. incognita* por sistema radicular. Em seguida, calculou-se o número de massa de ovos e de ovos/g de raiz.

Nos ensaios, empregou-se o delineamento inteiramente casualizado com seis concentrações de aldicarbe e cinco repetições, tendo a concentração zero (água destilada) sido utilizada como controle.

**2.9) Infectividade e reprodução de *Meloidogyne incognita* após a aplicação do aldicarbe em soja inoculada com J2 saudáveis:** sementes de soja germinadas foram transplantadas para copos de 300 mL contendo 250 g de substrato de solo e areia (2:1) e mantidas em câmara climatizada, com 14 horas de luz e 10 horas de escuro, à temperatura de  $27 \pm 2^\circ\text{C}$ . Cerca de 400 J2 de *M. incognita*, recentemente eclodidos em câmara de eclosão, foram inoculados sete dias após o transplantio. Para isso, os J2 foram suspensos em 4 mL de água e distribuídos em 4 furos de  $\pm 3$  cm de profundidade ao redor das plântulas. Aos 0, 5, 10 e 15 dias após a inoculação, 20 mL de soluções de aldicarbe, nas concentrações de 5 ou  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  foram colocados em cada plântula de soja.

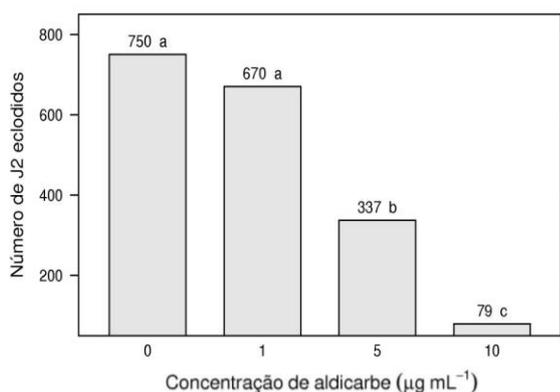
Para a montagem desses ensaios, foi empregado o delineamento inteiramente ao acaso, com fatorial  $2 \times 4$ , duas concentrações e quatro tempos de aplicação do aldicarbe, com 4 repetições. Como controle negativo, foram utilizadas plântulas sem aplicação de aldicarbe. Aos 28 dias após a inoculação, avaliaram-se a infectividade (galhas) e a reprodução.

**2.10) Análise estatística:** os dados obtidos em todos os ensaios foram submetidos à análise de variância conjunta (valores médios dos ensaios repetidos) e ao teste Tukey, a 5% de probabilidade, para a comparação das médias. As variáveis significativas pelo teste F foram submetidas à análise de regressão para ajuste do melhor modelo capaz de descrever o fenômeno biológico em questão. As análises foram realizadas pelo programa R (R Development Core Team, 2009).

Todos os ensaios realizados neste trabalho foram repetidos duas vezes no espaço e no tempo, comprovando os resultados.

### 3. Resultados e Discussão

O aldicarbe causou redução na eclosão de J2 de *M. incognita* de 55 e 89%, quando os ovos foram expostos a 5 e 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  comparados com a testemunha ( $p \leq 0,05$ ), com maior redução na maior concentração (10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Contudo, a 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , a eclosão foi semelhante à incubação em água (Figura 1).



**Figura 1:** Número de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita* eclodidos após incubação por 14 dias em soluções de aldicarbe em várias concentrações. Barras seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

A redução, ao que tudo indica, envolve a interrupção ou o retardamento da evolução das diferentes fases do desenvolvimento embrionário e nos eventos que precedem a eclosão (alteração da casca e ativação do juvenil). A penetração do aldicarbe nos estágios iniciais do desenvolvimento embrionário dentro do ovo pode ser impedida pela seletividade de duas ou três membranas lipoproteicas, localizadas abaixo da camada quitínica (casca), as quais formam a principal barreira à permeabilidade da casca (Eisenback e Hunt, 2009). Contudo, estudos são necessários para correlacionar a permeabilidade da casca do ovo nos estágios iniciais do desenvolvimento embrionário e a penetração de substâncias tóxicas, entre elas, os nematicidas.

