



INFORME GOIANO

Informe Goiano - Volume xx, Número xx, xxxx

Expediente:

Aurélio Rúbio Neto

Editor-chefe

Jacson Zuchi

Editor-chefe substituto

Tatianne Silva Santos

Supervisora editorial

Nicole Medeiros Leal

Revisora gramatical

Johnathan Pereira Alves Diniz

Bibliotecário

Guilherme Cardoso Furtado

Diagramador

Cláudia Sousa Oriente de Faria

Coordenadora de produção gráfica

Protocolo para avaliação *IN VITRO* da ação nematicida de extratos e óleos botânicos no controle de nematoides do gênero *Meloidogyne*

Rodrigo Vieira da Silva¹, Edcarlos Silva Alves², Gabriela Araújo Martins³

¹Instituto Federal Goiano, Campus Morrinhos. rodrigo.silva@ifgoiano.edu.br, ²Agrônomo da Fundação Bradesco, Colégio Canuanã, ³Mestranda em Olericultura, IF Goiano, Campus Morrinhos

IMPORTÂNCIA E RELEVÂNCIA

Os nematoides do gênero *Meloidogyne*, conhecidos como “nematóide das galhas radiculares” (Moura, 1996), constituem-se no grupo de fitonematoides mais importantes para a agricultura mundial (Perry et al., 2009; Karssen et al., 2006).



Atualmente, na agricultura do terceiro milênio que busca uma agricultura mais sustentável, a utilização de substâncias naturais de plantas para o controle dos nematoides de galhas vem sendo muito estudada.

No entanto, os trabalhos realizados utilizam metodologias diferentes, o que dificulta a análises e comparações da eficiência dos compostos estudados. Portanto, o presente trabalho visa padronizar e orientar os pesquisadores na realização de ensaios *in vitro* para análise da ação nematicida de extrato e óleos vegetais.

SUBSTÂNCIA NEMATICIDA DE ORIGEM VEGETAL

Os compostos químicos presentes em plantas podem atuar diretamente inibindo a eclosão de ovos ou causando mortalidade de juvenis de nematoides presentes no solo, e, assim, interferindo diretamente na densidade populacional.

Vários são os fatores positivos na utilização de extratos e óleos essenciais vegetais de plantas no controle de nematoides do gênero *Meloidogyne*, em relação aos nematicidas sintéticos. Diversos pesquisadores já demonstraram a eficiência de substâncias naturais de plantas, especialmente as medicinais e nativas do cerrado, no controle de nematoides (Frighetto et al., 1994; Lopes, 2017).

A seguir são relatadas as principais etapas para a implantação de um teste para avaliação de atividade nematicida de compostos vegetais.

MULTIPLICAÇÃO DO NEMATOIDE

Os inóculos dos nematoides utilizados nos experimentos são obtidos de populações puras de *Meloidogyne* spp., multiplicadas em jiloeiros cultivados em casa de vegetação.

As populações multiplicam-se bem em mudas de jiloeiro (*Solanum gilo*) e tomateiro (*Solanum lycopersicum*). Para a extração dos ovos de *M. javanica*, pode-se utilizar a metodologia de Boneti & Ferraz (1981) (Figura 1). As raízes infectadas e com galhas são lavadas em água corrente e a seguir picadas em pedaços de 1cm a 2cm de comprimento e trituradas no liquidificador na menor velocidade por 20 segundos. O material triturado deve ser passado por peneiras de 200 mesh e 500 mesh, sendo a suspensão coletada desta última e vertida em recipiente tipo becker. Em seguida, é realizada a contagem dos ovos para a calibração da suspensão para 1000 ovos por mL, com auxílio da placa de contagem de Peters, sob um microscópio fotônico na ampliação de 100 X.