Desta forma, torna-se mais provável, talvez, a penetração do nematicida no início do processo de

eclosão quando ocorre alteração da permeabilidade da casca e da camada lipídica, mediada por enzimas, resultando na entrada de água e na subsequente reidratação do juvenil, proporcional ao início do seu movimento (Perry et al., 2009). Acredita-se que, nessa reidratação, o aldicarbe penetre no corpo do juvenil dentro do ovo, imobilizando-o e impedindo a formação da linha de clivagem da casca, bem como inibindo a enzima AChE (Opperman e Chang, 1991), impossibilitando a orientação do estilete do juvenil para perfurar a casca (Nelmes, 1970).

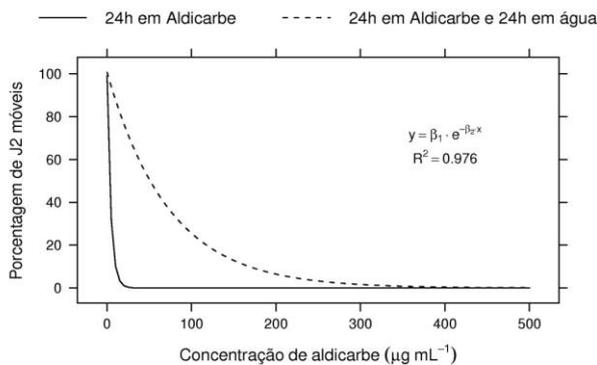
Entretanto, é possível que o processo de entrada do aldicarbe no ovo seja alterado pelo efeito de concentração, uma vez que, nesse estudo, a redução chegou a 89% da eclosão na concentração de 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Figura 1), sendo improvável que a penetração ocorresse em um segmento apenas da população (ovo com J2 formado). A eclosão de *Tylenchulus semipenetrans* (Coob) é inibida apenas em concentrações maiores que 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , tendo essa inibição sido atribuída ao atraso do desenvolvimento embrionário (Huang e Van Gundy, 1976). Por outro lado, a eclosão de *H. schachtii* é totalmente inibida em concentrações maiores que 4,8  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; para *M. javanica*, essa concentração inibiu parcialmente a eclosão (Hough e Thomason, 1975). A redução na eclosão de *Meloidogyne exigua* Goeldi foi de 34% e de 44% nas concentrações de 0,1 e 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de aldicarbe, respectivamente (Huang et al., 1983), enquanto para *M. incognita*, no experimento aqui descrito, não ocorreu efeito nessa concentração (Figura 1). Sendo assim, o efeito do aldicarbe na eclosão é diferente, mesmo entre espécies do mesmo gênero.

Tem sido relatada reversão da inibição à eclosão de *M. exigua* após retorno dos ovos à água, porém, parcial quando os ovos são expostos a concentrações maiores que 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , demonstrando morte de células, embriões ou J2 dentro do ovo (Huang et al., 1983). A eclosão de *H. schachtii* foi inibida em concentrações de 1 e 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de aldicarbe, porém, quando os cistos foram lavados e expostos à água por 14 dias, a eclosão foi estatisticamente igual ao controle (cistos expostos apenas à água) (Steele e Hodges, 1975).

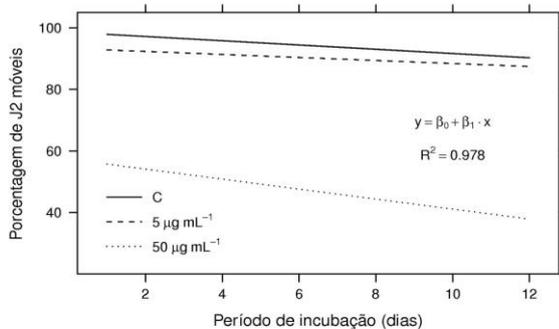
Os J2 expostos ao aldicarbe sofreram alterações na mobilidade, mortalidade, penetração na soja e na reserva energética. Quando os J2 foram incubados em solução de aldicarbe por um único período (24 h), a imobilização se acentuou bastante com o aumento da concentração de aldicarbe, chegando à imobilidade total a partir de 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . A incubação dos J2 em água pura após exposição ao aldicarbe por 24 h, denominado aqui de desintoxicação, possibilitou o retorno à mobilidade de elevado número de J2 (90%) nas concentrações de 5 e 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , regular (62%) em 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e baixo (14 e 3%, respectivamente) em 100 e

500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Figura 2). Porém, a mortalidade não ocorreu entre os J2 imóveis em nenhuma concentração testada, mesmo em 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Quando, então, alterou-se o tempo de incubação, tendo como concentração limite máxima 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , a queda da mobilidade variou com o tempo de incubação e o número de J2 imóveis foi sempre maior na concentração de 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Aumentando o tempo de exposição, começou a ocorrer mortalidade. Aos quatro e oito dias de incubação, a mortalidade foi baixa. Entretanto, aos 12 dias, a mortalidade de J2 chegou a 14 e a 30% nas concentrações de 5 e 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente (Figura 3).



**Figura 2:** Porcentagem de juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita* móveis após 24 horas de exposição dos J2 a diferentes concentrações de Aldicarbe ou após incubação por 24 horas em Aldicarbe e 24 horas em água.



**Figura 3:** Porcentagem total de juvenis de segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita* móveis após incubação em solução de Aldicarbe (5 ou 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) por diversos períodos, e retorno à água pura por 24 horas. C = controle. Os J2 foram incubados em água pura.

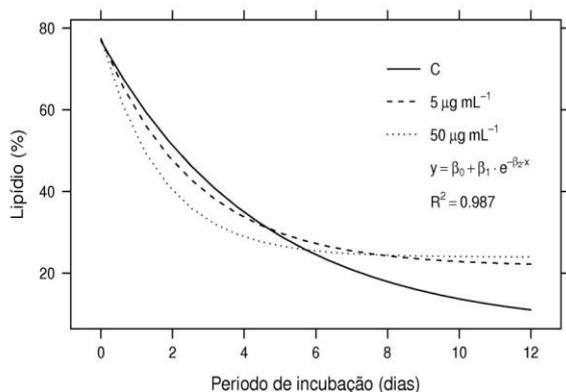
Portanto, a concentração de Aldicarbe e o tempo de exposição do J2 ao nematicida definem os níveis de imobilidade, mortalidade e do retorno à mobilidade, uma vez cessada a exposição ao nematicida. O efeito do Aldicarbe na mobilidade se inicia com concentrações baixas, ao passo que a mortalidade ocorre em concentrações elevadas e em períodos mais longos de exposição ao nematicida.

Vários neurotransmissores foram constatados em nematoides, como acetilcolina, gama aminobutírico (GABA), dopamina, entre outros (Stewart et al., 2001; Perry et al., 2009). Entretanto, conhece-se apenas que o Aldicarbe inibe a enzima AChE controladora do neurotransmissor acetilcolina (Opperman e Chang, 1991). Em coluna de areia sob exposição contínua a Aldicarbe (1 e 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), a migração de J2 de *M. javanica* e *H. schachtii* é inibida (Hough e Thomason, 1975). A mobilidade de J2 de *G. rostochiensis* é reduzida em 24 horas de exposição ao Aldicarbe 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , e apenas 67% deles retornam à mobilidade em água (Nelmes, 1970).