Sete dias após o plantio das mudas, já é possível realizar a inoculação, perfazendo cinco furos nos arredores da região do coleto de cada planta, possuindo cerca de 1 cm de profundidade. Em seguida, deve realizar a aplicação de 5 mL (1 mL em cada furo), contendo 5000 ovos, mais J2 de *Meloidogyne* spp. que serão mantidos em baixo da bancada da casa de vegetação, coberta por um plástico, sendo irrigados manualmente, para evitar a lixiviação e consequente perdas dos ovos.

Figura 1 — Método de Boneti e Ferraz (1981) para extração de ovos de *Meloidogyne* spp. Esquema confeccionado por Dagoberto S. de Oliveira (2006).



OBTENÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO

Após a coleta, do material vegetal, o mesmo deve ser levado ao laboratório para manipulação e obtenção dos extratos. Realiza-se a higienização em água corrente e separação do material, para em seguida ser levado para estufa de circulação forçada para secagem das amostras por 48 horas, a uma temperatura de 40°C. O material seco deverá ser triturado em um moinho de facas e armazenado em saquinhos plásticos devidamente identificados. Para a obtenção dos extratos, utiliza-se a metodologia descrita por Ferris & Zeng (1999). Na qual o pó vegetal obtido após a trituração, deverá ser vertido em um Erlenmeyer com capacidade para 1 litro e adicionado 500 mL de etanol 95%, mantido em descanso por sete dias. Após esse período, a solução deverá ser filtrada com papel filtro quantitativo, vertida em um balão de vidro e levada para o evaporador rotativo a uma temperatura de $55 \pm 2^\circ\text{C}$. Após a sua concentração total, o extrato será extraído do balão com etanol e acondicionado em becker e permanecendo por mais sete dias até a evaporação total do etanol.



Figura 2 — Evaporador rotativo (marca: Solab®) a uma temperatura de $55 \pm 2^\circ\text{C}$ para a extração de extratos alcoólicos.

Fonte: os autores.

REALIZAÇÃO DO TESTE *IN VITRO*

Os ensaios *in vitro* são realizados com ovos ou juvenis de segundo estágio (J2) do nematoide. A suspensão de ovos do nematoides é vertida em uma câmara de eclosão, - prato sobreposto com uma peneira e papel toalha (Figura 3)- e mantidos em um local escuro, para simular o habitat comum do patógeno (Cliff & Hirschmann, 1985). Após 24 horas, deve-se realizar a troca da água e descarte dos primeiros indivíduos eclodidos, que supostamente podem estar mortos ou com baixa mobilidade.

A seguir, a câmara é mantida por mais 48 horas, com temperatura ideal para eclosão dos ovos, que é em torno de $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Após esse período, os nematoides que eclodiram serão recuperados em uma peneira granulométrica de 500 mesh, e depois será realizado a calibração de cerca de 200 J2 mL⁻¹, que serão usados no teste de mortalidade.



Figura 3 — Câmara de eclosão de juvenis de *Meloidogyne* spp.

Fonte: autores.

PREPARO DA SOLUÇÃO ESTOQUE E DIFERENTES CONCENTRAÇÕES

Para o preparo da solução, inicialmente toma-se por base uma proporção de 100:1. Dessa forma, mede-se a massa de 10 mg, 5 mg, 2,5 mg, e 1,25 mg de cada extrato vegetal seco separadamente, onde serão diluídos em tubos separados com 16 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO) a 1% e 16 mL de água deionizada.



Figura 4 — Soluções estoques de extratos vegetais metanólicos oriundos de plantas do Cerrado.

Fonte: Lorena N.S. Lopes (2017).

Avaliação dos extratos etanólicos na mortalidade de juvenis de segundo estágio de *M. javanica*

Para avaliação da ação dos extratos de plantas na mortalidade de J2 de *M. javanica*, podem ser utilizadas diferentes concentrações, como, por exemplo, as seguintes concentrações: 0; 1,25; 2,5; 5,0; e 10mg L⁻¹.