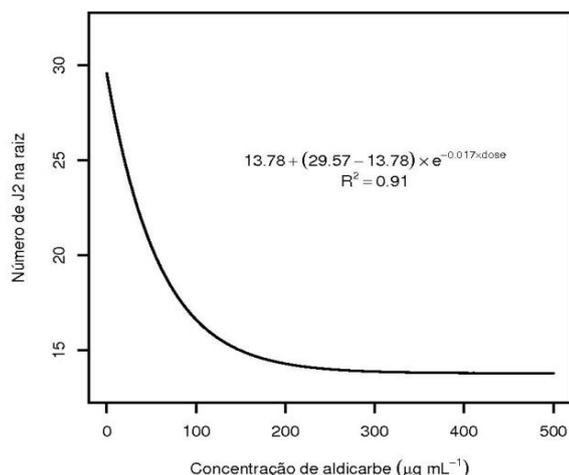
Embora nematoides vivos sejam seletivos quanto à permeação a algumas substâncias nos seus tecidos, a cutícula não é uma barreira a hidrocarbonos halogenados. Nelmes (1971) demonstrou que o Aldicarbe é rapidamente absorvido pelo *Panagrellus redivivus* (L.) Goodey e alcança equilíbrio com a solução externa em 30 minutos. Entretanto, dentro do nematoide, a substância pode ser estocada em tecido sem função vital para o organismo. O nematoide pode desintoxicar-se, excretar a substância tóxica ou evitar toxicidade. Em *P. redivivus*, o Aldicarbe é rapidamente transformado em Aldicarbe sulfóxido menos tóxico (Nelmes, 1971).

O teor de lipídio neutro corporal do J2 incubado em Aldicarbe (5 e 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) foi semelhante ao incubado em água e decrescente até o 8º dia (Figura 4), apesar de elevada imobilidade. No 8º dia de incubação, o teor de lipídio alcançou 40% do total do corpo do J2, tornando-o infectivo. Entretanto, continuou caindo até o 12º dia, com decréscimos maiores nos J2 incubados em água, contribuindo assim, o Aldicarbe, para preservar o lipídio corporal, porém, em baixo nível, sem relevância para manter a infectividade do J2. Portanto, até o 8º dia ocorreu gasto energético, apesar do J2 estar imóvel devido, talvez, à transmissão de estímulos pelos neurônios de modo descontrolado, pois a enzima reguladora do processo (AChE) é inativada pelo Aldicarbe (Opperman e Chang, 1991). Maior gasto energético ocorre em J1 de *H. amazonensis* incubados por cinco dias em herbicidas, comparados com os J1 incubados em água pura (Andaló et al., 2009).

A exposição do J2 ao Aldicarbe afetou a sua penetração em soja, reduzindo-a até a concentração de 150  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , mantendo-se baixa até 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Figura 5). Entretanto, quando o Aldicarbe foi irrigado no solo antes da inoculação, nenhum J2 foi observado nas raízes, indicando que o nematicida afetou a orientação do J2 em direção à ponta da raiz ou o imobilizou, temporariamente. Contudo, não foi provado se a exposição em água pelo mesmo período restabeleceria o movimento e a orientação do J2.



**Figura 4:** Porcentagem de lipídio neutro em juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne incognita* após incubação em solução de aldicarbe (5 e 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e em água pura por diversos períodos. C = controle. Os J2 foram incubados em água pura.