Após definir a concentração em pré-testes, em cada tubo de ensaio utilizado (dimensões 25 x 150 mm), deve ser adicionado 1 mL contendo cerca de 200 J2 de segundo estágio de *M. javanica* e em seguida, adicionar 1,5 mL da solução estoque descrita anteriormente. No tratamento controle, acrescenta-se apenas água deionizada.

Por fim, os tubos precisam ser tampados com

papel permeável (papel toalha) a 25 °C e mantidos no escuro, geralmente utiliza-se câmara do tipo B.O.D. Após 24 horas, a solução será vertida em placas, com água sobreposta por papel permeável e mantida por pelo menos 7 dias, onde será feita a quantificação dos J2 vivos contidos na solução (extrato + nematoides) após a adição de uma gota de NaOH 0,5 M. A quantificação é realizada com auxílio da câmara de contagem de Peters sob microscópio fotônico na ampliação de 100 X (Freitas et al., 2016), estabelecendo-se como vivos os indivíduos que atravessaram o papel e se mantiveram móveis.

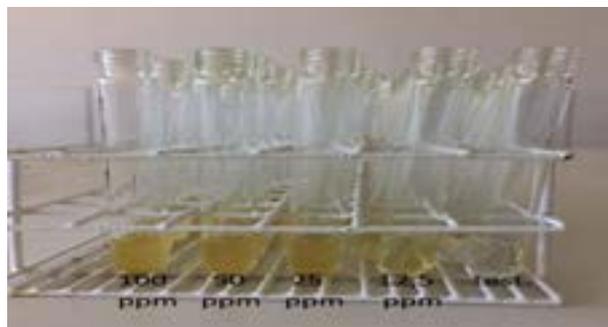


Figura 5 — Esquema de instalação do ensaio em placas de Petri e tubos de ensaio nas diferentes concentrações de extrato botânico.

Fonte: autores.



METODOLOGIA PARA TESTE *IN VITRO* COM ÓLEOS ESSENCIAIS

Após definir as concentrações de óleo essencial que serão utilizadas no trabalho, deve-se preparar as soluções para a realização do teste. Essa solução, denominada de “solução mãe”, deverá ser preparada a partir da maior concentração, dessa forma, as demais soluções serão preparadas a partir da solução “mãe”. O ideal é que todas as concentrações partam dessa solução, preparada com a maior concentração. Para fazer essa solução “mãe”, deve-se calcular o volume final de solução do ensaio e diluir pela metade, ou seja, deve ter o dobro de volume, para quando for fazer as outras concentrações diluir pela metade com água.

Para fazer a solução “mãe”, utiliza-se a quantidade de óleo necessária para naquele volume de água para atingir a concentração final desejada. Então, pega-se esse volume de óleo e dilui em DMSO puro e a mistura obtida entre o DMSO e o óleo deve ser colocada na água. Normalmente, utiliza-se de 2 a 5% de DMSO na maior concentração final do teste.

Exemplo de teste *in vitro* utilizando as seguintes concentrações: 10,0; 5,0; 2,5; 1,25 e 0,625 µl

Primeiramente, utilizou-se 450 µl de óleo que será diluído em 550 µl de DMSO, gerando 1 mL de solução que será adicionada em 29 mL de água. A seguir, mistura-se no vórtex para homogeneizar o óleo e o DMS e, posteriormente, adicionar essa mistura nos 29mL de água destilada. Deve-se lavar com uma pipeta para retirar o excesso de óleo do tubo de ensaio. Ao final, terá o volume de 30mL de uma solução que contém 15 µl., porém quando utilizar essa solução e adicionar 1 mL de J2, deve-se diluir a sua concentração, logo, deve-se realizar o seguinte cálculo:

$$\begin{aligned} C_i \times V_i &= C_f \times V_f \\ 15\mu\text{L/ml} \times 2 \text{ ml} &= C_f \times 3 \text{ ml} \\ C_f &= 10 \mu\text{l} \end{aligned}$$

Dessa forma, será obtido a primeira concentração e maior concentração. A partir dessa, prepara-se as demais concentrações: retira 15 mL dessa solução e adiciona 15 mL de água, formando os 30 mL da próxima concentração que será de 5 µl., deve-se repetir o mesmo procedimento para as próximas concentrações mais diluídas.



DELINEAMENTO ESTATÍSTICO

Em função desses tipos de experimento serem realizados em laboratório, em condições controladas, utiliza-se o delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC), em arranjo, fatorial 5x5 (extratos botânicos x concentrações), com seis repetições. A parcela experimental pode ser representada por cada tubo ou placas de Petri.

Os dados numéricos serão avaliados estatisticamente, mediante análise de variância e, quando significativos, realiza-se a análise qualitativa pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Para os dados quantitativos, realiza-se a análise de regressão. Para o tratamento dos dados, um programa fácil de utilizar é o software Sisvar® (Ferreira, 2011).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O grande potencial de selecionar substâncias nematocidas a partir de espécies vegetais, em especial as plantas do cerrado, advêm como uma excelente alternativa para o manejo de fitonematoides.

Entretanto, os ensaios devem ser realizados de maneira criteriosa, bem definidos e padronizados. Nesse contexto, sintetizamos no presente protocolo, as principais etapas para a realização dos ensaios in vitro para avaliação de substâncias com potencial nematocida. Assim, demonstramos de forma simples e criteriosa baseado na literatura e na experiência de vários anos de realização desse tipo de teste no laboratório de nematologia do Instituto Federal Goiano – Campus Morrinhos.

Plantas com potencial nematocida devem apresentar alto percentual de mortalidade in vitro de J2 de *Meloidogyne*, acima de 70% e em baixas concentrações.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- MACHADO; A.M.Z.; SILVA, S.A.; FERRAZ, L.C.C.B. Métodos em nematologia agrícola. Piracicaba: Sociedade Brasileira de Nematologia, p. 184, 2019.
- BONETI, J.I.S.J.I.S.; FERRAZ, S. Modificação do método de Hussey e Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de raízes de cafeeiro. *Fitopatologia Brasileira*, v.6, p. 553, 1981.
- CLIFF, G.M.; HIRSCHMANN, H.H. Evaluation of morphological variability in *Meloidogyne arenaria*. *Journal of Nematology*, v.17, p. 445-449, 1985.
- FERRIS, H.; ZHENG, L. Plantsourcesofchineseherbalremedies: effectson*Pratylenchus vulnus* and *Meloidogyne javanica*. *Journal of nematology*, v. 31, p. 241-263, 1999.
- FERREIRA, D.F. Sisvar: a computer statistic alanalysis system. *Ciência e Agrotecnologia*, v.35 n.6, p.1039-1042, 2011.
- FREITAS, L.G.; NEVES, W.S.; OLIVEIRA, R.; D'ARC L. Métodos em nematologia vegetal. In: Alfenas, A.C.; Mafia, R.G. *Métodos em Fitopatologia*, p.257-296, 2016.
- FRIGHETTO, R. S. T.; ZAVATTI, L. M. S. Avaliação de espécies vegetais no controle de *Meloidogyne incognita*. *Sociedade Brasileira de Nematologia*, p.33, 1994.
- KARSSSEN, G.; MOENS, M. Root-knot nematodes. *Plant Nematology*, p.59-90, 2006.
- LOPES, L.N.S. controle de *Meloidogyne javanica*: efeito in vitro de extratos de plantas nativas do cerrado. *Dissertação de Mestrado*, p. 47, 2017.
- MOURA, R.M. Gênero *Meloidogyne* e a *meloidoginose*. Parte I. *Revisão anual de patologia de plantas*, v.4 p.209-244, 1996.
- PERRY, R. N.; MOENS, M.; STARR, J. L.: Root-knotnematodes. *CABI International*, p.18-54, 2009.