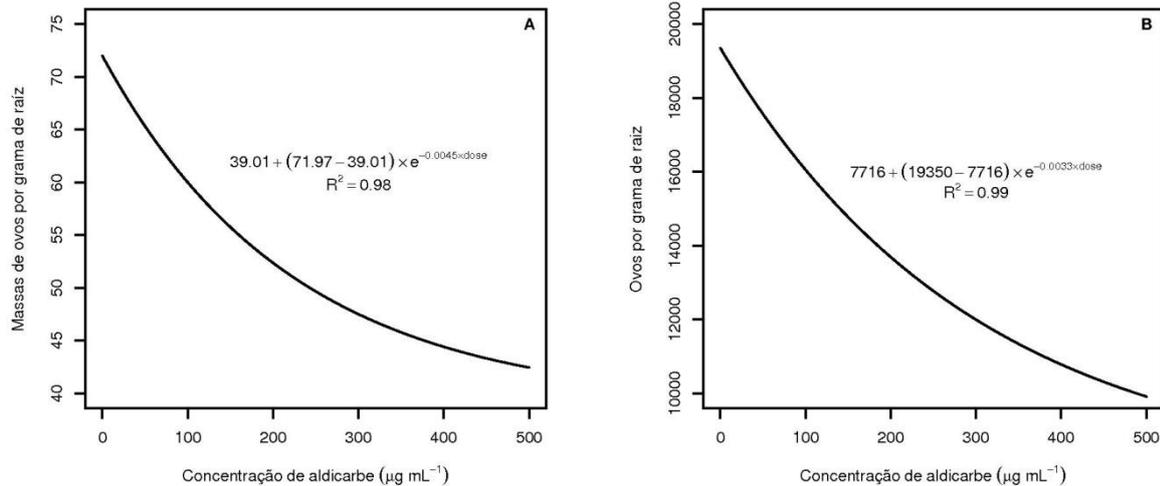
**Figura 5:** Número de juvenis do segundo estágio (J2) de *Meloidogyne incognita* encontrados dentro das raízes de soja a partir da inoculação de J2 incubados em diversas concentrações de aldicarbe. Após 24 horas, os J2 foram lavados por duas vezes em água de torneira e inoculados em plântulas de soja.

A exposição de machos de *H. schachtii* a aldicarbe (0,01  $\mu\text{g mL}^{-1}$  em coluna de areia) por 72 horas impossibilitou-lhes de encontrar as fêmeas (Hough e Thomason, 1975), indicando efeito sobre o sistema nervoso sensorial do macho. Efeito semelhante pode ter ocorrido com sistema sensorial de *M. incognita*, impedindo o reconhecimento da substância atrativa excretada pela raiz da soja. Gourd et al. (1993) observaram efeito supressivo na penetração de J2 de *M. incognita* em raízes de soja, com adição de 1,37 gramas de aldicarbe por  $\text{m}^2$  de solo, por um período de 28 dias.

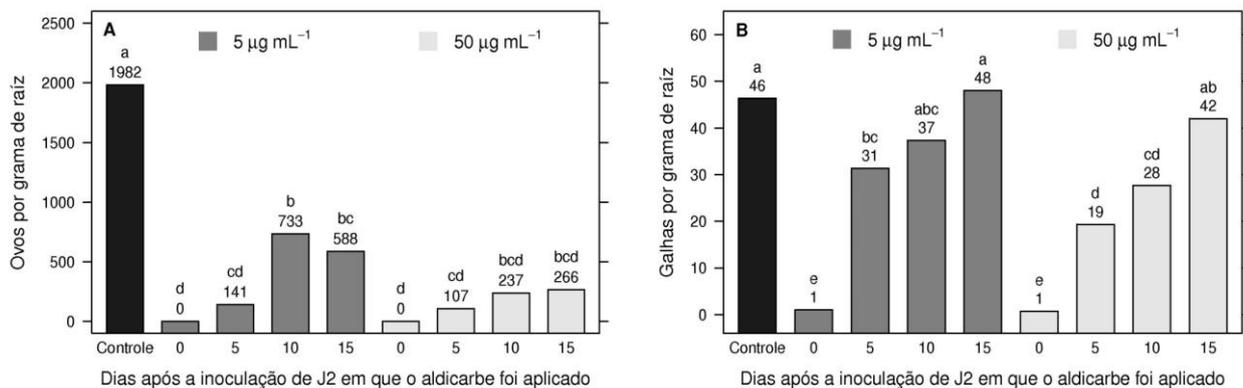
Rocha e Campos (2003) observaram que a incubação de J2 de *M. incognita* em solução de aldicarbe a 65  $\mu\text{g mL}^{-1}$  por 12 e 24 horas reduz a penetração em raiz de soja, sendo que menor penetração foi observada em J2 incubados por 24 horas. No entanto, quando incubaram o J2 de *M. incognita* por 12 horas em aldicarbe 65  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , seguido por 12 horas em água, houve aumento na penetração em comparação à incubação de J2 somente em aldicarbe 65  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Hough e Thomason (1975) observaram que não houve penetração de J2 de *M. javanica* e *H. schachtii* quando foi adicionado ao substrato 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de aldicarbe.

A reprodução de *M. incognita* (massa de ovos e ovos por grama de raiz) a partir da inoculação de J2 incubado em aldicarbe por 24 h decresceu com o aumento da concentração do nematicida, chegando a 23 e 25% de redução no número de massa de ovos e ovos por grama de raiz, respectivamente, pela inoculação em soja dos J2 incubados na concentração de 150  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Figura 6 A e B). Entretanto, quando soluções contendo o aldicarbe nas diversas concentrações testadas foram irrigadas no solo plantado com soja, e depois inoculadas com J2 saudáveis, não ocorreu massas de ovos ou ovos nas raízes. Portanto, no solo irrigado com o nematicida, os J2 se tornam, provavelmente, imóveis ou o sistema sensorial é bloqueado ou desorganizado. Esses efeitos são reduzidos quando se incuba o J2 por pequeno período (24 h), o que pode acontecer no solo em que se aplicou o aldicarbe granulado seguido por chuvas constantes.

A reprodução de *M. incognita* (ovos/g de raiz), quando a solução de aldicarbe (5 e 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) foi vertida no solo aos 5, 10 ou 15 dias após a inoculação dos J2 saudáveis em soja, foi reduzida significativamente, com maior redução na concentração de 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  em comparação ao controle. Nas aplicações com concentração de 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , as reduções no número de ovos variaram de 63 a 93% e de 86 a 95% na concentração de 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , com maior redução quando o nematicida foi colocado aos 5 dias após a inoculação (Figura 7 A). A aplicação do nematicida no momento da inoculação não propiciou a produção de ovos e de apenas uma galha (Figuras 7A e 7B). Redução significativa de galhas só ocorreu quando o aldicarbe 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  foi aplicado aos 5 dias, e aos 5 e 10 dias quando se aplicou a concentração de 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Figura 7 B). Enquanto os J2 incubados por 24 h em aldicarbe 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e inoculados em soja tiveram a reprodução reduzida em 2,5% (Figuras 6A e 6B), a aplicação da mesma concentração 5 dias após a inoculação de J2 saudáveis resultou na redução de 95% no número de ovos (Figura 7 A).



**Figura 6:** Número de massa de ovos (A) e de ovos (B) de *Meloidogyne incognita* por grama de raiz de soja, a partir da incubação de juvenis do segundo estágio, por 24 horas, em diversas concentrações de aldicarbe e inoculação em soja.



**Figura 7:** Número médio de ovos (A) e de galhas (B) de *Meloidogyne incognita* por grama de raiz, a partir da inoculação de juvenis do segundo estágio (J2), seguida da aplicação de aldicarbe em duas concentrações (5 e 50 µg mL<sup>-1</sup>), em diferentes períodos após a inoculação. Controle = sem aplicação de aldicarbe. Barras seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

O maior efeito do aldicarbe em aplicação pós-infecção demonstra, ao que tudo indica, que o período de atuação do produto será prolongado afetando todo o desenvolvimento pós-embrionário, as fêmeas e a sua fisiologia para a postura de ovos. Entretanto, parece ser mais relevante o efeito da molécula nos eventos iniciais de estabelecimento do sítio de alimentação, pois o efeito reducional na reprodução foi maior aos cinco dias comparado com os demais períodos, semelhante ao efeito na redução de galhas (Figura 7 A e B). Porém, torna-se difícil explicar a redução de galhas pela concentração de 50 µg mL<sup>-1</sup> aplicados aos 10 dias, pressupondo-se que neste período as alterações nos tecidos da soja para a formação do sítio de alimentação já tinham acontecido. Também são possíveis os efeitos do aldicarbe na capacidade do J2 em produzir elicitores para a formação das células gigantes ou mesmo nos processos que levam à alteração no hospedeiro (hiperplasia e hipertrofia de células), nos primeiros dias

após a inoculação. Por outro lado, a aplicação de aldicarbe no momento da inoculação de J2 na soja não possibilita sua penetração, interrompendo o ciclo, como discutido anteriormente (Figura 5).

Sikora e Hartwig (1991) observaram que aldicarbe retarda o desenvolvimento de juvenis de *H. schachtii* quando o mesmo é adicionado ao solo três dias após a inoculação, quando apenas 19% da população atingiu o estágio de J4. Os mesmos autores verificaram que o carbofuram foi menos eficiente do que o aldicarbe, com 46 e 20% da população atingindo o estágio J4 e adultos, respectivamente. Retardamento no desenvolvimento de J2 de *H. schachtii* foi observado por Steele e Hodges (1975) quando mudas de beterraba infectadas foram transplantadas para solo com 0,75 e 3 µg mL<sup>-1</sup> de aldicarbe por grama de solo, e o desenvolvimento do nematoide foi inversamente proporcional ao aumento da concentração de aldicarbe e do tempo de exposição do nematoide ao nematicida.

O aldicarbe, inibidor da AChE, age com efeitos nematostáticos e nematicidas de forma deletéria e aditiva nas diversas fases do ciclo de vida, como eclosão, infectividade de J2, nas relações nematoide planta e na reprodução de *M. incognita* em soja, com destaque na desorientação do J2 no processo de busca do hospedeiro e na reprodução, sem haver economia de energia corporal.

#### 4. Conclusões

O princípio ativo aldicarbe afetou aditivamente as várias fases do ciclo de vida de *M. incognita*, com maior efeito na reprodução e na desorientação do J2 para as raízes de soja, sem preservar a energia corporal do J2 imóvel.

#### Referências Bibliográficas

- Andaló, V., Moreira, G.F., Maximiniano, C., Moino Junior, A., Campos, V.P., 2009. Influence of herbicides on lipid reserves, mortality and infectivity of *Heterorhabditis amazonensis* (Rhabditida: Heterorhabditidae). *Nematologia Mediterranea*, 37(1), 11-15.
- Campos, V.A.C., Machado, A.R.T., Silva, W.J.R., Lopes, K.C., Terra, W.C., Campos, V.P., Oliveira, D.F., 2016. Estirilactonas de *Cryptocarya aschersoniana* Mez. (Lauraceae Juss.) com atividade contra *Meloidogyne* spp. e interação *in silico* com provável fumarase de *Meloidogyne hapla*. *Química Nova*, 39(2), 130-136.
- Carneiro, R.M.D., Almeida, M.R.A., 2001. Técnica de eletroforese usada no estudo de enzimas dos nematoides de galhas para identificação de espécie. *Nematologia Brasileira*, 25(1), 35-44.
- Chen, S.Y., Dickson, D.W., 2000. A technique for determining live second-stage juveniles of *Heterodera glycines*. *Journal of Nematology*, 32(1), 117-121.
- Christophers, A.E.P., Patel, M.N., Benson, J.A., Saka, V.W., Evans, A.A.F., Wright, D.J., 1997. A rapid field-laboratory bioassay to assess the infectivity of *Meloidogyne* spp. second stage juveniles. *Nematologica*, 43(1), 117-120.
- Duerr, J.S., Han, He-ping., Fields, S.D., Rand, J.B., 2008. Identification of Major Classes of Cholinergic Neurons in the Nematode *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of Comparative Neurology*, 506(3), 398-408.
- Eisenback, J.D., Hunt, D.J., 2009. General Morphology, in: Perry, R.N., Moens, M., Starr, F.J., (Ed.), *Root-Knot Nematodes*. Wallingford, UK: CAB International, p. 23.
- Freire, E.S., Campos, V.P., Dutra, M.R., Rocha, F.S., Silva, J.R.C., Pozza, E.A., 2007. Infectividade de juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne incognita* em tomateiro após privação alimentar em solo e água em diferentes condições. *Summa Phytopathologica*, 33(3), 270-274.
- Gourd, T.R., Schmitt, D.P., Barker, K.R., 1993. Use of nematodes as biomonitors of nonfumigant nematicide movement through field soil. *Journal of Nematology*, 25(1), 63-70.
- Hough, A., Thomason, I.J., 1975. Effects of aldicarb on the behavior of *Heterodera schachtii* and *Meloidogyne javanica*. *Journal of Nematology*, 7(3), 221-229.
- Houghton, P.J., Ren, Y., Howes, M.J., 2006. Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. *Natural Products Reports*, 23(2), 181-199.
- Huang, S.P., Resende, I.C., Souza, P.E., Campos, V.P., 1983. Effect of aldicarb, ethoprop and carbofuran on control of coffee root-knot nematodes *Meloidogyne exigua*. *Journal of Nematology*, 15(4), 510-514.
- Huang, S.P., Van Gundy, S.D.V., 1976. Effects of aldicarb and its sulfoxide and sulfone on the biology of *Tylenchus semipenetrans*. *Journal of Nematology*, 10(1), 100-106.
- Hussey, R.S., Barker, K.R.A., 1973. Comparison of methods for collecting inocula of *Meloidogyne* spp including a new technique. *Plant Disease Reporter*, 57(12), 1025-1028.
- Jardim, I.N., Oliveira, D.F., Silva, G.H., Campos, V.P., Souza, P.E., 2018. Cinnamaldehyde from the essential oil of *Cinnamomum cassia* controls *Meloidogyne incognita* in soybean plants. *Journal of Pesticide Science*, 91(1), 479-487.
- Kang, J.S., Kim, E., Lee, S.H., Park, I.K., 2013. Inhibition of acetylcholinesterases of the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, by phytochemicals from plant essential oils. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 105(1), 50-56.
- Nelmes, A.J., 1970. Behavioral responses of *Heterodera rostochiensis* larvae to aldicarb and its sulfoxide and sulfone. *Journal of Nematology*, 2(3), 223-227.
- Nelmes, A.J., 1971. The permeability of nematodes to aldicarb oxime carbamate. *Mededelingen Faculteit Landbouwwetenschappen*, 36(1), 904-914.
- Opperman, C.H., Chang, S., 1991. Effects of aldicarb and fenamiphos on acetylcholinesterase and motility of *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Nematology*, 23(1), 20-27.
- Perry, R.N., Moens, M., Starr, F.J., 2009. *Root-Knot Nematodes*. Wallingford, UK: CABI International, 488 p.
- R Development Core Team, 2009. A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. <http://www.R-project.org> (acessado 22 de maio de 2009).
- Rocha, F.S., Campos, V.P., 2003. Efeito de baixa dose de aldicarbe nos processos de eclosão a penetração de juvenis do segundo estágio de *Meloidogyne incognita*. *Nematologia*, 27(2), 2003.
- Rocha, F.S., Muniz, M.F.S., Campos, V.P., 2005. Coloração de fitonematóides com corantes usados na indústria alimentícia brasileira. *Nematologia Brasileira*, 29(2), 293-297.
- Sikora, R.A., Hartwig, J., 1991. Mode-of-action of the carbamate nematicides cloethocarb, aldicarb and carbofuran on *Heterodera schachtii*: 2. Systemic activity. *Revue de Nématologie*, 14(4), 531-536.

Steele, A.E., Hodges, L.R., 1975. In vitro and in vivo effects of aldicarb on survival and development of *Heterodera schachtii*. *Journal of Nematology*, 7(3), 305-312.

Stewart, G.R., Perry, R.N., Wright, D.J., 2001. Occurrence of dopamine in *Panagrellus redivivus* and *Meloidogyne incognita*. *Nematology*, 3(6), 843-848.

Wang, K., Luo, C., Liu, H., Xu, J., Sun, W., Zhou, L., 2012. Nematicidal activity of the alkaloids from *Macleaya cordata* against certain nematodes. *African Journal of Agricultural Research*, 7(44), 5925-5929.